KEMOTERAPİK AJAN L-ASPARAJİNAZIN Cu(II) İYONLARI İÇEREN POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU VE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

KÜBRA KAYA

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEMOTERAPİK AJAN L-ASPARAJİNAZIN Cu(II) İYONLARI İÇEREN POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU VE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Kübra KAYA
0000-0001-6835-5690

Prof. Dr. Bilgen OSMAN
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KEMOTERAPİK AJAN L-ASPARAJİNAZIN Cu(II) İYONLARI İÇEREN POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU VE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Kübra KAYA

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bilgen OSMAN

Bu çalışmada, L-asparajinaz (L-ASNaz) enzimi metal şelat afinite tekniği ile poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(l)-histidin metil ester-Cu(II)) [PHM-Cu^{2+}] nanopartiküller üzerine immobilize edilmiş ve immobilize L-ASNaz enzimi, yapay serumda L-asparajin (L-Asn) hidrolizi için kullanılmıştır. Enerji dağıtıcı X-Ray analizi (EDX) ile birleştirilmiş taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve Zeta potansiyel ve boyut analizi ile karakterize edilmiştir. İmmobilizasyon etkinliği değerlendirilmiştir ve immobilizasyon verimi %86.46 ± 3.32, aktivite verimi %73.65 ± 4.78, immobilizasyon etkinliği %85.18 ± 4.36 olarak hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize enzimin bağıl aktiviteleri optimum reaksiyon koşulunu belirlemek için karşılaştırılmıştır. L-ASNaz'ın optimum pH'ı 8,5 sıcaklığı ise 45°C olarak belirlenmiştir. PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın optimum pH'ı 7.0 ve sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. Her iki enzimin termal kararlılığı araştırılmış ve immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin %60'ını, serbest enzimin ise sadece %34'ünü koruyabildiği belirlenmiştir. Depolama kararlılığı araştırılmış ve immobilize enzim 4 hafta aktivitesinin %80'nini korumuştur. PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın 10 kez tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %60'ını koruduğu tespit edilmiştir. Ayrıca metal iyonlarının ve organik çözücülerin enzim aktivitesine etkisi araştırılmıştır. PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz tripsin hidrolizine karşı aktivitesinin %45'ini korumuştur. L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz enzimleri için kinetik hesaplamalar yapılmıştır. Yapay serum ortamında 7 günde L-ASNaz aktivitesinin %38.98'ini korurken, PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz %56.87'sini korumuştur. Sonuçlar, L-ASNaz'ın PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartikülleri üzerine immobilizasyonunun substrat afinitesini arttırdığını ve enzim-substrat bileşiklerinin oluşumunu desteklediğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: L-asparajinaz, enzim immobilizasyonu, immobilizasyon parametreleri, polimerik nanopartiküller, yapay insan serumu

2024, X + 91 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

IMMOBILIZATION OF CHEMOTHERAPY AGENT L-ASPARAGINASE TO POLYMERIC NANOPARTICLES CONTAINING Cu(II) IONS AND INVESTIGATION OF ITS EFFECTIVENESS

Kübra KAYA

Bursa Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Bilgen OSMAN

In this study, L-asparaginase (L-ASNase) enzyme was immobilized on poly(2-hydroxyethyl methacrylate-N-methacryloyl-(l)-histidine methyl ester-Cu(II)) [PHM-Cu^{2+}] nanoparticles and immobilized L-ASNase enzyme was used for hydrolysis of L-asparagine (L-Asn) in artificial serum. Nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray (SEM-EDX), Fourier Transform infrared spectroscopy (FTIR), transmission electron microscopy (TEM), Zeta potential and size analysis. The immobilization efficiency was evaluated and the immobilization yield was calculated as 86.46 ± 3.32%, activity yield was 73.65 ± 4.78% and immobilization efficiency was 85.18 ± 4.36%. Relative activities of free and immobilized enzyme were compared to determine the optimum reaction condition. The optimum pH of L-ASNase was determined as 8.5 and temperature as 45°C. The optimum pH of PHM-Cu^{2+}-L-ASNase was determined as 7.0 and the temperature was 50°C. The thermal stability of both enzymes was investigated and the immobilized enzyme retained 60% of its activity while the free enzyme retained only 34%. Storage stability was investigated and the immobilized enzyme retained 80% of its activity after 4 weeks. PHM-Cu^{2+}-L-ASNase retained 60% of its initial activity after 10 times of reuse. The effect of metal ions and organic solvents on enzyme activity was also investigated. PHM-Cu^{2+}-L-ASNase retained 45% of its activity against trypsin hydrolysis. Kinetic calculations were performed for L-ASNase and PHM-Cu^{2+}-L-ASNase. L-ASNase retained 38.98% of its activity after 7 days in artificial, while PHM-Cu^{2+}-L-ASNase retained 56.87%. The results showed that immobilization of L-ASNase on PHM-Cu^{2+}-L-ASNase nanoparticles enhanced substrate affinity and promoted the formation of enzyme-substrate compounds.

Key words: L-asparaginase, enzyme immobilization, immobilization parameters, polymeric nanoparticles, artificial human serum

2024, IX + 91 pages.

TEŞEKKÜR

Bu tezi hazırlamamda bana danışmanlık yapan Prof. Dr. Bilgen Osman'a içten şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim. Tezimin hazırlanması sürecinde yapıcı geri bildirimleri, sabrı ve performansıma olan inancı oldukça önemliydi.

Süreç boyunca beni teşvik eden ve destekleyen Dr. Samir Abbas Ali Noma'ya minnettarım. Bana karşı her zaman sabırlı ve anlayışlıydı. Bana kattıkları ve tezime katkıları için teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvarda birlikte geç saatlere kadar çalıştığım, laboratuvarı benim için daha eğlenceli bir yere getiren ve zor zamanlarımda desteğini esirgemeyen arkadaşım Yüksek Kimyager Altynay Zhumabekova'ya teşekkür ederim.

Güzel güler yüzüyle ve yüksek enerjisiyle beni motive eden ve zor zamanlarımda her zaman desteğini hissettiğim Doç. Dr. Aslı Göçenoğlu Sarıkaya'ya teşekkür ederim.

Aynı zamanda tez çalışmama katkıları için Doç. Dr. Monireh Yücel'e teşekkür ederim.

En önemlisi; anneme, babama, kardeşlerime ve Yağız Kutbey'e sonsuz sevgileri, destekleri ve başarılarıma olan büyük inançları için teşekkür etmek istiyorum. Hayatımda olduğunuz için sonsuz teşekkürler.

Kübra KAYA
…./…/….

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET....ii
ABSTRACT....ii
TEŞEKKÜR....iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ....vi
ŞEKİLLER DİZİNİ....vii
ÇİZELGELER DİZİNİ....ix
1. GİRİŞ....1
2. KURAMSAL TEMELLER ve LİTERATÜR TARAMASI....5
2.1. L-asparajinaz....5
2.2. L-ASNaz kaynakları....11
2.3. L-ASNaz enziminin uygulama alanları....15
2.3.1. Kanser tedavisi uygulamaları....15
2.3.2. Gıda endüstrisi uygulamaları....18
2.4. Enzim immobilizasyonu....19
2.4.1. İmmobilizasyon yöntemleri....21
2.4.1.1. Adsorpsiyon....21
2.4.1.2. Tutuklama....24
2.4.1.3. Kovalent bağlama....25
2.4.1.4. Çapraz bağlama....25
2.4.1.5. Metal-şelat immobilizasyonu....27
2.4.2. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri....29
2.5. L-ASNaz immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar....31
3. MATERYAL ve YÖNTEM....38
3.1. Materyal....38
3.2 Yöntem....39
3.2.1. MAH-Cu^{2+} monomerinin sentezi....39
3.2.2. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin sentezi ve karakterizasyonu....40
3.2.3. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllere L-ASNaz immobilizasyonu....42
3.2.4. L-ASNaz aktivitesinin belirlenmesi....42
3.2.5. Enzim aktivitesine etki eden parametrelerin araştırılması....44
3.2.5.1. pH etkisi....44
3.2.5.2. Sıcaklık etkisi....44
3.2.5.3. Termal kararlılık....44
3.2.5.4. Tekrar kullanılabilirlik....44
3.2.5.5. Depolama kararlılığı....45
3.2.5.6. Proteaz dayanımı....45
3.2.5.7. Metal iyonu etkisi....45
3.2.5.8. Organik çözücü etkisi....45
3.2.5.9. Kinetik parametreler....46
3.2.6. PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın *in vitro* yarı ömrünün belirlenmesi....46

4. BULGULAR ve TARTIŞMA 47
4.1. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin özellikleri 47
4.1.1. SEM-EDX analizi 47
4.1.2. FTIR analizi 49
4.1.3. TEM analizi 52
4.1.4. Zeta potansiyel ve boyut analizi 52
4.2. İmmobilizasyon parametreleri 54
4.2.1. İmmobilizasyon verimi 54
4.2.2. Optimum pH 54
4.2.3. Optimum sıcaklık 55
4.2.4. L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın termal kararlılığı 58
4.2.5. Tekrar kullanılabilirlik 57
4.2.6. L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın depolama kararlılığı 59
4.2.7. Tripsin dayanıklılığı 60
4.2.8. Metal iyonu etkisi 60
4.2.9. Organik çözücü etkisi 62
4.2.10. Kinetik parametreler 63
4.2.11. *In vitro* yarılanma ömrü 64
5. SONUÇ 66
KAYNAKLAR 69
ÖZGEÇMİŞ 90

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
Km	Michaelis sabiti
[S]	Substrat derişimi
Vmax	Maksimum hız
V_o	İlk hız
Ea	Aktivasyon enerjisi
Kcat	Enzimin turnover sayısı
U	Enzim ünitesi
Cu^{2+}	Bakır (II) iyonu
A_i	İmmobilize L-ASNaz'ın aktivitesi
A_f	Serbest L-ASNaz'ın aktivitesi
C_i	Enzimin başlangıç derişimi
C_s	Süpernatant ve yıkama çözeltilerindeki toplam enzim derişimi
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
pI	İzoelektrik nokta

Kısaltmalar	**Açıklama**
L-ASNaz	L-asparajinaz
L-Asn	L-asparajin
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
L-Glu	L-glutamin
L-Asp	L-aspartik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DCM	Diklorometan
SEM-EDX	Enerji Dağılımlı X-Işını ile Taramalı Elektron Mikroskopisi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
XRD	X-Işını Kırınım yöntemi
MAH	N-metakriloil-(L)-histidin metil ester
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
PVA	Polivinil alkol
APS	Amonyum persülfat
EDS	Enerji Dağılım Spektroskopisi
TGA	Termogravimetrik Analiz
CLEC	Çapraz bağlı enzim kristalleri
MOF	Metal Organik ağ yapıları
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
PHM-Cu^{2+}	Poli(2-hidroksietil metakrilat-N-metakriloil-(l)-histidin metil ester-Cu(II))
PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz	PHM-Cu^{2+} üzerine immobilize edilmiş L-ASNaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1.	L-ASNaz'ın basitleştirilmiş etki mekanizması……	5
Şekil 2.2.	Oksaloasetattan asparajinin biyosentezi……..	5
Şekil 2.3.	L-asparajinin L-aspartik asit ve amonyağa hidrolizi……	6
Şekil 2.4.	α-ketoglutarat ve glutamat arasındaki dönüşüm reaksiyonu ……....	6
Şekil 2.5.	L-ASNaz reaksiyonunun genel hidroliz mekanizması…….	8
Şekil 2.6.	*Escherichia coli*'den izole edilmiş L-ASNaz homotetramerinin yapısı …….....	10
Şekil 2.7.	*Escherichia coli* L-ASNaz'ın genel yapısı ……...……	11
Şekil 2.8.	Kanser hücrelerinde L-ASNaz sitotoksisitesinin şematik gösterimi……..	16
Şekil 2.9.	L-ASNaz'ın normal hücre ve kanser hücresi üzerine antineoplastik etkisinin şematik gösterimi ….....	17
Şekil 2.10.	Akrilamid oluşumunun şematik gösterimi ……..	19
Şekil 2.11.	Enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemler ……..……...	21
Şekil 2.12.	Enzim moleküllerinin destek materyali ile elektrostatik etkileşimi..	23
Şekil 2.13.	Enzim moleküllerinin hapsetme/kapsülleme yoluyla immobilizasyonu…….	24
Şekil 2.14.	Bir enzimin işlevselleştirilmiş desteğe kovalent bağlanması.....	25
Şekil 2.15.	Çapraz bağlama yönteminin gösterimi……	26
Şekil 2.16.	Çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanışı……..	27
Şekil 2.17.	Metal şelatlı bir afinite desteğine bağlanan proteinin şematik gösterimi. Bir proteinin IMAC matrisine güçlü bir şekilde bağlanması, doğal veya tasarlanmış yüzey histidinlerinin çok noktalı bağlanmasıyla (a) veya proteinin N veya C terminaline eklenen histidin etiketi (b) ile sağlanır…….	28
Şekil 2.18.	Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri……....	30
Şekil 3.1.	MAH monomeri sentezinin şematik gösterimi……	40
Şekil 3.2.	PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin sentezi …….....	41
Şekil 3.3.	PHM-Cu^{2+} nanopartiküllere L-ASNaz immobilizasyon prosedürü	42
Şekil 4.1.	PHM-Cu^{2+} (a,b) ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz (c,d) nanopartiküllerinin farklı büyütme oranlarında alınmış SEM görüntüleri.....	48
Şekil 4.2.	PHM-Cu^{2+} (a) ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz (b) nanopartiküllerinin SEM-EDX spektrumları.....	49
Şekil 4.3.	L-ASNaz'ın ve PHM-Cu^{2+} ile PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartiküllerin FTIR spektrumları……...	51
Şekil 4.4.	PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin TEM fotoğrafları…….	52
Şekil 4.5.	PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartiküllerinin zeta potansiyel analizi...	53
Şekil 4.6.	Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz için optimum pH.....	55
Şekil 4.7.	Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz için optimum sıcaklık..	56
Şekil 4.8.	Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın termal kararlılığı.....	57
Şekil 4.9.	PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın tekrar kullanılabilirliği…….	58
Şekil 4.10.	Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın depolama kararlılığı	59
Şekil 4.11.	Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın tripsin enzimine karşı direnci.....	60
Şekil 4.12.	Metal iyonlarının serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz aktivitesi üzerine etkisi.....	61

Şekil 4.13. Organik çözücülerin serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz aktivitesi üzerine etkisi..... 63
Şekil 4.14. Serbest L-ASNaz (a) ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz (b) için Lineweaver-Burk grafikleri 64
Şekil 4.15. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın *in vitro* yarı ömrü… 65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Bakteriyel L-ASNaz kaynakları..... 12
Çizelge 2.2. L-ASNaz'ın mantar kaynakları……..... 13
Çizelge 2.3. L-ASNaz'ın maya kaynakları 14
Çizelge 2.4. L-ASNaz üreten aktinomisetler 14
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi……..……... 38
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi(devamı)……..... 39

1. GİRİŞ

Sanayileşmiş ve gelişmekte olan ülkelerde kanser hastalarının sayısı giderek artış göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı rapora göre, her yıl 10 milyondan fazla kanser vakası görülmekte ve her yıl 6 milyondan fazla insan kanser nedeniyle hayatını kaybetmektedir.

Çok sayıda farklı kanser türü olmasına rağmen dünyada en fazla görülen kanser türünün kan kanseri olduğu bilinmektedir (Yümlü, 2015). Akut lenfoblastik lösemi (ALL) çocuklar arasında en sık görülen kanser türüdür. Kemoterapideki son gelişmeler, çocukluk çağında ALL hastalarının yaklaşık %80'ninin iyileşmesini mümkün kılmıştır. L-ASNaz, ALL hastalığının tedavisinde başvurulan birincil kemoterapötik ajanlardan biridir. Rekombinant enzimlerin, özellikle de umut verici antineoplastik özellikler gösteren L-ASNaz'ın geliştirilmesi ile tıp alanında lösemi tedavisine ilişkin önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Lösemik hücrelerde, normal hücrelerin aksine, asparajin sentetaz enzimi çok az bulunur veya hiç bulunmaz; bu nedenle lösemik hücreler, hayatta kalmak için gerekli olan L-Asparajin (L-Asn) amino asidini üretemezler. (Cachumba ve ark., 2016). Bu nedenle, L-ASNaz varlığı tümör hücrelerinin büyümesini önleyerek, hücre ölümüne yol açar (Shakambari ve ark., 2019). Günümüzde, ilaç uygulamaları için kullanılan L-ASNaz'lar bakterilerden üretilmektedir. Ancak bu tür L-ASNaz'lar ateş, anafilaksi ve aşırı duyarlılık reaksiyonları gibi olumsuz yan etkilere neden olabilmektedir (Castro ve ark., 2021). Ayrıca, saflaştırma süreçleri maliyetlidir ve endüstriyel süreçler için kullanılabilirliği sınırlıdır (Mohamed ve ark., 2015).

L-ASNaz'ın klinik araştırması ilk kez Dolowy tarafından yapılmıştır ve bu araştırmanın sonucuna göre L-ASNaz'ın kemoterapötik ajan etkinliğine sahip olduğu belirtilmiştir (Dolowy ve ark., 1966). 1970 yılında Tallal ve arkadaşları, L-ASNaz'ın çocuklarda lenfatik kanserlerle birlikte solid tümörleri de tedavi edebildiğini bulmuştur (Boice ve ark., 1992). McCredie tarafından L-ASNaz'ın toksisitesi ve farmakolojisi araştırılmıştır (McCredie ve ark., 1973).

L-ASNaz'ın mevcut kullanılan formülasyonları arasında *Escherichia coli* ve *Dickeya chrysanthemi*'nin doğal formülasyonları, *Escherichia coli* ve *Dickeya chrysanthemi*'nin polietilen glikol (PEG) ile formülasyonları ve bir rekombinant *Escherichia coli* varyantı

bulunmaktadır (Chien ve ark., 2014; Salzer ve ark., 2014; Völler ve ark., 2018). PEG ile modifiye edilmiş L-ASNaz hastalarda immün yanıtı azaltmak için kullanılmaktadır. Ancak PEG ile modifiye edilmiş L-ASNaz enzimin plazma yarı ömrünün kısa olması (5 ila 7 gün arasında değişir) ve pahalı olması nedeniyle kullanımı ve erişilebilirliği sınırlıdır (Avramis ve Panosyan., 2005). L-ASNaz gibi klinik enzimlerin hem yan etkilerini azaltmanın hem de yarılanma ömrünü artırmanın çok önemli olduğu yaygın olarak belirtilmektedir. Ancak immobilizasyon sürecinin önündeki engel enzimin katalitik aktivitesinin azalmasıdır. Enzim immobilizasyonundan sonra enzim aktivitesi kaybını ortadan kaldıran yeni taşıyıcı sistemlere ihtiyaç vardır.

ALL tedavisinde, L-ASNaz formülasyonları uzun süredir kullanılmaktadır, ancak bu formülasyonlar tedavi esnasında uzun vadede istenmeyen reaksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle bu enzimin yan etkilere neden olmayacak alternatif kaynaklarının araştırılması veya formülasyonlarının geliştirilmesi araştırmacılar için önemli bir alandır.

Enzimler ile ilgili dezavantajları gidermek ve enzimin aktivitesini, stabilitesini ve geri kazanımını büyük ölçüde iyileştirmek için enzimler immobilize edilmektedir. Ayrıca immobilize enzimler serbest enzimlere kıyasla farklı reaksiyon ortamlarında ve zor koşullarda kullanılabilmektedir. Enzim immobilizasyonunda katı destek maddesi olarak nanomalzemelerin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Yüksek yüzey alanına sahip olan nanopartiküller, bu özellikleri sayesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir ve kullanıldığı alanlarda büyük avantaj sağlar. Nanopartiküller, yüzeyle ilgili olan enzim immobilizasyonu, kontrollü ilaç salımı, adsorpsiyon, arıtma, yüzey modifikasyonu gibi yüzeysel etkileşim temelli uygulamalarda oldukça kullanışlıdır. Nanopartiküllerin boyutlarının küçülmesi yüzey/hacim oranlarını artırır. Adsorpsiyon gibi yüzeyde gerçekleşen fiziksel olaylarda yüzey alanının kütleye oranının fazla olması nanopartikülün kapasitesini artırıp işlem sürecini kısaltır. Nanoyapılı cihaz ve malzemelerin tasarlanmasını, üretimini ve kullanımını içeren nanoteknoloji alanının gelişimi için nanopartikül üretimi büyük öneme sahiptir. Nanopartiküller geniş bir kimyasal çeşitlilikte ve morfolojide üretilebilirler. Nanopartiküllerle ilgili çalışmalar nanoteknolojinin gelişmesine bağlı olarak her geçen gün artmaktadır. Polimerik nanopartikülleri hazırlamak için kullanılan temel üretim yöntemleri; süspansiyon, emülsiyon, yığın, çekirdek-kabuk ve çözelti polimerizasyonudur. Polimerizasyon

yöntemi, etkin maddenin çözünürlüğüne ve kullanılan polimerin yapısına göre belirlenmektedir.

L-ASNaz'ın saflaştırılması (Bahraman ve Alemzadeh, 2017), immobilizasyonu (Bahraman ve Alemzadeh, 2017) ve sensör amaçlı kullanımı ile ilgili çok sayıda çalışma rapor edilmesine karşın, klinik amaçlı biyouyumlu polimerik destek materyali üzerine immobilizasyonu ve uygulaması konusunda yapılmış çalışma sayısı sınırlıdır.

LASNaz enziminin ve hassasiyetini artırmak için kullanılan destek materyalleri; homolog albumin (Poznansky, 1982), gözenekli içi boş fiber plazma filtreleri (Gombotz, 1985), biyouyumlu poli(etilen glikol)-albümin hidrojel (Jean-Francois, 1996), kitosan (Qian ve ark., 1996), naylon (Allison ve ark., 1972), poliakrilamid (IuV ve ark., 1981), fruktoz polimer levan (Vına, 2001), glutaraldehit ile aktive edilmiş agaroz (Balcao, 2001), ipek serisin proteini mikropartikülleri (Zhang, 2004), kalsiyum aljinat-jelatin çapraz bağlı malzemeler (Youssef ve Al-Omair, 2008), hidrojel-manyetik nanopartiküller (Teodor, 2009), poli(glisidil metakrilat-ko-etilen glikol dimetakrilat) monolitik kolon (Qiao, 2011), poli(2-vinil-4,4-dimetilazlakton) ile işlevselleştirilmiş manyetik nanopartiküller (Mu, 2014), kitosan-tripolifosfat nanopartikülleri (Bahreini, 2014), poli(metil metakrilatko-metakrilik asit) nişasta kompozitleri (Ulu, 2016a), poli(2-hidroksietil metakrilat) ve poli(2-hidroksietil metakrilat)-nişasta kompozitleri (Ulu, 2016b), MCM-41 (Ulu ve ark., 2018), Fe_3O_4 ile kaplanmış MOF (metal organik ağ yapıları) (Ulu, 2020), hibrit nanoçiçekler (Noma ve ark., 2020), biyopolimerler ile kaplı manyetik çekirdek/kabuk Fe_3O_4@Au nanopartiküllerdir (Raee, 2022). Bu çalışmalarda pH ve sıcaklık optimizasyonu, tekrar kullanılabilirlik, depolama ve termal kararlılık, yarı ömür gibi önemli parametreler araştırılmıştır.

Bu tez çalışmasında; PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlendi ve L-ASNaz enziminin immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanıldı. Literatüre bakıldığında, yüksek hassasiyet ve düşük tayin limiti sağlayan PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin; meme kanseri MDA MB 231 hücresi, yumurtalık kanseri belirteci karbonhidrat antijeni-125 ve pestisitlerin tayininde başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir (Bakhshpour ve ark., 2019; Göktürk ve ark., 2022; Gür ve ark., 2022). PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin sentezinde kullanılan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA)

monomeri hidrofilik özelliği, düşük toksisitesi ve biyouyumluluk gibi üstün özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Chouhan ve ark., 2019; Paterson ve ark., 2012). HEMA'nın hidrofilik davranışının çoğu, monomerin yapısındaki hidroksil grubunun varlığından kaynaklanmaktadır. N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomeri histidin amino asidinin türevidir ve kimyasal yapısı protein yapılı enzimler ile etkileşme potansiyeline sahiptir. Ayrıca son yıllarda kromatografi, biyosensör ve kontrollü ilaç salınım gibi geniş bir alanda amino asit bazlı monomerler sentezlenmiştir ve HEMA ile kopolimerize edilmiştir (Jalilzadeh ve ark., 2016; Shaikh ve ark., 2015; Bakhshpour ve ark., 2018).

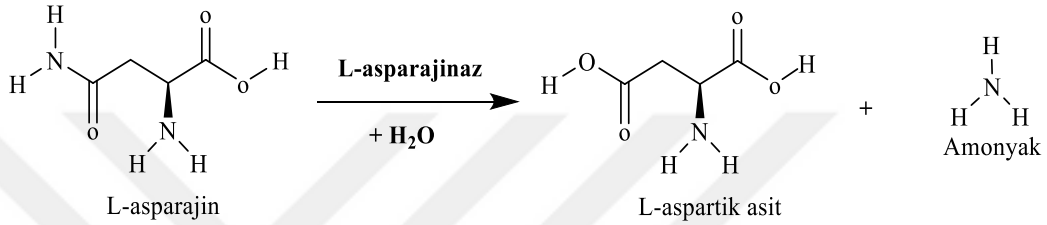
Polimerik yapıda Cu^{2+} iyonlarının varlığı ile nanopartiküllerin L-ASNaz proteinine yüksek afinite göstermesi hedeflenmiştir. İmmobilize metal afinite kromatografi tekniği metal iyonlarının koordinasyon bölgelerine proteinlerin bağlanması temeline dayanan bir tekniktir. Bu teknik esas olarak proteinin yüzeyinde bulunan histidin ile şelatlı bir metal iyonuyla, destek materyaline immobilize edilmiş bir ligand arasındaki etkileşimlere dayanır (Bakhshpour ve ark., 2016). Yaygın olarak kullanılan iyonlar Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), Ca(II) ve Fe(III) iyonlarıdır (Cheung ve ark., 2012; Yabutani ve ark., 2012; Loughran ve Walls, 2011). Bu teknik histidin etiketli proteinlerin, doğal metal bağlayıcı proteinlerin ve antikorların saflaştırılması için geniş çapta uygulanmıştır (Kuo ve Chase, 2011). İmmobilize metal afinite kromatografi tekniği ayrıca proteomik çalışmalar ve protein fraksiyon analizlerinde de uygulamalara sahiptir (Sun ve ark., 2008). Bu çalışmada kullanılan Cu^{2+} iyonu ile şelatlaşmış PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin L-ASNaz enzimine yüksek afinite ile bağlanmasıyla yüksek immobilizasyon verimliliğinin elde edilmesi sağlanmıştır.

Çalışmada; PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin immobilizasyon öncesi ve sonrası karakterizasyonları SEM-EDX, FTIR, TEM, Zeta potansiyel ve boyut dağılımı analizleri ile gerçekleştirildi. L-ASNaz ve immobilize L-ASNaz enziminin aktivitesine etki eden parametreler (pH, sıcaklık, metal iyonu ve organik çözücü etkisi), termal ve depolama kararlılığı, tripsin enzimine karşı dirençleri, kinetik özellikleri ve immobilize L-ASNaz enziminin tekrar kullanılabilirliği araştırıldı. İmmobilize L-ASNaz enzimi, yapay serumda L-Asn hidrolizi için kullanıldı ve aktivitesi serbest L-ASNaz aktivitesi ile karşılaştırıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER ve LİTERATÜR TARAMASI

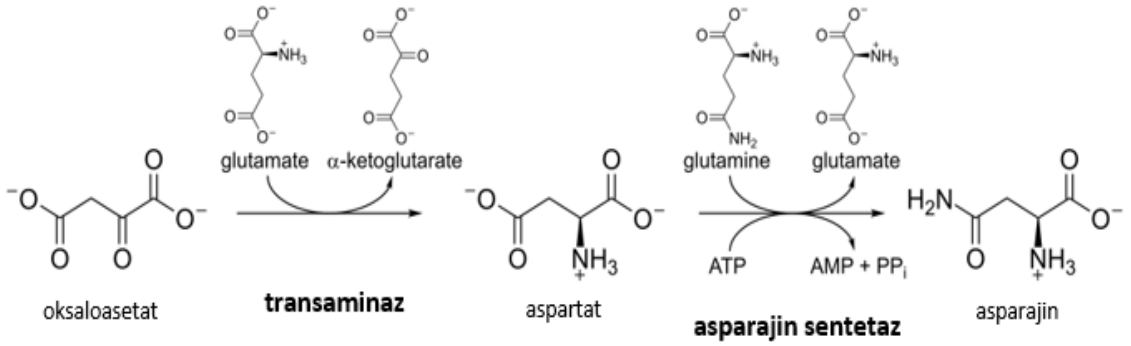
2.1. L-asparajinaz

L-ASNaz, 1970'lerden beri ALL tedavisi başta olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavilerinde kullanılan, kemoterapötik ajan olarak önemli rol oynayan bir enzim türüdür (Pui ve ark., 2008). L-ASNaz, L-Asn'nin su ile L-Aspartik asit (L-Asp) ve amonyağa hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfına ait bir enzimdir. Şekil 2.1'de gösterildiği gibi reaksiyonda L-Asn amino asidinin peptit olmayan karbon-azot bağları parçalanır.

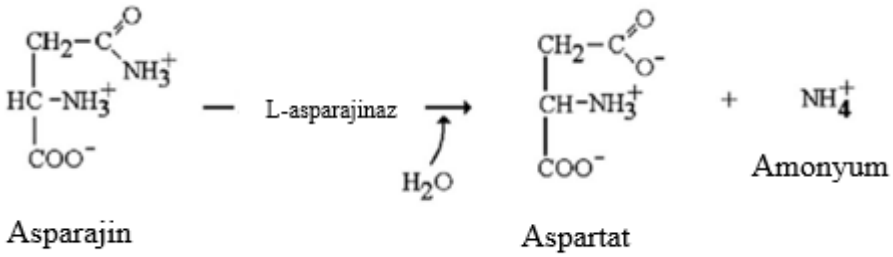


Şekil 2.1. L-ASNaz'ın basitleştirilmiş etki mekanizması

L-Asn, esansiyel olmayan bir amino asittir ve biyosentezi temel olarak iki yola dayanır: Oksaloasetattan asparajinin biyosentezi (Şekil 2.2) veya L-Asn L-Asp ve amonyağa hidrolizi (Şekil 2.3). L-Asn'nin vücutta, diğer amino asitlerin veya nükleik asitlerin sentezi için bozunma yoluyla serbest bir amin grubu haline getirilmesi ve protein sentezine doğrudan katılması gibi çeşitli işlevleri vardır (Nelson, 2011).

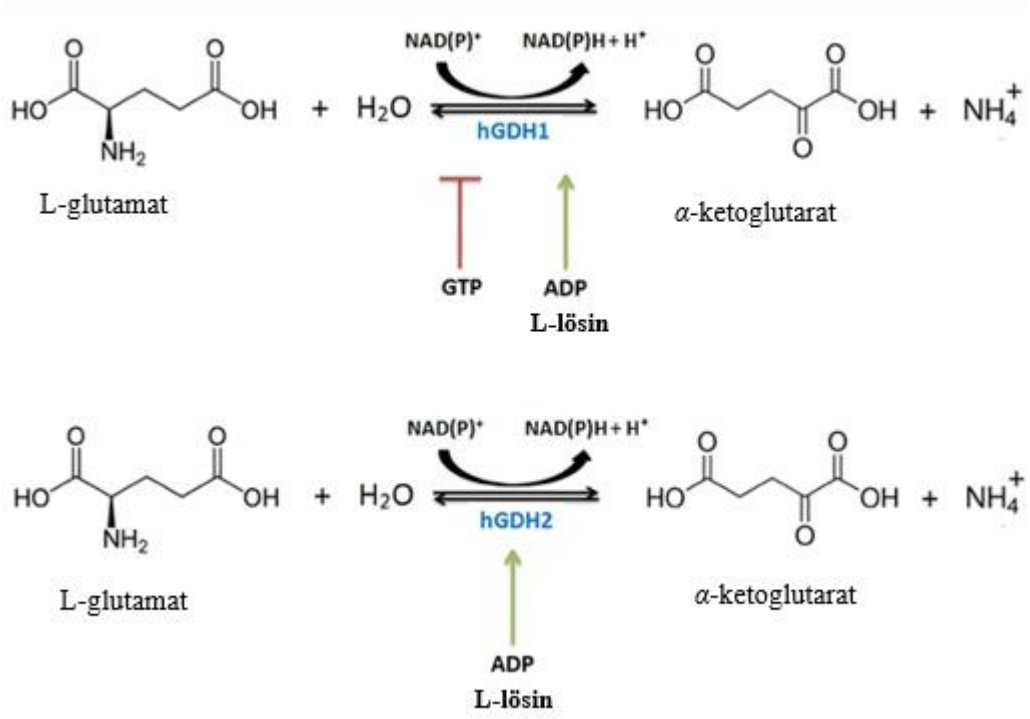


Şekil 2.2. Oksaloasetattan asparajinin biyosentezi (Erenler ve Geckil, 2014)



Şekil 2.3. L-asparajinin L-aspartik asit ve amonyağa hidrolizi (Erenler ve Geckil, 2014)

L-Asn sentezlenen kimyasal reaksiyonlardan biri öncül olarak L-Glu kullanır ve bu reaksiyonun glutamat yoluyla α-ketoglutarattan meydana gelebildiği sitrik asit döngüsü gibi metabolik yollarla doğrudan bir ilişkisi vardır (Nelson, 2011). Böylece, L-Glu sentezi, yüksek NADH, ATP ve süksinil-CoA derişimleri nedeniyle oluşabilen α-ketoglutarat dehidrojenaz kompleksinin inhibisyonu ile indüklenir ve glutamat dehidrojenaz tarafından glutamata dönüştürülen α-ketoglutaratın birikimine neden olur (Şekil 2.4), (Nelson, 2011).



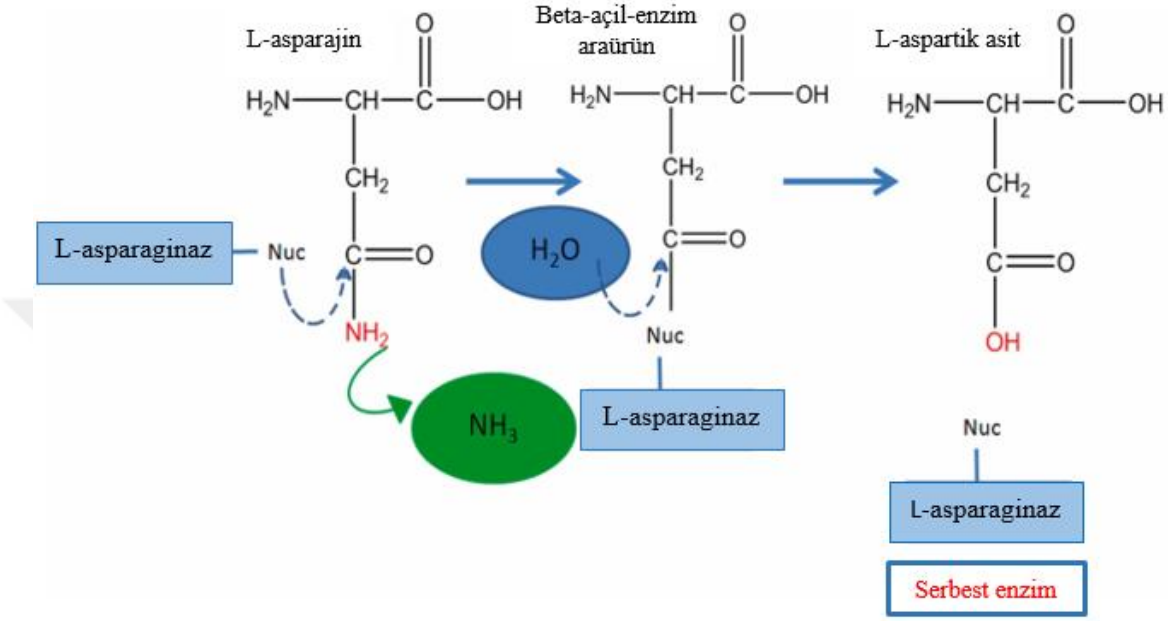
Şekil 2.4. α-ketoglutarat ve glutamat arasındaki dönüşüm reaksiyonu (Mathioudakis ve ark., 2019)

L-Asn'nin hem normal hücrelerde hem de lösemik hücrelerde protein sentezinin substratı olarak rol oynadığı ve L-Asn'nin kan dolaşımına bağımlı olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. AncakL-ASNaz kan dolaşımındaki L-Asn'yi azaltarak lösemik hücreler tarafından kullanılmasını engeller. Bu da hücrelerin aç kalmasına ve ardından malign lenfoid hücrelerin ölümüne yol açar (Batool ve ark., 2016). Sitotoksik etki kanser hücrelerinin L-Asn sentezleyememesine ve kan plazması ve dokular dahil olmak üzere dış kaynaklara ihtiyaç duymasından kaynaklamaktadır.

L-ASNaz hidroliz reaksiyonu sayesinde, çocuklarda ALL gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan önemli bir ilaçtır. ALL, yetişkin lösemilerinin %20'si ve çocukluk çağı lösemilerinin yaklaşık %80'i olmak üzere en çok çocuklarda görülen bir kanser türüdür. L-ASNaz'ın tümör inhibitörü olarak etkisi, lösemi hücrelerinde protein sentezinin durmasına yol açan L-Asn'nin parçalanmasına bağlıdır. L-Asn, hem normal (sağlıklı) hem de lösemik hücrelerde protein sentezi ve metabolik ihtiyaçlar için gerekli olan bir amino asittir (Kotzia ve ark., 2007). L-Asn, L-asparajin sentetaz ve transaminaz enzimlerinin bulunması nedeniyle sağlıklı hücrelerde sentezlenebilir. Sonuçta, sağlıklı hücreler L-asparajin sentetaz enzimini kullanarak L-Asp'ni L-Asn'ne dönüştürür. L-asparajin sentetaz neoplastik hücrelerde bulunmaz; L-asparajin sentetaz yetersizliği neoplastik hücrelerin yaşaması ve çoğalması için kan dolaşımı başta olmak üzere dış kaynaklardan amino asit alımına neden olur. L-ASNaz'ın kan dolaşımına enjekte edilmesi, L-Asn amino asidinin hidroliz olmasına yol açarak kanser hücrelerinin aç kalmasına ve ardından hücre ölümüne neden olur.

L-Asn'nin L-ASNaz tarafından hidroliz mekanizması, β-açil-enzim ara ürününün oluşumu ile iki adımda gerçekleşir (Şekil 2.5). Mekanizmanın ilk adımında, NH_2 kuvvetli bazı enzimin nükleofilik kalıntısını aktive eder ve böylece L-Asn'nin amid karbon atomuna saldırarak ara ürün olarak β-açil-enzim ürününün oluşmasına neden olur. İkinci adımda, bir H_2O molekülü tarafından aktive edilen nükleofil tarafından R-C=O ester karbonuna saldırılır ve ürün olarak L-Asp ve NH_3 oluşur. Bu mekanizma serin-proteazlara benzemektedir. Çünkü aktiviteler katalitik üçlüler olarak sınıflandırılan amino asit gruplarına dayanır. Bu katalitik üçlüler His, Ser, Asp gibi nükleofilik bir amino asit, baz ve hepsi hidrojen bağlarıyla bağlanmış asidik yapıya sahip bir amino asit

tarafından oluşturulur. L-ASNaz tarafından katalize edilen başka reaksiyonlar da vardır. Örneğin *Serratia marcescens* tarafından üretilen L-ASNaz, L-Asn'e kıyasla L-glutamini (L-Glu) hidroliz edebilir. L-Glu, yapılarındaki benzerlikten dolayı L-Asn'nin rekabetçi bir inhibitörüdür (Batool ve ark., 2016).



Şekil 2.5. L-ASNaz reaksiyonunun genel hidroliz mekanizması (Cachumba ve ark., 2016)

Klinik amaçlar için L-ASNaz, *Escherichia coli* veya *Erwinia chrysanthemi*'den saflaştırılır (Swain ve ark., 1993; Wriston, 1985). Klinik uygulamalarda şu anda üç tip L-ASNaz kullanılmaktadır. Bu L-ASNaz'lardan ikisi doğal olarak *Escherichia coli*'den türetilirken, üçüncü bir L-ASNaz *Erwinia chrysanthemi*'den türetilmiştir (Kumar ve ark., 2014). *Escherichia coli* L-ASNaz, ALL tedavisinde birinci basamak olarak kullanılırken, *Erwinia chrysanthemi* L-ASNaz birinci tipe karşı duyarlılığın yüksek olması nedeniyle ikinci basamak olarak kullanılmaktadır (Marini ve ark., 2017).

L-ASNaz enzimi ilk olarak 20. yüzyılın başlarında Lang (1904) tarafından sığır kaslarında, domuz ve atlarda gözlemlenmiştir. Clementi (1922) bir çalışmasında, L-Asn'yi hidroliz edebilen ve çeşitli hayvanların organlarında bulunan hidrofilik bir fermentin enzimatik özelliklerini açıklamış ve buna L-ASNaz adını vermiştir. L-ASNaz'ın tümör inhibitörü olarak kullanımı 1950'li yılları bulmuştur. 1950'li yılların başında Kidd (1953) tarafından kobay serumunun (Ginepig) murin lenfomasına karşı

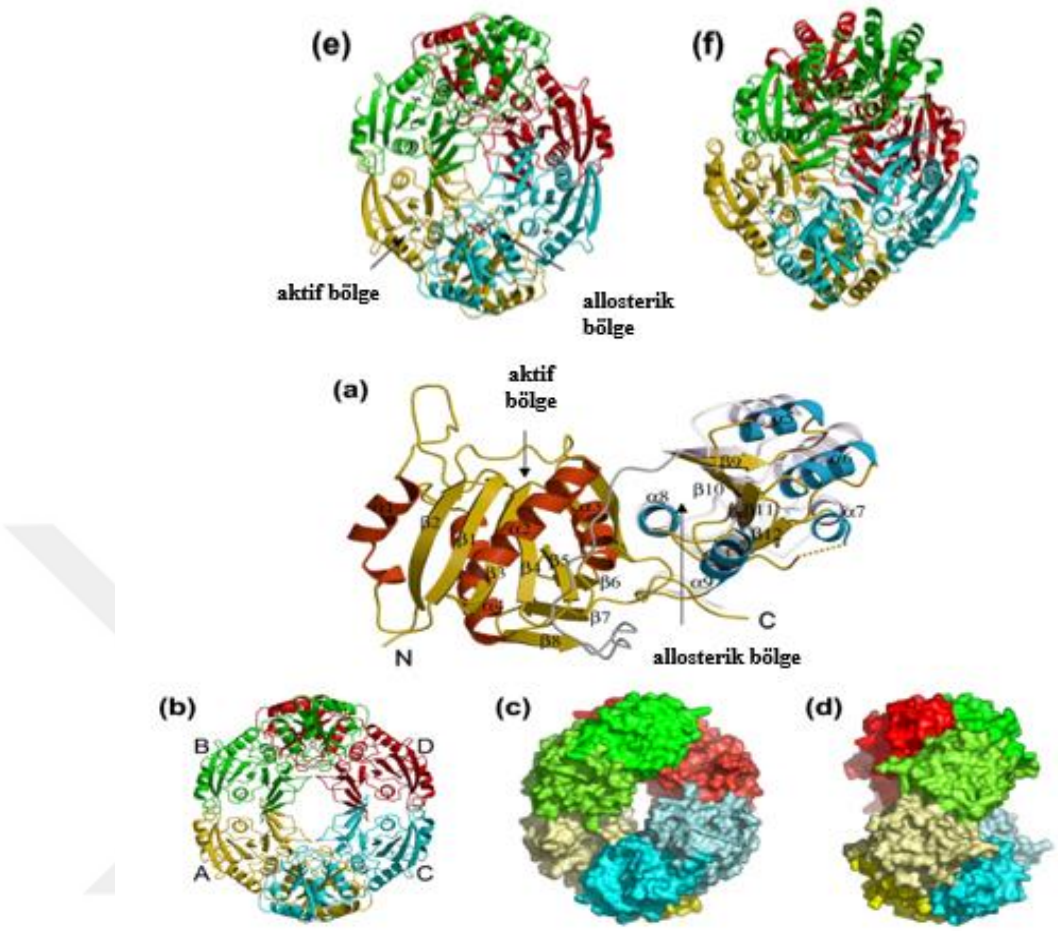
anti-tümör aktivitesi olduğu rapor edilmiştir. Kobay serumunun murin lenfoma gelişimini yavaşlatma ve tamamen durdurma yeteneğine sahip olduğu keşfedilmiştir. Neuman ve McCoy (1956) lösemi tümör hücrelerinin büyümesi için eksojen L-Asn'nin gerekli olduğunu kanıtladığında, Ginepig kan serumu L-ASNaz'ın bulunması nedeniyle lenfomalara karşı potansiyel bir terapötik ajan haline gelmiştir (Broome, 1961; Broome, 1963). Buna rağmen Ginepig serumundan elde edilen L-ASNaz yeterli miktarda üretilmediğinden klinik amaçlı kullanım için değerlendirilmemiş ve bu nedenle araştırmacılar bakteriyel kaynaklara yönelmiştir (Fonseca ve ark., 2021). 1960'lı yılların ortalarında bakteriyel ve kültür ortamlarında L-ASNaz varlığı ilk kez doğrulanmıştır (Dolowy ve ark., 1966).

L-ASNaz enziminin moleküler düzeyde yapısını aydınlatmak için birçok bilim insanı araştırmalar yürütmüştür. 1976 yılında Murthy ve Knox, *Escherichia coli* L-ASNaz küçük açılı X-ışını saçılma çalışmaları gerçekleştirmiştir ve yapı bir tetramer olarak rapor edilmiştir. L-ASNaz genellikle tetramer yapıda bulunur. Buna karşın L-ASNaz'ın çeşitli kaynaklardan yapılan saflaştırma çalışmalarında monomerik, dimerik ve hekzamerik gibi formlarının olduğu da bulunmuştur. Çoğu bakteriyel L-ASNaz kuaterner ve tersiyer yapılar sergilemektedir (Ramya ve ark., 2011). Çeşitli araştırmalarda, her iki türün de yapının ayrıntılarını göstermesi ve aynı üç boyutlu yapıya sahip olması nedeniyle, özellikle *Escherichia coli* ve *Erwinia* olmak üzere iki tür bakteriyel L-ASNaz yapısına odaklanılmıştır (Lubkowski ve ark., 2003). X-ışını kristalografisi verilerine göre, *Escherichia coli*'den saflaştırılan L-ASNaz enzimi tetramerik bir proteindir ve klinik amaçlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. L-ASNaz için moleküler formül $C_{1377}H_{2208}N_{382}O_{442}S_{17}$ ve her bir özdeş alt birim için ortalama moleküler ağırlık 35,6 kDa'dır (Swain ve ark., 1993). Maita ve arkadaşları (1979) yaptığı bir çalışmada, Edman bozunması ile L-ASNaz'ın amino asit dizisini belirlemiştir. 1980 yılında Illarionova ve arkadaşları (Illarionova ve ark., 1980), *Escherichia coli*'nin L-ASNaz ikincil yapısını geniş bir pH aralığında karakterize etmiştir. *Escherichia coli*'den elde edilen L-ASNaz'ın yapısı Swain ve arkadaşları (1993) tarafından da tanımlanmış ve N ve C terminalleri arasındaki aktif bölgenin tanımlanmasının yanı sıra iki alan rapor edilmiştir (Lubkowski ve ark., 1996). 2001 yılında Aghaiypour ve arkadaşları, Thr15 ve Try29 kalıntılarının, bakterideki L-ASNaz'ın katalitik aktivitesinde önemli bir rol oynadığını rapor etmiştir (Aghaiypour ve ark., 2001).



Şekil 2.6. *Escherichia coli*'den izole edilmiş L-ASNaz homotetramerinin yapısı (Kozak and Jurga, 2002)

Erwinia carotovora kaynaklı enzim, her biri dört özdeş monomerden (A'dan H'ye) oluşan iki tetramerden (ABCD ve EFGH) oluşur (Şekil 2.7). Her iki monomerde yer alan üç yüz yirmi yedi amino asidin incelenmesi sonucunda 14 α -heliks ve 8 β-heliks ve iki alan; büyük bir N-terminal alanı ve küçük bir C-terminal alanı olduğu bulunmuştur (Aghaiypour ve ark., 2001; Kozak ve ark., 2000). Aktif bölge iki komşu monomer (A ve C, B ve D) arasında konumlandırılmıştır. Her aktif bölge, iki komşu monomerdeki amino asitlerin taşınmasıyla şekillenir. Aktif merkezi oluşturan amino asitler; Thr15, Tyr29, Ser62, Glu63, Thr95, Asp 96, Ala120 ve Lys168; komşu monomerde ise sadece bir kalıntı Ser254 mevcuttur (Ramya ve ark., 2011; Jaskolski ve ark., 2001; Park ve ark., 1981; Janin ve ark., 2007; Narta ve ark., 2007; Vieira ve ark., 2006; Eden ve ark., 1990; Asselin ve ark., 1999). Burada Thr15 ve Thr95 amino asitlerinin, enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu kalıntılar olduğu bildirilmiştir.



Şekil 2.7. *Escherichia coli* L-ASNaz'ın genel yapısı (Yun ve ark., 2007)

2.2. L-ASNaz kaynakları

L-ASNaz insanlar dışında çeşitli organizma, hayvan, bitki ve mikroorganizma kaynaklarından yaygın olarak saflaştırılmaktadır. L-ASNaz'ın bakteri, mantar, aktinomiset ve maya gibi mikroorganizmalardan kolay ve yüksek verimle izolasyonu birçok araştırmacının dikkatini çekmektedir.

Bakteriyel kaynaklar; bakteriyel L-ASNaz'lar tıp alanında araştırmacıların önemli derecede ilgi konusu olmuştur. ALL tedavisinde genellikle bakteriyel L-ASNaz'lar kullanılmaktadır. *Erwinia carotovora*'dan elde edilen L-ASNaz, antineoplastik aktivitesi ve toksisitesi benzer olmasına rağmen biyokimyasal olarak *Escherichia coli*'nin L-ASNaz'ından farklıdır (Borisova ve ark., 2003). *Pseudomonas flourescens*'den L-ASNaz üretimi Mardashevet ve arkadaşları (1975) tarafından rapor edilmiştir. *Mycobacterium*

phlei, Pastuszak ve arkadaşları (1976) tarafından iyi bir L-ASNaz kaynağı olarak bulunmuştur. *Staphylococci*'de L-ASNaz üretimi Mikucki ve arkadaşları (1977) tarafından tanımlanmıştır. Curran ve arkadaşları (1985), termofilik bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan daha ileri düzeyde karakterize edilmiş özel bir L-ASNaz elde etmiştir. *Thermus thermophilus*'tan elde edilen L-ASNaz'ın L-Glu'yu hidrolize etmediği Pritsa ve Kyriakidis (2001) tarafından bildirilmiştir. Borkotaky ve Bezbaruah (2000) tarafından yeni bir *Erwinia* türünden L-ASNaz tanımlanmıştır. Ayrıca L-ASNaz'ın, karasal ve deniz ortamındaki Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteri türlerinde varlığı rapor edilmiştir (Izadpanah ve ark., 2014). Gram-pozitif bakteriler Gram-negatiflere kıyasla daha az çalışılmıştır (Asthana ve Azmi, 2003). Hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif sınıfların daha yoğun çalışılmış türleri Çizelge 2.1'de listelenmiştir.

Çizelge 2.1. Bakteriyel L-ASNaz kaynakları

Bakteri		Referans
Gram-negatif	***Escherichia coli***	Netrval, 1977
	Erwinia cartovora	Maladkar ve ark., 1993
	Pseudomonas fluorescens	AIa ve ark., 1975
	Thermus aquaticus	Curran ve ark., 1985
	Thermus thermophiles	Pritsa ve Kyriakids, 2001
	Brevibacillus brevis	Narta ve ark., 2011
	Erwinia aroideae	Tiwari ve Dua, 1996
Gram-pozitif	***Mycobacterium phlei***	Pastuszak ve ark., 1976
	Staphylococcus	Mikuchi ve ark., 1977
	Bacillus circulans	Hymavathi ve ark., 2009
	Mycobacterium bovis	Wriston ve Yellin, 1973
	Bacillus	Mohapatra ve ark., 1995
	Streptococcus albus	Reddy, 1990
	Bacillus mesentericus	Tiul'panova ve ark., 1972

Gram-negatif bakterilerin çoğundan, tip I ve tip II olmak üzere iki tür L-ASNaz elde edilmektedir. Tip I L-ASNaz, hem L-Glu hem de L-Asn amino asitleri üzerinde enzimatik aktiviteye sahipken, tip II L-ASNaz L-Asn üzerinde yüksek spesifik aktiviteye sahiptir ve sadece anaerobik koşullarda aktive olur (Sanches ve ark., 2007). *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi*'den üretilen Tip II L-ASNaz, otuz yılı aşkın süredir ALL'nin etkili tedavisi için antitümör bir ajan olarak kullanılmaktadır (Borek ve Jaskólski, 2001). *Escherichia coli* ve *Erwinia carotovora* gibi iki bakteriyel kaynaktan elde edilen L-ASNaz, günümüzde ALL tedavisi için klinik uygulamada kullanılmaktadır (Narayana ve ark., 2008).

Maya ve mantar kaynakları; günümüzde yapılan araştırmalar, farklı mantar türlerinin ve mayaların L-ASNaz üreten potansiyel kaynaklar olduğu kanıtlanmıştır. İnsanlar bakterilere kıyasla mantarlarla daha çok benzerlik göstermektedir. Bu nedenle, mantardan elde edilen L-ASNaz'a karşı immünolojik reaksiyon olasılığı daha az olacaktır (Shrivastava ve ark., 2012). Yapılan çalışmalar, çeşitli L-ASNaz üreten mantarların varlığını ortaya koymaktadır (Çizelge 2.2). *Aspergillus tamarii* ve *Aspergillus terreus* olarak adlandırılan filamentli mantarların L-ASNaz üretebildiği bildirilmiştir (Sarquis ve ark., 2004, Baskar ve Renganathan, 2009). *Aspergillus terreus* tarafından en yüksek üretim seviyesi L-Pro varlığında gözlemlenmiş ve L-Pro'nun *Aspergillus terreus*'tan L-ASNaz üretimi için en iyi azot kaynağı olduğu bulunmuştur (Sarquis ve ark., 2004, Baskar ve Renganathan, 2009). Ayrıca, topraktaki *Penicillium*'dan antioksidan özelliklere sahip L-ASNaz üretimi bildirilmiştir (Kumar ve Verma, 2012).

Çizelge 2.2. L-ASNaz'ın mantar kaynakları

Mantar	**Referans**
Alternaria	Nagarajan ve ark., 2014
Aspergillus nidulans	Saxena ve Sınha, 1981
Aspergillus niger	Mishra, 2006
Aspergillus oryza	Hendriksen ve ark., 2009
Aspergillus tamarii	Sarquis ve ark., 2004
Aspergillus terreus	Baskar ve Renganathan, 2009
Cylidrocapron obtusisporum	Raha ve ark., 1990
Mucor	Mohapatra ve ark., 1997
Fusarium roseum	Nakahama ve ark., 1973

Mayalar üzerinde yürütülen çalışmalar sonucunda zararlı etkileri daha az olan L-ASNaz enzimleri rapor edilmiştir. *Saccharomyces, Candida, Pichia ve Rhodotorula* gibi maya türlerinden elde edilen L-ASNaz'ların antitümör aktivite sergilediği kanıtlanmıştır (Nagarethinam ve ark., 2012). L-ASNaz'ın maya kaynakları Çizelge 2.3'de rapor edilmiştir.

Çizelge 2.3. L-ASNaz'ın maya kaynakları

Maya	Referans
Candida utilis	Kil ve ark., 1995
Candida guilliermondii	Stepanyan ve Davtyan, 1998
Candida bombicola	Daverey ve Pakshirajan, 2010
Pichia polymorpha	Foda ve ark., 1980
Rhodosporidium toruloides	Ramakrishnan ve Joseph, 1996
Rhodotorula	Daverey ve Pakshirajan, 2010
Saccharomyces cerevisiae	Bon ve ark., 1997

Aktinomiset kaynakları; aktinomisetlerde de L-ASNaz üretimi gerçekleşmektedir (Balakrish-Nair ve ark., 1977). Aktinomisetler toprakta ve suda yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak sadece canlı hayvanlarda, özellikle de balıklarda bulunanların iyi enzimatik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (Dhevendaran ve Annie, 1999). Aynı zamanda, aktinomisetler bakteri ve mantarlara kıyasla daha iyi bir L-ASNaz kaynağıdır (Sahu ve ark., 2007). AbdelFatah ve ark. (1998), *Streptomyces longsporusflavus*'tan (F-15) hücre içi ve hücre dışı L-ASNaz üretimini tanımlamıştır. Tayland tıbbi bitkilerinin rizosfer topraklarından izole edilen *Actinomycetes*'in L-ASNaz aktivitesi olduğu bulunmuştur (Kumar ve Verma, 2012). Terapon jarbua ve Villorita cyprinoides balıklarının bağırsaklarından izole edilen *Streptomyces*, L-ASNaz aktivitesine sahiptir (Dhevendaran ve Anithakumari, 2002). L-ASNaz'ın aktinomiset kaynakları Çizelge 2.4'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. L-ASNaz üreten aktinomisetler

Aktinomiset	Referans
Actinomyces	Narayana ve ark., 2008
Streptomyces albidoflavus	Gupta ve ark., 2007
Streptomyces aurantiacus	Gupta ve ark., 2007
Streptomyces collinus	Mostafa ve Salama, 1979
Streptomyces griseus	Dejong, 1972
Streptomyces gulbargensis	Amena ve ark., 2010
Streptomyces karnatakensis	Mostafa, 1979
Streptomyces longsporusflavus	Abdel-Fattah ve Olama, 2002

*Bitki kaynakları; g*ünümüze kadar yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli bitki türlerinde önemli miktarlarda L-ASNaz aktivitesi tanımlanmıştır. Heeschen ve arkadaşları (1996)

tarafından bir yosun türü olan *Sphagnum fallax*'tan enzimin iki izoformu elde edilmiştir. Bitkiler arasında L-ASNaz enzimini kodlayan gen, sarı çalı acı bakla (*Lupin araboreus*) ve mavi acı bakla (*Lupin angustiplius*) bitki türlerinden izole edilmiştir (Boreket ve ark.,1999). Yeşil biber (*Capsicum annum L.*) ve demirhindi (*Tamarindus indica*) türlerinin L-ASNaz üretimi incelenmiş ve rapor edilmiştir. Bell ve Adams (2004) tarafından Batı Avustralya'da bulunan ektomikorizal mantarlara bağlı olarak sahil çamı (*Pinus pinaster*) ve monteri çamı (*Pinus radiata*) köklerinin toprağında da L-ASNaz aktivitesinin bulunduğu bildirilmiştir. Kutsal fesleğen'de (*Ocimum tenuiflorum*) L-ASNaz aktivitesi aranmıştır ve karakterizasyonu da yapılmıştır. Bir başka potansiyel L-ASNaz kaynağı olarak morsalkım (*Withania somnifera)* bitkisi rapor edilmiştir (Kumar ve Verma, 2012).

2.3. L-ASNaz enziminin uygulama alanları

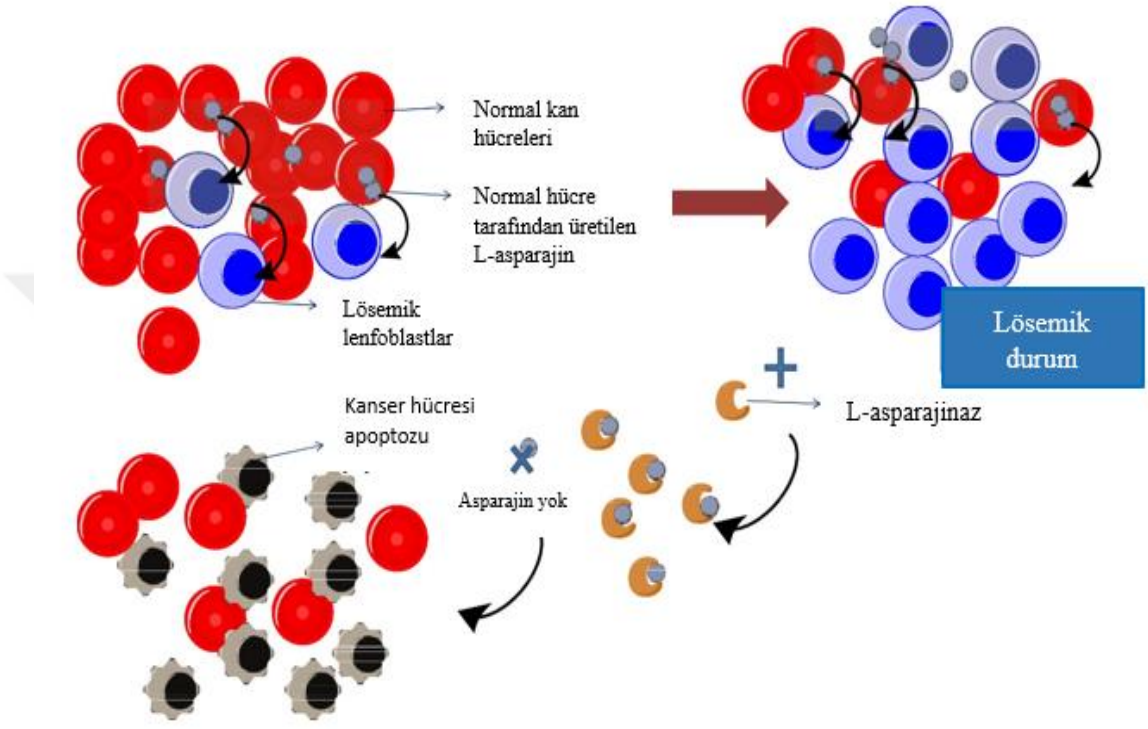
L-ASNaz, lizin, treonin ve metiyonin gibi amino asitlerin biyosentezinde hayati bir rol oynar. Krebs çevriminin yanı sıra, lizin ve treoninin doğrudan öncüsü olan aspartik asit de L-ASNaz enziminin katalizi ile oluşur (Sinha ve ark., 2013). Lizin amino asitinin biyosentezinde amonyak kullanılır. L-ASNaz'ın, L-Asn'yi parçalamasıyla açığa çıkan serbest amonyak lizin amino asidinin biyosentezinde kullanılabilir.

L-ASNaz, glutaminaz aktivitesine sahiptir. L-Glu, L-asparajin sentetaz varlığında L-Asp'nin L-Asn'ye dönüşmesini kolaylaştırmak için bir amino grubu sağlayıcı olarak hareket edebilir (Zhou ve ark., 2023). L-Glu'nun L-ASNaz tarafından hidrolizi, L-Asn seviyelerinin azalmasına katkıda bulunmaktadır (Zhou ve ark., 2023). Bu durum, L-ASNaz tedavisinin etkinliğini artırır. L-ASNaz kanser tedavisinde ve gıda endüstrisinde kullanılır.

2.3.1. Kanser tedavisi uygulamaları

L-ASNaz, Hodgkin hastalığı, akut miyelositik lösemi, kronik lenfositik lösemi, lenfosarkom, etikülosarkom ve melanosarkom gibi ALL hastalıklarının tedavisinde kemoterapötik bir ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Szymanska ve ark., 2012; Kidd, 1953). L-Asn, protein sentezlemesi ve hücre büyümesi için kullanılan birçok tümör hücresi için önemli bir amino asittir. Bununla birlikte, L-ASNaz'ın ana prensibi L-

Asn'yi L-Asp'ye dönüştürmektir; burada L-ASNaz varlığı kanser hücrelerinin besin alımını engelleyerek tümör hücrelerinin gelişimini durdurmakta ve böylece ölümüne yol açmaktadır (Şekil 2.9). L-ASNaz'ın kanser hücrelerindeki kemoterapötik etkisi Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



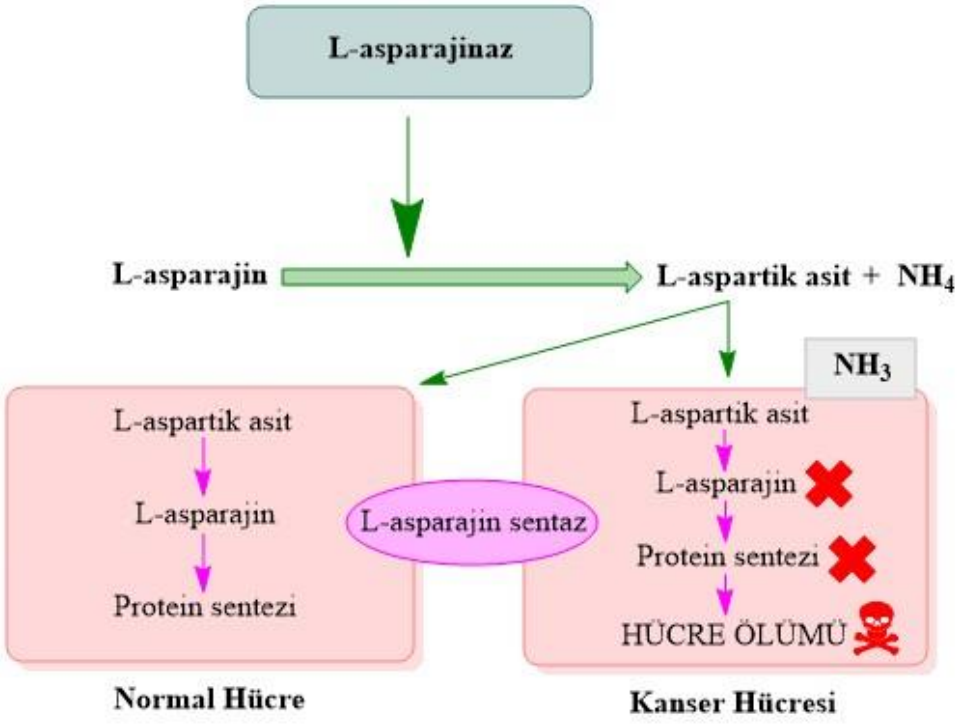
Şekil 2.8. Kanser hücrelerinde L-ASNaz sitotoksisitesinin şematik gösterimi (Shakambari ve ark., 2019)

L-ASNaz, hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunmaktadır. Ancak ALL tedavisinde çok etkili olması nedeniyle yalnızca *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilen L-ASNaz'ın kemoterapide kullanılması onaylanmıştır (Verma ve ark., 2012). Kidd'in 1953'te kobay serumunun farelerde derinin altında oluşturulan Gardner 6C3HED lenfosarkom hücrelerinin gelişimini engelleyebileceğini açıklaması, L-ASNaz'ın ALL tedavisinde etkin olarak kullanılabilmesi için yeni kapılar açmıştır (Kidd, 1953).

TNMK (Triple negatif meme kanseri) hücreleri, çok hızlı büyüme ve yayılma göstermeleri sebebiyle meme kanseri türleri içerisinde en agresifi olarak kabul edilir. TNMK hücreleri büyüme için L-Glu amino asidine ihtiyaç duymaktadır ve *Erwinia*

chrysanthemi'den saflaştırılan L-ASNaz'ın glutaminaz aktivitesi kullanılarak L-Glu amino asidinden yoksun bırakılmasının bu kanser hücrelerinin apoptozuna yol açtığı bulunmuştur. Böylece, TNMK hücrelerine karşı yeni bir biyolojik ilacın geliştirilmesine olanak verdiği söylenebilir (Mauro-Lizcano ve López-Rivas, 2018). Ekstranodal NK (Natural Killer)/T Hücreli Lenfoma ve Nazal tip NK/T-hücreli lenfoma geleneksel kemoterapiye dirençli olan oldukça saldırgan lenfoma türleridir. *In vitro* çalışmalar, L-ASNaz'ın normal NK hücrelerinin aktivitesini azaltabildiğini ve tümör NK hücrelerinde apoptozu tetikleyebildiğini göstermiştir (Obama ve ark., 2003). Takahashi ve arkadaşları (2017), L-ASNaz'ın klorokin ile birlikte glioblastoma hücrelerine karşı yüksek sitotoksisiteye sahip olduğunu tespit etmiştir.

Yapılan çalışmalar L-ASNaz'ın diğer hastalıkların tedavisinde de faydalı olabileceğini göstermektedir. Gaofu ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışma L-ASNaz'ın, damar sertliği (ateroskleroza) rahatsızlığına karşı yeni bir aşı geliştirilmesinin önünü açmaktadır.



Şekil 2.9. L-ASNaz'ın normal hücre ve kanser hücresi üzerine antineoplastik etkisinin şematik gösterimi

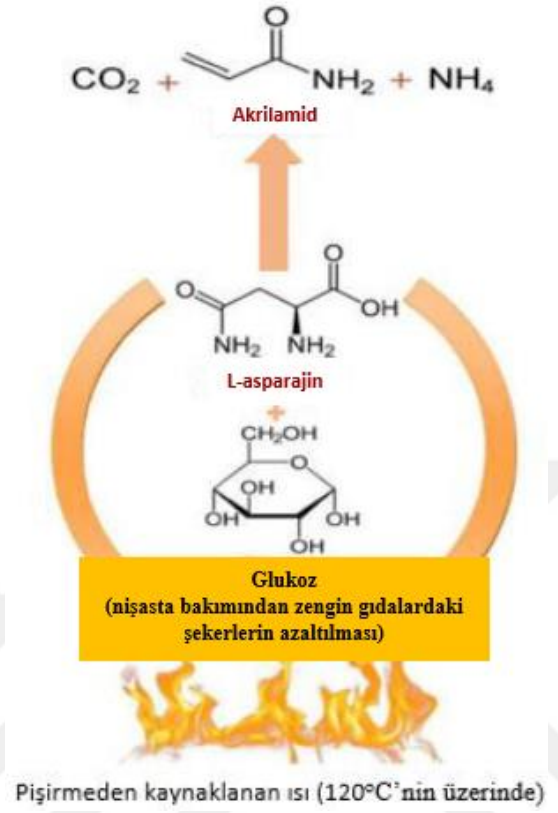
L-ASNaz kullanımı bazı yan etkilere neden olmaktadır. L-ASNaz antilösemik etkisine rağmen lösemik hastalar tarafından kullanıldığında normal hücrelerin de ölümüne neden

olabilmektedir. L-ASNaz; ödem, deri döküntüleri, ateş, karaciğer fonksiyon bozukluğu, diyabet, lökopeni, nörolojik nöbetler ve hemoraji gibi çok çeşitli semptomlara neden olabilir (El-Naggar ve ark., 2014; Duval ve ark., 2002). Moola ve arkadaşları (1994) bazı aşırı duyarlılık reaksiyonlarının, hafif alerjik reaksiyonların ve anafilaktik şokun da L-ASNaz temelli ilaçların kullanımından kaynaklandığını bildirmiştir. Öte yandan, ergenlik çağındaki insanlar L-ASNaz'ın neden olduğu nörotoksisite açısından daha yüksek risk altındadır. Bu durum depresyon, yorgunluk, uyuşukluk ve baş dönmesiyle sonuçlanmaktadır (Pochedly, 1977). L-ASNaz toksisitesinin, glutaminaz aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Howard ve Carpenter, 1972). L-ASNaz'ın etkisiyle bazı antineoplastik ajanlar aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olmaktadır (Kumar ve Verma, 2012).

2.3.2. Gıda endüstrisi uygulamaları

L-ASNaz'ın bir başka kullanım alanı ise gıda endüstrisidir. L-ASNaz enzimi gıdaların yüksek sıcaklıklarda işlenmesi ve özellikle kızartılmaları sonucu oluşan renksiz ve kokusuz kristal bir katı olan akrilamidin (2-propenamid) oluşumunu önler (Chheda ve Vernekar, 2015) (Şekil 2.10). Akrilamid oluşumu, Maillard reaksiyonu ile daha çok nişasta bakımından zengin gıdalarda meydana gelir (Zuo ve ark., 2015). L-ASNaz, L-Asn'yi L-Asp'ye dönüştürme kabiliyeti nedeniyle, nişastalı gıdalar ile ön işleme tabi tutularak tadı değiştirmeden kanserojen bir madde olan akrilamid oluşumunu azaltabilir (Pedreschi ve ark., 2008). Ancak, L-Asn'den bağımsız diğer etkenler nedeniyle akrilamidin tamamen ortadan kaldırılması mümkün değildir (Dhanam ve Kannan, 2013). İnsanlar için potansiyel bir kanserojen madde olan akrilamid oluşumunun önlenmesi çok önemlidir (Pennisi ve ark., 2013). L-ASNaz patates, ekmek, patates kızartması, kahve ve bisküvi gibi bazı gıda ürünlerindeki akrilamid seviyelerini azaltmak için kullanılmış ve bazı uygulamalarda akrilamid seviyelerinde %99'a varan önemli düşüşler görülmüştür (Zyzak ve ark., 2003; Mohan Kumar ve ark., 2014; Porto ve ark., 2019; Hendriksen ve ark., 2009; Zuo ve ark., 2015). Zyzak ve arkadaşları (2003) L-ASNaz'ın gıdaların yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi işleminden önce kullanıldığında akrilamidin nihai üründe %99'dan fazla azaldığını rapor etmiştir. Günümüzde gıda endüstrisinde kullanılan L-ASNaz, *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger* mantarlarından elde edilmektedir

(Morales ve ark., 2008). L-ASNaz ayrıca gıda endüstrisinde L-Asn seviyesini analiz etmek için bir biyosensörün geliştirilmesinde kullanılmıştır (Verma ve ark., 2012).



Şekil 2.10. Akrilamid oluşumunun şematik gösterimi (Batool ve ark., 2016)

2.4. Enzim immobilizasyonu

Enzimler, herhangi bir yapısal değişikliğe uğramadan reaksiyon hızını artıran çok yönlü katalizörlerdir ve çok karmaşık kimyasal süreçleri çevresel olarak güvenli koşullar altında katalizleyebilirler. Bu nedenle, endüstriyel uygulamalar için biyokatalizden yararlanma yönünde bir eğilim vardır.

"İmmobilize" terimi, hareketsiz hale getirme veya hareketin sınırlandırılması anlamına gelmektedir. İmmobilizasyon işlemi enzim, hücre vb. gibi yapılara uygulanabilir. Enzim immobilizasyonu, serbest enzimlerin katalitik aktivitesini kaybetmeden çözünmeyen katı bir destek materyali içine veya yüzeyine bağlanması ya da hapsedilmesi suretiyle enzimin hareketliliğinin kısıtlanması işlemidir (Garcia-Galan ve ark., 2011). Enzimleri tutma veya geri kazanma kapasitesi aynı biyokatalizörün üründen ayrılmasını sağlayarak sürekli proseslere izin verir ve protein veya aktivitenin sonraki proses adımlarına taşınmasını sağlar (Polizzi ve ark., 2007).

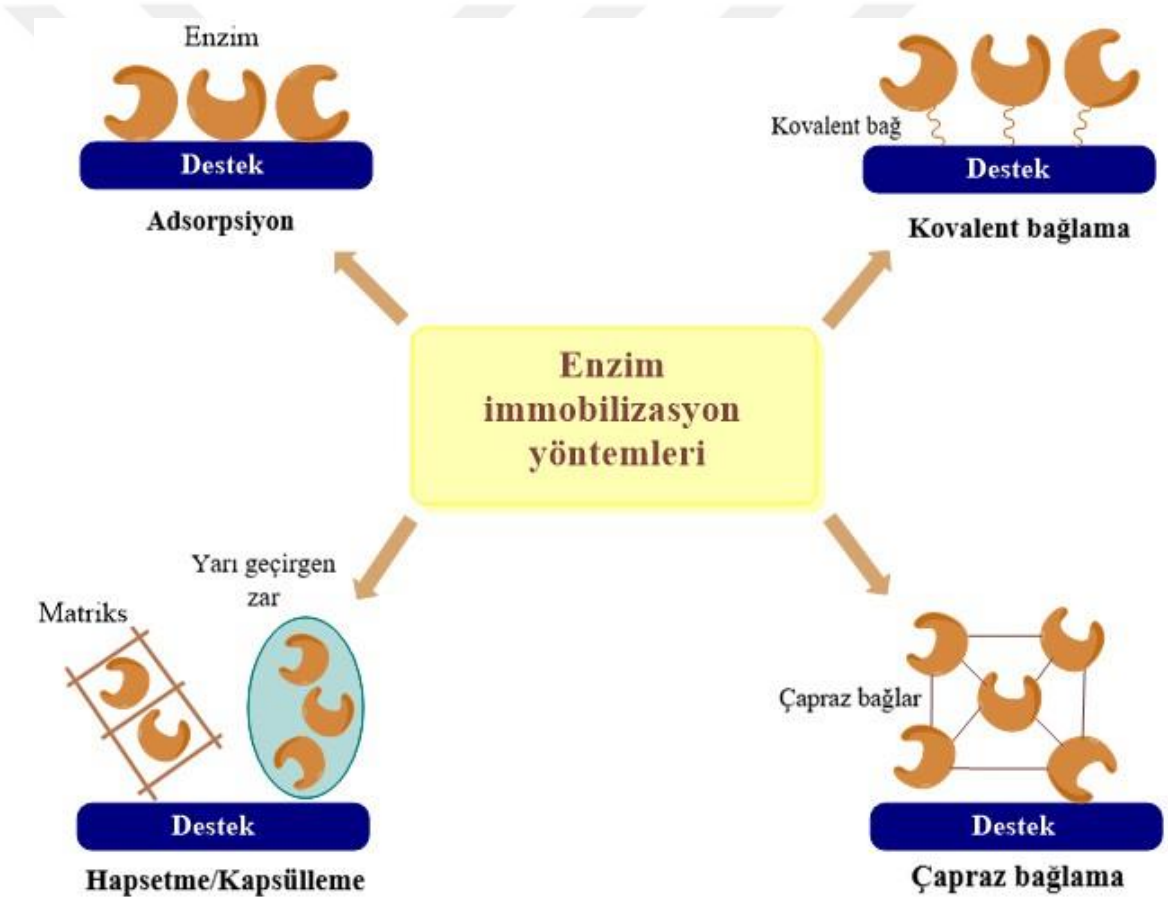
Enzimlerin sayısız avantajına rağmen bazı karakteristik özellikleri nedeniyle endüstriyel kullanımlarında sınırlamalar vardır. Bu özellikler genellikle fizyolojik olmayan koşullar altında düşük kararlılık, reaksiyon ürünleri tarafından inhibisyon, enzim reaksiyon süreçlerinden sonra enzimlerin ortamdan ayrılamaması, düşük geri kazanım ve yüksek maliyettir (Kim ve ark., 2006; Boros ve ark., 2013). Ayrıca enzimlerin üç boyutlu yapısı pH, iyonik şiddet, sıcaklık ve basınç gibi proses koşullarına bağlı olarak geri döndürülemez şekilde değişebilmektedir (Ivry ve ark., 2018). Bu nedenle enzimlerin sürekli proseslerde kullanılmasına olanak tanıyan geri kazanım ve yeniden kullanım immobilizasyonun en önemli hedefleridir. İmmobilize enzimler serbest forma kıyasla daha yüksek depolama kararlılığına, katalitik aktiviteye, seçiciliğe, pH ve termal kararlılığa sahiptir (Boros ve ark., 2013; Chen ve ark., 2008; Babaki ve ark., 2015). Ayrıca immobilize enzimler ürünün protein kontaminasyonunu da önlerler (Sheldon, 2007b; Garcia-Galan, 2011). Bu avantajlar immobilize enzimlerin farmasötik, ilaç metabolizması, gıda, kozmetik, atık su arıtma, tekstil, biyodizel üretimi gibi çok çeşitli alanlarda geniş çaplı kullanımına yol açmıştır. İmmobilize enzimin serbest enzime göre katalitik olarak daha verimli hale geldiği bazı uygulamalar vardır. Bazı durumlarda enzimin desteğe bağlanırken kazandığı stabilite ve/veya konformasyonel değişiklik aktif bölgeyi biyokataliz için daha uygun hale getirir (Mehta ve ark., 2016). Bu sayede reaksiyon süresinin kısılması ile biyoprosesin maliyetinin azalması mümkün olabilmektedir (Borges ve ark., 2014; Sheldon ve van Pelt, 2013). Ayrıca bazı durumlarda enzim immobilizasyonu reaktörün sürekli olarak çalıştırılmasına olanak sağlayarak biyoproses için daha fazla kâr sağlamaktadır (Gómez ve ark., 2012).

İmmobilizasyon prosedürleri için enzimin immobilize edileceği destek materyali çok önemlidir. Destek olarak kullanılan materyal kimyasal ve fiziksel kararlılığa sahip olmalıdır (Datta ve ark. 2013; Zdarta ve ark. 2018). Aynı zamanda destek materyallerinin gözenekli olması, fonksiyonel gruplara sahip olması ve toksik olmaması gibi özellikler de aranan diğer kriterler arasındadır (Rehm ve ark. 2016). Polimerik nanopartiküller ve mikroküreler, nötr polimerler ve inorganik malzemeler gibi taşıyıcılar enzim immobilizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır (Armstrong, 1933).

Enzim immobilizasyonunun geçmişine ve bilinen avantajlarına rağmen, Straathof ve arkadaşları (2002) biyokatalitik süreçlerin sadece %20'sinin immobilize enzimleri içerdiğini rapor etmektedir. Ancak son yıllarda literatürde enzim immobilizasyonunun heyecan verici yeni bir aşamaya girdiğini gösteren çok sayıda yeni gelişme rapor edilmiştir (Spahn ve Minteer, 2008).

2.4.1. İmmobilizasyon yöntemleri

Enzim immobilizasyonu enzimin ve destek malzemesinin arasındaki etkileşim şekline göre; fiziksel adsorpsiyon, hapsetme, kovalent bağlama ve çapraz bağlama yöntemleri ile gerçekleştirilebilir. Şekil 2.11'de bu yöntemler şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.11. Enzim immobilizasyonu için kullanılan yöntemler

2.4.1.1. Adsorpsiyon

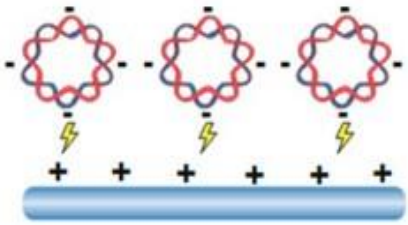
Adsorpsiyon enzimin destek maddesi üzerine, van der Waals etkileşimleri, hidrojen bağı, hidrofobik ve/veya elektrostatik çekim gibi tersinir etkileşimler ile bağlanarak

immobilize olmasını sağlayan fiziksel bir yöntemdir (Zhang ve ark., 2013). Taşıyıcı desteğin spesifik yüzey alanı, enzimin ne kadarının adsorplanacağını belirleyen önemli faktörlerden biridir.

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi enzim immobilizasyonu yöntemleri arasında en basit yöntemdir ve hafif koşullar altında gerçekleştirilir. Bu nedenle büyük ölçekli üretimde de sıklıkla kullanılır. Bu yöntem belirli bir süre inkübasyon ile hızlı bir şekilde gerçekleştirilir ve bu süreçte enzimlerin immobilizasyonu için bağlayıcı ek maddelere veya reaktiflere gerek yoktur. Kimyasal aktivasyon aşamasının olmaması enzimin yapısının değişmesini engeller ve enzim aktivitesinin korunmasını sağlar. Bu yöntemle protein, nükleik asit, polisakkarit, karbohidrat, sentetik maddeler ve daha birçok farklı türde bileşen immobilize edilebilir.

Adsorpsiyon yönteminin birçok avantajı olmasına rağmen bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bu yöntemle ilgili bir dezavantaj destek üzerine adsorbe edilen enzimin sıcaklık, pH, iyonik güç gibi parametrelere duyarlı olmasıdır. Bir diğer dezavantaj ise enzim ve destek arasındaki zayıf ve tersinir etkileşimler nedeniyle enzimin destek materyalinden kolayca ayrılabilmesidir (Zhang ve ark., 2013). Sızıntıyı en aza indirmek için destek malzemesinin gözenek boyutu gibi özelliklerin uygun olması ve spesifik enzim için en uygun ortam koşullarının belirlenmesi gereklidir.

Enzim ve destek yüzeyi üzerindeki zıt yüklü kalıntılar arasında elektrostatik etkileşimler varsa enzimlerin destek yüzeyine adsorpsiyonu arttırılabilir ve sızıntı en aza indirilebilir (Şekil 2.12). Enzim yüzeyi ve destek yüzeyi üzerindeki toplam yük çözeltinin pH'ı değiştirilerek kontrol edilebilir. Bununla birlikte, enzim molekülleri esnektir ve bir destek yüzeyinin yakınındaki net yük, destek materyalinin net yükü ile aynı olsa bile birbirleriyle elektrostatik etkileşime girebilecek bir konformasyonu benimseyebilirler. Örneğin, enzimlerin pI değerlerinin çok üzerinde pozitif yüklü yüzeylere kolayca adsorbe oldukları bilinmektedir (Matuszewska ve ark., 1981; Lyklema, 1984).



Şekil 2.12. Enzim moleküllerinin destek materyali ile elektrostatik etkileşimi (Maghraby ve ark., 2023)

İyonik etkileşim tekniğinde kullanılan destek materyalleri genellikle yüklüdür. Çünkü proteinlerin birbirine bağlanabilmesi için zıt yüklere sahip olmaları gerekir (Brena ve ark., 2013). İyonik etkileşim pH değiştirilerek veya enzim çözeltilerinin iyonik şiddeti artırılarak basitçe tersine çevrilebilir. Enzimin immobilize edildiği destek sürekli yüklü olduğundan, karışımdaki asitlik/alkaliliğin kontrolü kolayca sağlanabilir ve böylece reaksiyon boyunca optimum pH değeri korunur (Brena ve ark., 2013). Yüklü bir desteğin oluşması enzim yapısının bozulması ve enzim kinetiğinde değişiklikler gibi bazı sorunları beraberinde getirmektedir. Bunun yanı sıra aşırı yüklenme enzimatik katalizi bozabilir ve bu da yüksek verimli ürün elde edilmesini engelleyebilir (Guisan, 2013).

Adsorpsiyon yönteminde her türlü taşıyıcı malzeme kullanılabilir, ancak her enzim herhangi bir taşıyıcı malzeme üzerine immobilize edilemez. Çünkü uygun bir adsorpsiyonun gerçekleşmesi için bazı koşulların karşılanması gerekir; Bu durum enzim-destek materyali afinitesinin önemini göstermektedir (Wong ve ark., 2008). Adsorpsiyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi destek malzemesi üzerinde bulunan spesifik aktif grupların varlığına bağlıdır. Destek üzerinde spesifik aktif gruplar mevcut değilse enzimler ve taşıyıcılar arasındaki bağlantıları sağlayan taşıyıcı modifikatörler eklenerek etkileşim sağlanabilir (Jesionowski ve ark., 2014).

Enzim adsorpsiyonunda çok sayıda yüzey aktif malzeme kullanılmıştır. En çok kullanılanlar anyon ve katyon değiştirici reçineler, aktif kömür, silika jel, diatoma toprağı ve kil, kontrol edilebilir gözenekli alümina camlar ve seramiklerdir (Zaborsky, 1973).

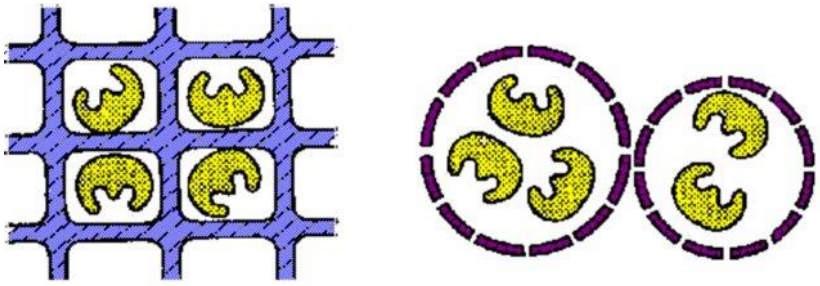
Genel olarak adsorpsiyon yöntemiyle gerçekleştirilen enzim immobilizasyonunda kullanılan destek materyalleri organik ve inorganik kökenli olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. En yaygın kullanılan inorganik taşıyıcıların silikalar ve titanyalar (örneğin

TiO_2) olduğu bilinmektedir. Buna karşılık organik taşıyıcılar; kitin, kitosan, selüloz ve aljinat gibi doğal kökenli bileşikleri ve çoğunlukla polimerler olmak üzere sentetik bileşikleri içermektedir. Bu destek materyallerinin avantajı, koşullara göre belirli bir enzim ve uygulaması için kimyasal olarak kolayca modifiye edilebilmeleridir (Jesionowski ve ark., 2014).

2.4.1.2. Tutuklama

Tutuklama ile immobilizasyon yönteminde enzim doğrudan destek maddesinin yüzeyine bağlanmaz. Enzim sadece substrat ve ürünlerin destek materyaline giriş çıkışına izin veren ve enzimlerin difüzyonunu önleyen ve aynı zamanda enzim aktivitesini koruyan bir polimerik malzemenin içerisine hapsedilir (Şekil 2.13). Burada enzim polimer malzeme ile kimyasal olarak etkileşime girmez. Bu yöntem enzimin bir monomer çözeltisine karıştırılması ve sonrasında monomerler arasında kimyasal reaksiyonunun meydana gelmesiyle iki adımda gerçekleştirilir (Zhang ve ark., 2013).

Tutuklama (hapsetme veya kapsülleme), çevreyle doğrudan teması önleyerek enzimleri korur. Böylece gaz kabarcıklarının, mekanik sertliğin ve hidrofobik çözücülerin etkilerini en aza indirir. Ancak düşük enzim yüklemesi gibi bir dezavantaja sahiptir (Lalonde ve Margolin, 2002). Bu yöntem, enzimlerin agregasyonunu önlemek için potansiyel olarak gerçekçi bir çözümdür. Aynı zamanda enzim sızmasını ve denatürasyonunu azaltır ve maliyeti düşürür. Bu yöntemin dezavantajlarından biri immobilizasyon veriminin düşük olması ve polimerizasyonun etkileri nedeniyle destek materyalinin parçalanabilir olmasıdır (Zhang ve ark., 2013).

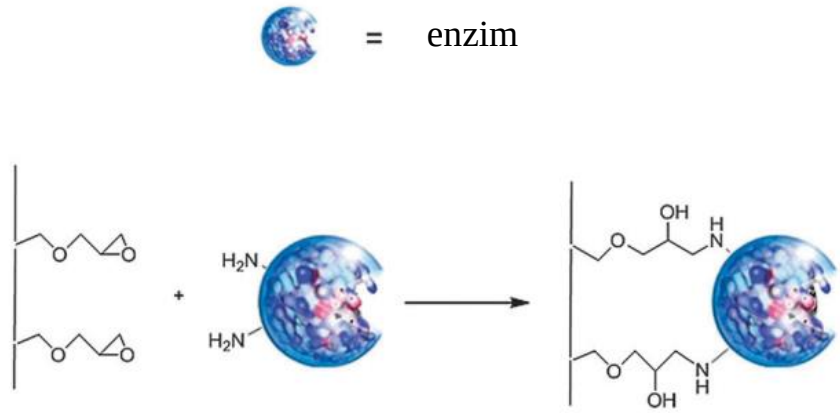


Şekil 2.13. Enzim moleküllerinin hapsetme/kapsülleme yoluyla immobilizasyonu (Homaei, 2015)

2.4.1.3. Kovalent bağlama

Kovalent bağlama ile immobilizasyon yönteminde enzim, destek maddesi üzerinde bulunan fonksiyonel gruplara kovalent bağ ile bağlanır (Şekil 2.14) (Cirillo ve ark., 2014). Amino, karboksil, imidazol ve fenolik hidroksil grupları kovalent bağların oluşumu için tercih edilir (D'souza, 1999). Bu yöntem genel olarak, destek malzemesinin reaktif ile aktivasyonu ve malzemenin enzime bağlanması olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilir. İmmobilizasyon reaksiyonu, enzimin aktif konformasyonunu bozmamak için hafif koşullar altında gerçekleştirilmelidir.

Yöntemin en önemli avantajlarından biri, enzimin destek materyaline kovalent olarak bağlanması nedeniyle enzim sızmasının önlenmesidir (Mohamad ve ark., 2015). Bununla birlikte bu yöntemin dezavantajı, immobilizasyon sırasında enzimin konformasyonel değişime uğraması ve aktivitenin bir kısmının kaybolmasıdır. Kovalent bağlanmanın aktif bölgenin önemli bir kısmı ile gerçekleşmesi durumunda enzim aktif konformasyonun bozulmasıdır (Tran ve Balkus, 2011).

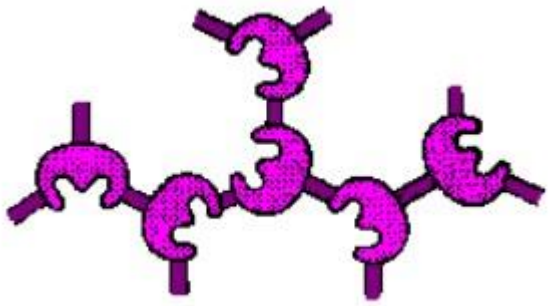


Şekil 2.14. Bir enzimin işlevselleştirilmiş desteğe kovalent bağlanması (Sheldon ve van Pelt, 2013)

2.4.1.4. Çapraz bağlama

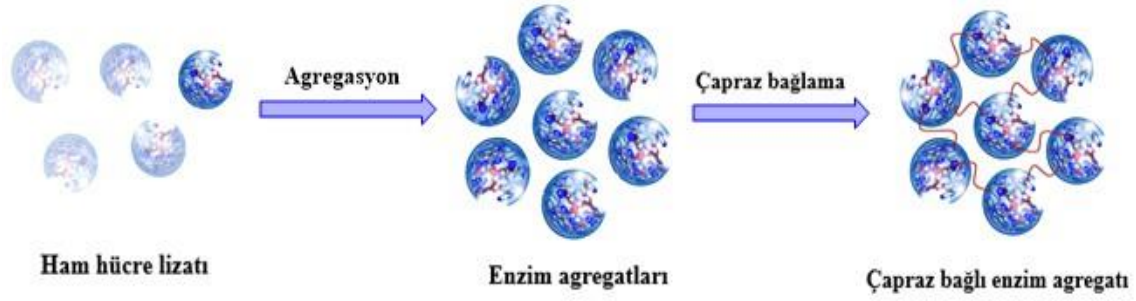
Çapraz bağlama yoluyla immobilizasyon, moleküller arası çapraz bağların oluşmasına dayanan geri dönüşümsüz bir yöntemdir ve bu yöntem 1960 yılında kullanılmaya başlanmıştır (Şekil 2.15). Glutaraldehit gibi çok işlevli bir reaktifin ortama eklenmesiyle çapraz bağlar elde edilir. Enzimlerin immobilizasyonu, enzimin çözünmeyen destek malzemelerinin fonksiyonel gruplarına veya protein moleküllerine kovalent bağlarla

çapraz bağlanmasıyla geliştirilmiştir (Cabral ve Kennedy, 1991). Öte yandan, glutaraldehit kullanımı enzimde modifikasyonlara neden olabilir ve enzimi konformasyonel değişime uğratarak aktivite kaybına yol açabilir (Cabral ve Kennedy, 1991).



Şekil 2.15. Çapraz bağlama yönteminin gösterimi (Homaei, 2015)

1990'ların başında Altus Biyoloji, endüstriyel biyokatalizörler olarak çapraz bağlı enzim kristallerinin (CLEC'ler) kullanımını tanıtmıştır (Margolin ve Navia, 2001). Bu yöntem çok geniş uygulama alanına sahiptir. CLEC'ler yüksek üretkenlik, kolay geri kazanım, tekrar kullanım ile birlikte mükemmel seviyede stabilite ve kontrol edilebilir partikül boyutu sergileyerek, endüstriyel biyokatalizör uygulamaları için kullanışlı hale gelmiştir. CLEC yöntemi aslında enzim saflaştırmasını ve immobilizasyonunu tek bir işlemde birleştirmektedir. Bu da, CLEC'in ara işleme veya saflaştırmaya gerek kalmadan ham hücre lizatından uygun maliyetli bir şekilde üretilmesini sağlar. CLEC teknolojisi çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Çeşitli kimyasalların üretiminde kullanılan beş enzim sınıfından (hidrolazlar, oksidoredüktazlar, liyazlar, transferazlar ve izomerazlar) sayısız enzimin immobilizasyonunda başarıyla uygulanmıştır ve gün geçtikçe çok sayıda araştırmanın konusu olmuştur (Sheldon, 2007a; Sheldon, 2011a; Sheldon, 2011b; Yamaguchi ve ark., 2018). Çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanışı Şekil 2.16'da gösterilmiştir.

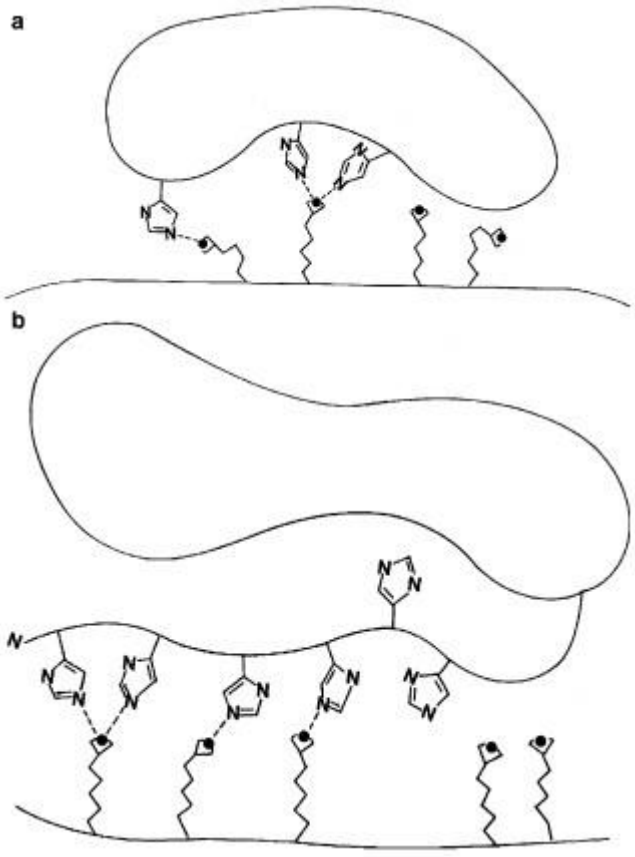


Şekil 2.16. Çapraz bağlı enzim agregatlarının hazırlanışı

2.4.1.5. Metal-şelat immobilizasyonu

Şelasyon, prensibi temel olarak ayırma ve saflaştırmaya dayanan fiziksel bir immobilizasyon yöntemidir. Şelasyon bir ligandın mevcut iyonlarını veya moleküllerini asiklik veya halka benzeri bir koordinasyon bağı yoluyla merkezi bir metal atomuna veya iyonuna bağlama işlemidir. Ligand, kovalent bir bağ oluşturmak için kolayca iki elektron bağışlayabilen iki veya daha fazla atomlu bir molekül veya iyon olabilir. Metal iyonları enzimin yüklü amino asitleriyle koordine kovalent bağ oluşturur.

Helfferich tarafından 1961 yılında küçük moleküllerin ayrılması için kullanılan ligand değişim kromatografisinin (LEC) özel bir durumu olarak kabul edilen immobilize metal iyon afinite kromatografisi (IMAC), 1975 yılında Porath ve arkadaşları tarafından metal şelat afinite kromatografisi adı altında uygulamaya konulmuştur (Helfferich, 1961; Porath ve ark., 1975). İlk çalışmalarında Porath ve arkadaşları, immobilize metal iyonlarına karşı farklı afinitelerine dayalı olarak katı destekler üzerinde proteinleri ayırma yöntemlerini denemişlerdir. IMAC proteinlerin immobilize metal iyonlarına olan farklı afinitelerini kullanarak ayrılmalarını sağlayan bir ayırma prensibidir. Afinite, metal iyonları ile protein moleküllerinin yüzeyinde açığa çıkan belirli amino asit yan zincirleri arasında oluşan koordinasyon bağlarından kaynaklanmaktadır. İmmobilize metal iyonları ve amino asitlerin yan zincirleri arasındaki etkileşim kolayca tersine çevrilebilir bir karaktere sahip olduğundan, adsorpsiyon için kullanılabilir ve daha sonra hafif koşullar kullanılarak bozulabilir. Şekil 2.17 'de metal şelatlı bir afinite desteğine protein bağlanması gösterilmektedir.



Şekil 2.17. Metal şelatlı bir afinite desteğine bağlanan proteinin şematik gösterimi. Bir proteinin IMAC matrisine güçlü bir şekilde bağlanması, doğal veya tasarlanmış yüzey histidinlerinin çok noktalı bağlanmasıyla (a) veya proteinin N veya C terminaline eklenen histidin etiketi (b) ile sağlanır (Porath ve ark., 1975).

En yaygın olarak kullanılan metal iyonları, Lewis asitleri olarak düşünülebilen ve elektron çifti alıcısı olan Cu(II), Ni(II), Zn(II), Co(II), Fe(III) geçiş metali iyonlarıdır. Kromatografik desteğe bağlanan şelatlama bileşiklerinde bulunan donör atomları (N, S, O) metal iyonlarını koordine edebilir ve kullanılan koordinasyon bağlarının sayısına bağlı olarak metal şelatlar oluşturabilir. Diğer metal koordinasyon bölgeleri normalde su molekülleri tarafından doldurulur ve proteinden uygun elektron verici gruplarla değiştirilebilir. Amino-terminale ek olarak, bazı amino asitler yan zincirlerindeki elektron verici atomlar nedeniyle bağlanma için özellikle uygundur. Glu, Asp, Tyr, Cys, His, Arg, Lys ve Met gibi birçok kalıntı bağlanmaya katılabilse de, IMAC'de gerçek protein tutulması öncelikle histidin kalıntılarının varlığına dayanır. Şelatlı metal iyonlarına bağlanmaya da katkıda bulunabilecek serbest sisteinler nadiren uygun indirgenmiş durumda bulunur. Bununla birlikte, Trp, Phe ve Tyr amino asitlerinin aromatik yan

zincirleri histidin kalıntılarının yakınındaysa tutunmaya katkıda bulunuyor gibi görünmektedir (Arnold, 1991; Sulkowski, 1989).

Şelat tekniği ağırlıklı olarak tıp, gıda ve kozmetik alanlarında uygulanmıştır (Bai ve ark., 2020). Metal-şelasyon tekniği, küçük bir peptit etiketine dayalı basit ve seçici bir etiketleme için uygulanabilir, bu nedenle enzimatik etiketleme tekniğinin yanı sıra protein etiketleme için en kullanışlı tekniklerden biri olarak kabul edilir (Gulcin ve Alwasel, 2022).

Bu yöntemde, metal iyonları enzimin aktif bölgesine bağlanarak enzim-substrat etkileşimini bozabilir. Metal iyonlarının, enzim yapılarına bağlanması, aktif bölgenin yapısal bütünlüğünü değiştirebilir veya enzimde konformasyonel değişikliklere yol açabilir. Bu da substratın aktif bölgeye erişimini engelleyerek enzim aktivitesinde belirgin bir azalmaya neden olur. Sonuç olarak, enzim işlevini yerine getiremeyecek hale gelir veya verimliliği düşer, bu da biyokimyasal reaksiyonların hızını olumsuz etkileyebilir.

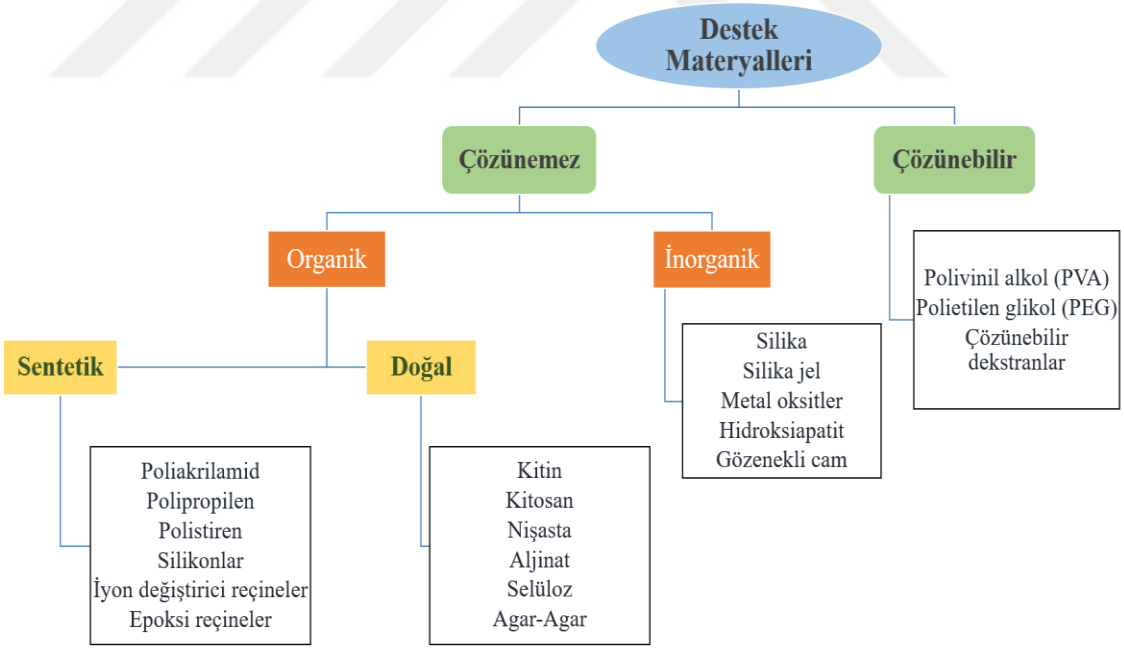
2.4.2. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri

İmmobilizasyon işlemini gerçekleştirmek için bir destek materyaline ihtiyaç vardır. Destek materyalinin seçimi enzim immobilizasyonunda elzemdir çünkü destek materyali immobilize enzimin performansının ve veriminin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Destek materyalininin seçimi esnasında kimyasal ve fiziksel yapısı, gözenek boyutu ve mekanik özellikleri dikkate alınır (Miletić ve ark., 2012; Blanco ve ark., 2004; Mateo ve ark., 2007). Destek üzerindeki fonksiyonel grupların varlığı immobilizasyon işleminde enzimin destek materyaline bağlanmasını ve yüzey modifikasyonunu kolaylaştırır. Aynı zamanda destek materyalinin kimyasal olarak kararlı bir yapıya sahip olması gerekir. Destek materyalinin gözenek boyutunun büyük olması enzimlerin agregasyonuna yol açarak aktivitenin düşmesine sebep olabilir. Gözenek boyutunun küçük olması durumunda ise difüzyonel sınırlamalar nedeniyle enzim aktivitesi düşük olabilir. Aynı zamanda destek materyali düşük maliyetli, çevre dostu ve kolay erişilebilir olmalıdır.

Destek materyalleri organik ve inorganik olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Organik destek materyalleri doğal ya da sentetik olabilir. Özellikle doğal kaynaklardan elde edilen

polimer yapılı destek materyalleri enzimlerle çok iyi uyumluluk gösterir. Bu destek malzemeleri hidrofilik olduklarından enzimlerle sadece zayıf bağlanmalar gösterir, ayrıca bu malzemelerin mekanik kararlılığı geliştirilmelidir (Miletić ve ark., 2012). Destek malzemesi olarak; selüloz, agaroz, aljinat ve kitosan gibi polisakkaritler ve protein olan albümin gibi doğal polimerler kullanılabilirken; polistiren, poliakrilamid ve polimetakrilatlar gibi sentetik polimerler de destek malzemesi olarak kullanılabilir (Guisan, 2013).

Organik destek malzemelerine kıyasla inorganik destekler daha iyi kararlılığa sahiptir. Metaller, silika ve silika türevleri yaygın olarak kullanılan bazı inorganik destek malzemeleridir (Guisan, 2013; Miletić ve ark., 2012). Silika bazlı malzemeler ve diğer inorganik destek malzemeleri, küçük gözenek boyutlarına (~8 nm) sahiptir. Bu nedenle küçük boyutlu enzimlerin gözeneklere girmesine izin verirken, daha büyük enzimlerin destek malzemesinin yüzeyinde kalmasına neden olurlar (Blanco ve ark., 2004). Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyallari Şekil 2.18'de sınıflandırılmıştır.



Şekil 2.18. Enzim immobilizasyonu için kullanılan destek materyalleri

Araştırmacılar immobilize enzimler için kullanılacak materyalleri geliştirmek ve yeni materyaller bulmak için kapsamlı çalışmalar yapmaya devam etmektedir. Son zamanlarda istenen özelliklere sahip yeni malzemeler hazırlamanın ve kullanmanın önemi oldukça

artmıştır. Aynı zamanda destek malzemelerinin ayarlanabilir boyutlara sahip çok çeşitli şekillerde üretilebilir olması, bu malzemeleri enzimlerle kullanım için ideal hale getirmektedir.

2.5. L-ASNaz immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar

Vina ve arkadaşları (2001), *Zymomonas mobilis*'ten elde edilen 75 ve 2000 kDa moleküler kütleli biyolojik olarak aktif fruktoz polimeri levanayı, *Erwinia carotovora*'dan elde edilen L-ASNaz'ın kovalent immobilizasyonu için destek materyali olarak kullanmıştır. Enzimin immobilizasyonu için kullanılan yöntem, polisakkaritin periodat oksidasyonunu ve ardından redüktif alkilasyonunu içermektedir. Levanın hafif bir periodat oksidasyonu, en yüksek enzim aktivitesiyle sonuçlanmıştır (yaklaşık %55). Glikokonjugatların *Km* değeri serbest L-ASNaz'ın *Km* değerinden daha yüksek bulunmuştur. L-ASNaz konjugasyonu enzimin optimum pH aralığını genişletmiştir. Elde edilen glikokonjugatların poliakrilamid jeldeki elektroforetik hareketliliği doğal L-ASNaz ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmıştır. İmmobilize L-ASNaz'ın doğal enzime kıyasla artan sıcaklık (40°C ve 50°C) ve depolama (1 ay) kararlılığına sahip olduğu belirlenmiştir.

Ghosh ve ark. (2012), destek materyali olarak polianilin nannanofiberi kullanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları X-Işını Fotoelektron spektroskopi (XPS), X-Işını Kırınım (XRD), TEM ve FTIR teknikleri ile yapılmış nanofiber konformasyonlarının enzimatik aktivite üzerindeki etkisi ayrıntılı olarak tartışılmıştır. İmmobilize L-ASNaz serbest enzime kıyasla farklı sıcaklık ve pH koşullarında daha yüksek kararlılık sergilemiştir. İmmobilize L-ASNaz ve serbest L-ASNaz için hesaplanan *Km* değerleri sırasıyla 1.809 ve 3.705 mM olup, serbest L-ASNaz için elde edilen değere kıyasla 2.05 kat daha düşüktür. İmmobilize ve serbest enzim için *Vmax* değerleri sırasıyla 90.57 ve 48.04 μmol/dk 'dır.

Ulu ve ark. (2015) 2-hidroksietil metakrilat ve farklı oranlarda nişastadan poli(2-hidroksietil metakrilat) (pHEMA) ve poli(2-hidroksietil metakrilat)-nişasta (pHEMA-S) kompozitleri hazırlamıştır. pHEMA-S yüksek termal kararlılık ve biyolojik bozunabilirlik göstermiştir. pHEMA-S kompozitlerinin biyolojik bozunabilirliği, pHEMA-S'nin nişasta oranına bağlı olarak 4 hafta boyunca %14-22 aralığında

bulunmuştur. L-ASNaz başlatıcı olarak potasyum persülfat varlığında HEMA ve farklı oranlarda nişastadan emülsiyon polimerizasyonu ile hazırlanan, biyolojik olarak parçalanabilir pHEMA-S kompozit mateyali üzerine başarıyla immobilize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 8,5 ve 45-50°C olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, immobilize L-ASNaz'ın yüksek pH ve sıcaklıklarda daha kararlı olduğu belirlenmiştir. *Km* değerleri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 1.58 ve 0.56 mM'dır. *Vmax* değerleri serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 5882 ve 3610 U/mg olarak belirlenmiştir.

Ulu ve ark. (2016) poli(metakrilik asit-ko-metil metakrilat)-nişasta [P(MAA-co-MMA)-S] kompozitini L-ASNaz'ın immobilizasyonu için destek materyali olarak kullanmıştır. P(MAA-co-MMA) kopolimeri emülsiyon polimerizasyonu yoluyla hazırlanmıştır. P(MAA:7-co-MMA:3) içerisine farklı oranlarda nişasta ilave edilmiş ve enzim immobilizasyonu için destek materyali olarak P(MAA:7-co-MMA:3)-S-%5 seçilmiştir. Tüm numuneler yapısal, termal ve morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Ayrıca, L-ASNaz'ın P(MAA:7-co-MMA:3)-S-5% üzerine başarılı bir şekilde immobilizasyonu SEM, EDX ve EDX analizleri ile karakterize edilmiştir. İmmobilize enzimin farklı pH ve sıcaklıklarda serbest enzimden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. İmmobilize enzim ve substrat (L-Asn) arasındaki afinite, serbest enzime kıyasla belirgin bir şekilde artmıştır. İmmobilize enzimin *Km* değerinin serbest enzime kıyasla ~8.0 kattan daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca immobilize L-ASNaz iyi bir depolama kararlılığı sergilemiştir. Sonuçlar immobilize enzimin 25°C'de 30 gün depolandıktan sonra başlangıç aktivitesinin %60'ını koruduğunu göstermiştir. Sitotoksisite testleri sentezlenen P(MAA:7-co-MMA:3)-S-5% kompozitinin toksik olmadığını kanıtlamıştır.

Bahraman ve Alemzadeh (2017) tarafından yapılan çalışmada, *Escherichia coli* ATCC 11303'ten elde edilen L-ASNaz enzimi mikroenkapsülasyon tekniği ile polimerik kalsiyum aljinat boncuklara immobilize edilmiştir. Yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak yüksek bir immobilize L-ASNaz aktivitesi elde etmek için sodyum aljinat derişimi, kalsiyum klorür derişimi ve enzim yükleme miktarı araştırılmıştır. Çalışılan faktörlerin immobilizasyon üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Model tarafından tahmin edilen değerler deneysel değerlere yakın olup modelin uygunluğunu göstermektedir. Çalışmada elde edilen sonuçlar sodyum aljinat derişimindeki artışın

verilen herhangi bir kalsiyum klorür derişiminde immobilize L-ASNaz'ın aktivitesini artırdığını ve orta miktarda enzim yüklemesinin aktivitesini artırdığını göstermiştir. Optimum immobilizasyon koşulları sodyum aljinat derişimi %1,98 (w/v), kalsiyum klorür derişimi %3,70 (w/v) ve enzim yükü %46,91 (v/v) olarak belirlenmiştir. Elde edilen en yüksek L-ASNaz aktivitesi %34.49'dur.

Monajati ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada, destek materyali olarak kullanılan grafen oksit (GO) L-aspartik asit (GO-Asp) ile modifiye edilmiş ve üzerine kimyasal bağlanma ile L-ASNaz immobilize edilmiştir. Kovalent immobilizasyonda immobilizasyon verimi %100 bulunmuştur. Kovalent olarak immobilize edilen L-ASNaz için 20°C, 40°C ve 60°C'de 24 saat inkübasyondan sonra sırasıyla %100, %90,5 ve %40,6 aktivite geri kazanımı elde edilmiştir. pH 8,0'de serbest enzime göre daha yüksek enzim aktivitesi gözlenmiştir. GO-Asp üzerine kovalent olarak immobilize edilen L-ASNaz enziminin, 60°C'de sekiz defa tekrar kullanım sonrasında aktivitesinin %42'sini koruduğu belirlenmiştir. İmmobilize ve serbest enzimin kinetik parametreleri hesaplanmıştır. Sonuçlar kovalent bağlanma yoluyla enzim afinitesinde önemli bir değişiklik olmadığını göstermiştir.

Haroun ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, farklı mantarlardan saflaştırılan L-ASNaz enzimi fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile oksitlenmiş çok duvarlı karbon nanotüpler (ox-MWCNT) üzerine immobilize edilmiştir ve immobilizasyon verimi %54,4 bulunmuştur. Çalışmada ayrıca L-ASNaz'ın normal fibroblast hücre hattına (BHK-21) karşı *in vitro* sitotoksisitesi Sülforhodamin B (SRB) testi kullanılarak immobilize L-ASNaz ile karşılaştırılmıştır. Çalışılan on mantar arasında *Aspergillus versicolor*'dan elde edilen L-ASNaz yaklaşık 45,5 U/mL aktivite ile maksimum aktivite gösteren enzim olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre en uygun koşulların 0,04 M L-Asn derişimi ve pH 8,0 olduğu belirlenmiştir. İmmobilize L-ASNaz serbest enzime göre 30 dakika 45°C'de inkübasyondan sonra aktivitesini %100 korumuştur. Ayrıca immobilize L ASNaz serbest enzime göre yüksek sıcaklıkta iyi bir depolama kararlılığı ve stabilite sergilemiştir. L-ASNaz'ın toksisitesi MWCNT'ler üzerine immobilizasyondan sonra önemli ölçüde azalmıştır.

Orhan ve Uygun (2020) destek materyali olarak ortalama 117.5 nm partikül boyutuna sahip manyetik poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat) [poli(HEMA-GMA)] nanopartiküller sentezlemiş ve L-ASNaz immobilizasyonunda kullanmıştır. Destek üzerine bağlanan L-ASNaz miktarı 66,43 mg/g nanopartikül olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize L-ASNaz için optimum pH sırasıyla 7,5 ve 6,5 olarak bulunmuştur. Serbest L-ASNaz'ın optimum sıcaklığı 45°C iken, manyetik nanopartiküller üzerine immobilizasyondan sonra optimum sıcaklık 55°C'ye yükselmiştir. Bu sonuç immobilizasyon sonrası enzimin kararlılığının arttığını göstermektedir. Ayrıca, serbest L-ASNaz'ın *Kcat* değerinin (47.356 dk^{-1}) immobilize L-ASNaz'dan (497 dk^{-1}) daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzimin termal stabilitesi 10 saat boyunca takip edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda serbest L-ASNaz aktivitesini neredeyse tamamen kaybolurken, immobilize L-ASNaz başlangıçtaki aktivitesinin %50'sini korumuştur. Serbest ve immobilize L-ASNaz'ın depolama stabiliteleri de araştırılmıştır ve 40 günlük depolama sonunda serbest L-ASNaz tüm aktivitesini kaybederken, immobilize L-ASNaz aktivitesinin %30'unu korumuştur. İmmobilize L-ASNaz 8 defa tekrar kullanımdan sonra başlangıçtaki aktivitesinin sadece %15'ini kaybetmiştir. Bu çalışmada, *in vivo* etkinliği öngörmek için serbest ve immobilize L-ASNaz'ın aktiviteleri yapay insan serumu ortamında test edilmiş ve immobilize L-ASNaz'ın başlangıçtaki aktivitesinin %74,74'ünü koruduğu gösterilmiştir.

Noma ve ark. (2020) tarafından asidik ve bazik modifiye partiküllerin L-ASNaz immobilizasyonundaki etkisini incelemek amacıyla amino ($Fe_3O_4/SiO_2/NH_2$) ve karboksil ile fonksiyonelleştirilmiş ($Fe_3O_4/SiO_2/COOH$) partiküller hazırlanmıştır. Optimum koşullar altında immobilize enzimlerin serbest enzime kıyasla belirli bir sıcaklık ve pH değerleri aralığında daha kararlı olduğu görülmüştür. Öte yandan immobilize enzimler 50°C'de 3 saat inkübasyondan sonra daha yüksek kararlılık göstermiştir. Serbest enzim 4°C'de 4 hafta boyunca başlangıç aktivitesinin sadece %30'unu korurken, $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2$/ASNaz ve Fe_3O_4/SiO_2/COOH/ASNaz aynı koşullar altında başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %78,9 ve %56,5'ini korumuştur. Ayrıca, Fe_3O_4/SiO_2/COOH/ASNaz ve Fe_3O_4/SiO_2/COOH/ASNaz 17 defa tekrar kullanımdan sonra mükemmel bir operasyonel kararlılık sergilemiştir. Bu bulgular $Fe_3O_4/SiO_2/NH_2$ ve Fe_3O_4/SiO_2/COOH partiküllerin çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda immobilize L-

ASNaz geliştirmek için verimli ve sürdürülebilir destekler olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Noma ve ark. (2021) tarafından yürütülen bir başka çalışmada, L-ASNaz immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılabilecek poli(2-hidroksietil metakrilat-glisidil metakrilat) (p(HEMA-GMA)) kriyojeller sentezlenmiştir. İmmobilizasyon verimi %68,8 ve aktivite kazanımı %69,3 olarak belirlenmiştir. İmmobilize enzim, asidik pH ve yüksek sıcaklık gibi zorlu koşullarda serbest enzime kıyasla kararlılığını daha iyi korumuştur. Ayrıca immobilize enzim oda sıcaklığında 10 tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %52'sini korumuştur. Aynı zamanda immobilize enzim 28 gün sonra aktivitesinin %54'nü koruyarak iyi bir depolama kararlılığı sergilemiştir. Yapılan termodinamik çalışmalar serbest enzimin aktivasyon enerjisinin (Ea) 13,08'den 10,97 kJ/mol'e düştüğünü göstermiştir. Bu sonuç L-ASNaz'ın termal stabilitesinde bir artış anlamına gelmektedir. Bu bulgular, tasarlanan kriyojellerin yüksek katalitik verimlilik ve gelişmiş stabilite ile L-ASNaz immobilizasyonu için iyi bir destek materyali olduğunu göstermiştir.

Tarhan ve ark. (2022) adsorpsiyon metodu ile *Escherichia coli*'den elde edilen ticari L-ASNaz'ı hazırladıkları polimerik Fe_3O_4@Au-karboksimetil kitosan (CMC) manyetik nanopartikülleri (MNP) üzerine immobilize etmiştir. L-ASNaz içeren ve içermeyen polimerik malzemenin karakterizasyonu için TEM, SEM, FTIR, XRD, enerji dağılım spektroskopisi (EDS) ve termogravimetrik (TGA) analizler yapılmıştır. Fe_3O_4@Au-CMC için immobilize L-ASNaz verimi %68 olarak bulunmuştur. Fe_3O_4@Au-CMC/L-ASNaz'ın optimum pH, optimum sıcaklık, yeniden kullanılabilirlik ve termal kararlılık gibi biyokimyasal özellikleri kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Fe_3O_4@Au-CMC/L-ASNaz pH 7.0'de maksimum aktiviteye ulaşmış ve optimum sıcaklık 50°C olarak belirlenmiştir. Fe_3O_4@Au-CMC/L-ASNaz'ın belirgin şekilde düşük Ea değeri immobilizasyondan sonra bu enzimin katalitik aktivitesinin arttığını ortaya koymuştur. *Km* ve *Vmax* değerleri Fe_3O_4@Au-CMC/L-ASNaz için sırasıyla 3.27±0.48 mM ve 51.54±0.51 µmol/dk bulunmuştur. Bu sonuç substrat afinitesinin yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Fe_3O_4@Au-CMC/L-ASNaz 60°C'de 90 dakika sonunda başlangıç aktivitesinin %65'ini korumuştur. Ayrıca 10 tekrardan sonra başlangıç aktivitesinin %75'inden fazlasını koruyarak mükemmel bir tekrar kullanılabilirlik sergilemiştir. Bu

çalışma polimerik MNP'lerin immobilize enzim sistemlerinin geliştirilmesi için potansiyel bir destek materyali olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Barros ve arkadaşları (2022) tarafından karbon kserojelleri (CX'ler) üzerine L-ASNaz immobilize edilmiştir. Ayrıca merkezi kompozit tasarım yöntemi kullanılarak temas süresi, pH ve L-ASNaz derişiminin immobilizasyon verimi (İ.V) ve bağıl geri kazanılmış aktivite (RRA) üzerindeki etkisi incelenmiştir. En iyi sonuç CX-4 (gözenek boyutu 4 nm) kullanılarak elde edilmiştir. Çünkü İ.V ve RRA %100'e ulaşmıştır. Optimum koşullarda (temas süresi 49 dakika, pH 6,73 ve [L-ASNaz]=0.26 mg/mL) L-ASNaz-CXs biyokompoziti karakterize edilmiş ve kinetik özellikler ile termal ve pH stabiliteleri açısından değerlendirilmiştir. CX-4 üzerine immobilize edilmiş L-ASNaz 6 kez tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %71'ini korumuştur. Ayrıca immobilize L-ASNaz için substrat afinitesinde 3,9 kat artış olduğu rapor edilmiştir.

Iraninasab ve ark. (2023) üçüncü nesil poliamidoamin (PAMAM) dendrimerini 5-amino-1H-tetrazol heterohalkalı bileşiği ile işlevselleştirmiştir. Daha sonra kitosan uygun bir bağlayıcı ile dendrimere bağlanmış ve çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri dendrimer boşluklarına yerleştirilmiştir. FTIR, alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopi (FESEM), TEM ve dinamik ışık saçılımı spektroskopisi (DLS) analizleri ile dendrimerin dallanmış yapısı, ZnO nanopartiküllerinin dallar arasına yayıldığı ve kitosan biyopolimeri ile modifiye edildiği kanıtlanmıştır. Aynı zamanda L-ASNaz enziminin yüklenme ve salım profili diyaliz torbası kullanılarak araştırılmıştır. Kitosan-ZnO biyopolimerine dayanan yeni üçüncü nesil PAMAM dendrimerik nanotaşıyıcının (PAMAM-G3@ZnO-Cs nanotaşıyıcı) pH 7,4'te Jurkat hücre hattı (insan akut lenfoblastik lösemi) üzerindeki toksisitesi incelenmiştir. Buna göre, nanotaşıyıcının L-ASNaz ilacını etkili bir şekilde kapsüllediği ve yavaşça serbest bıraktığı aynı zamanda kanser hücrelerinin büyümesini önlediği rapor edilmiştir. Nanotaşıyıcıya yüklenen enzimin ve serbest enzimin aktivitesi hesaplanmıştır. İncelemeler sırasında nanotaşıyıcıya bağlı enzimin optimum pH ve sıcaklıkta, yüksek sıcaklıklarda, asidik ve bazik pH'larda serbest enzime göre daha kararlı olduğu bulunmuştur. *Vmax* ve *Km* değerleri immobilize enzim için daha düşük bulunmuştur. Sentezlenen PAMAM-G3@ZnO-Cs nanotaşıyıcının biyouyumluluğu, toksik olmaması, kararlılığı ve L-ASNaz'ın yavaş salınımı nedeniyle potansiyel bir destek materyali olduğu belirlenmiştir.

Acet (2023) miniemülsiyon yöntemi ile pH'a duyarlı vinil imidazol ve ısıya dayanıklı n-izopropilakrilamid monomerleri kullanarak L-ASNaz yüklü akıllı nanopolimerler (ASN-SNP'ler) sentezlemiştir. ASN-SNP'lerin SEM ve FTIR karakterizasyonları yapılarak Zeta potansiyelleri belirlenmiştir. ASN-SNP'ler ekstrem koşullar altında kararlılık göstermiştir. Ayrıca ASN-SNP'lerin depolama kararlılığı ve yeniden kullanılabilirliği oda sıcaklığında 4 hafta ve 10 döngüden sonra orijinal aktivitenin sırasıyla yaklaşık %63 ve %53'ü olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize L-ASNaz için sırasıyla 6.595 ve 1.902 mM Michaelis-Menten sabitleri (*Km*) ve 212.766 ve 49.02 µM/dk maksimum reaksiyon hızları (*Vmax*) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar tasarlanan L-ASNaz yüklü SNP'lerin yüksek katalitik verimlilikleri ve gelişmiş kararlılıkları nedeniyle umut verici bir destek materyali olduğunu göstermiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasal	Üretici	Kod
Alüminyum klorür ($AlCl_3$)	Sigma-Aldrich	7446-70-0
Amonyum persülfat ($(NH_4)_2S_2O_8$)	Sigma-Aldrich	A3678
Aseton (CH_3COCH_3)	Merck	67-64-1
Asetonitril (CH_3CN)	Merck	75-05-8
Bakır (II) nitrat trihidrat ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$)	Merck	102753.0250
Bizmut (III) nitrat pentahidrat ($Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$)	Merck	10035-06-0
Civa (II) iyodür ($HgCl_2$)	Merck	7774-29-0
Diklorometan (CH_2Cl_2)	Merck	1.06054
Dimetil sülfoksit	Merck	S5604824
Etil alkol (C_2H_5OH)	CarloErba	4146082
Etil asetat ($CH_3COOC_2H_5$)	Merck	141-78-6
Etilen glikol $(CH_2OH)_2$	Sigma-Aldrich	324558
Etilen glikol dimetilakrilat ($[H_2C=C(CH_3)CO_2CH_2]_2$)	Sigma-Aldrich	33568-1
Hidroklorik asit (HCl)	Merck	1.00317
Kadmiyum klorür monohidrat ($CdCl_2 \cdot H_2O$)	Sigma-Aldrich	35658-65-2
Kalsiyum klorür ($CaCl_2$)	Merck	10043-52-4
Kobalt (II) klorür hegzahidrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	Sigma-Aldrich	7791-13-1
L-asparajin	Sigma	70-47-3
L-asparajinaz	Leunase	40571
L-Histidin metil ester dihidroklorür ($C_7H_{11}N_3O_2 \cdot 2HCl$)	Aldrich	7389-87-9
Lityum klorür (LiCl)	Sigma-Aldrich	7447-41-8
Magnezyum klorür hegzahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	Merck	7786-30-3
Metakriloil klorür (C_4H_5ClO)	Fluka	64120
Polivinil alkol	Aldrich	363081

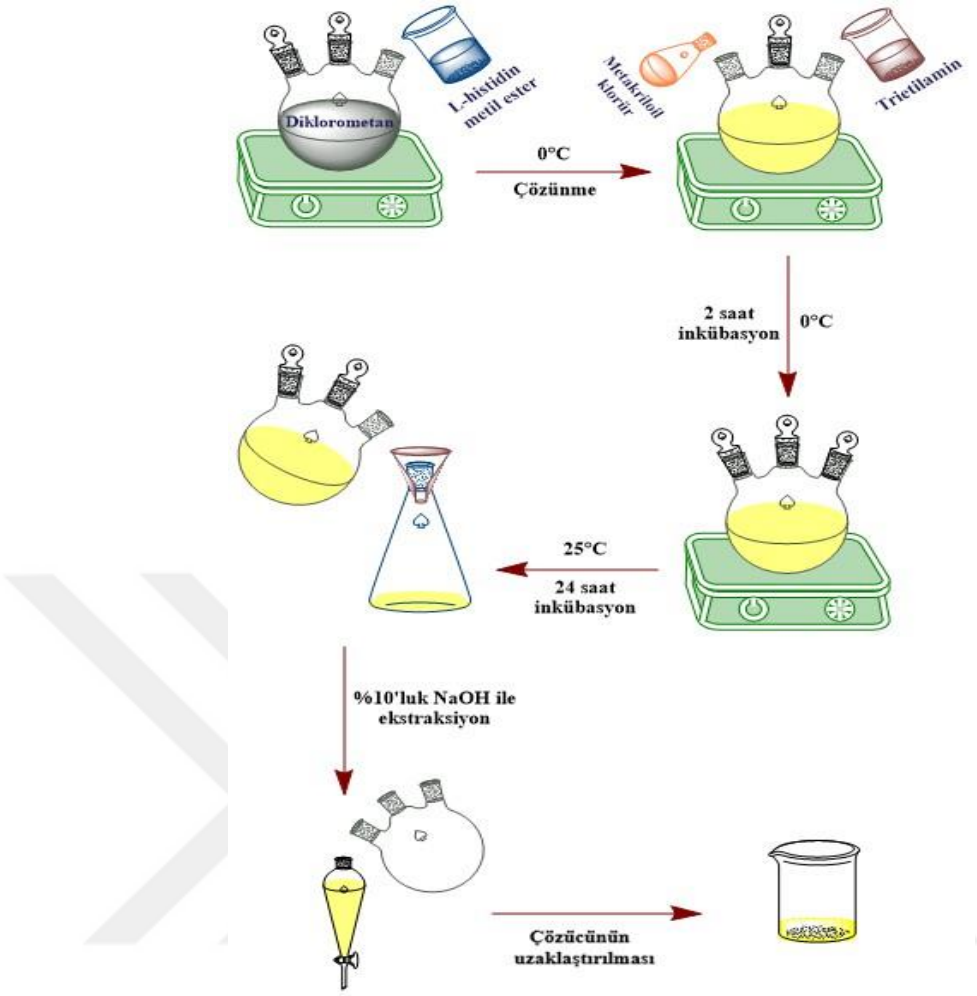
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasalların listesi (devamı)

Kimyasal	Üretici	Kod
Potasyum iyodür (KI)	Merck	7681-11-0
Potasyum klorür (KCl)	Merck	7447-40-7
Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)	Sigma	S5761
Sodyum bisülfit ($NaHSO_3$)	Sigma-Aldrich	7631-90-5
Sodyum dodesil sülfat ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)	Merck	8.22050
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich	06203
Sodyum sülfat (Na_2SO_4)	Acros Organics	196640010
Toluen ($C_6H_5CH_3$)	LACHEMA	510390800
Trietilamin ($K_6H_{15}N$)	Across Organics	157910010
Trikloroasetik asit	Sigma-Aldrich	76-03-9
Tris(hidroksi)-aminometan	Merck	1.08387.0500
Yapay insan serumu	Sigma-Aldrich	H4522

3.2 Yöntem

3.2.1. MAH-Cu^{2+} monomerinin sentezi

PHM-Cu^{2+} nanopartikülerinin sentezinde MAH monomer olarak kullanıldı. MAH monomerinin sentezi için ilk olarak 5,0 g L-histidin metil ester 100 mL diklorometan içerisinde çözüldü. Daha sonra bu çözelti 0°C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine trietilamin ve metakriloil klorür yavaşça ilave edildi ve 2 saat karıştırıldı. Ardından buz banyosundan çıkarılıp 24 saat karıştırıcıda bekletildi. Elde edilen MAH monomeri %10'luk NaOH ile ekstrakte edildi. Döner buharlaştırıcıda yardımıyla diklorometanın uzaklaştırılmasının ardından elde edilen monomer etil alkol içerisinde çözüldü (Şekil 3.1). MAH-Cu^{2+} kompleksinin hazırlanması için, 1.0 mmol MAH monomeri 1.0 mmol Cu^{2+} iyonu ($Cu(NO_3)_2.5H_2O$) ile etkileştirildi. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı (Şekil 3.2) (Bakhshpour ve ark., 2018).

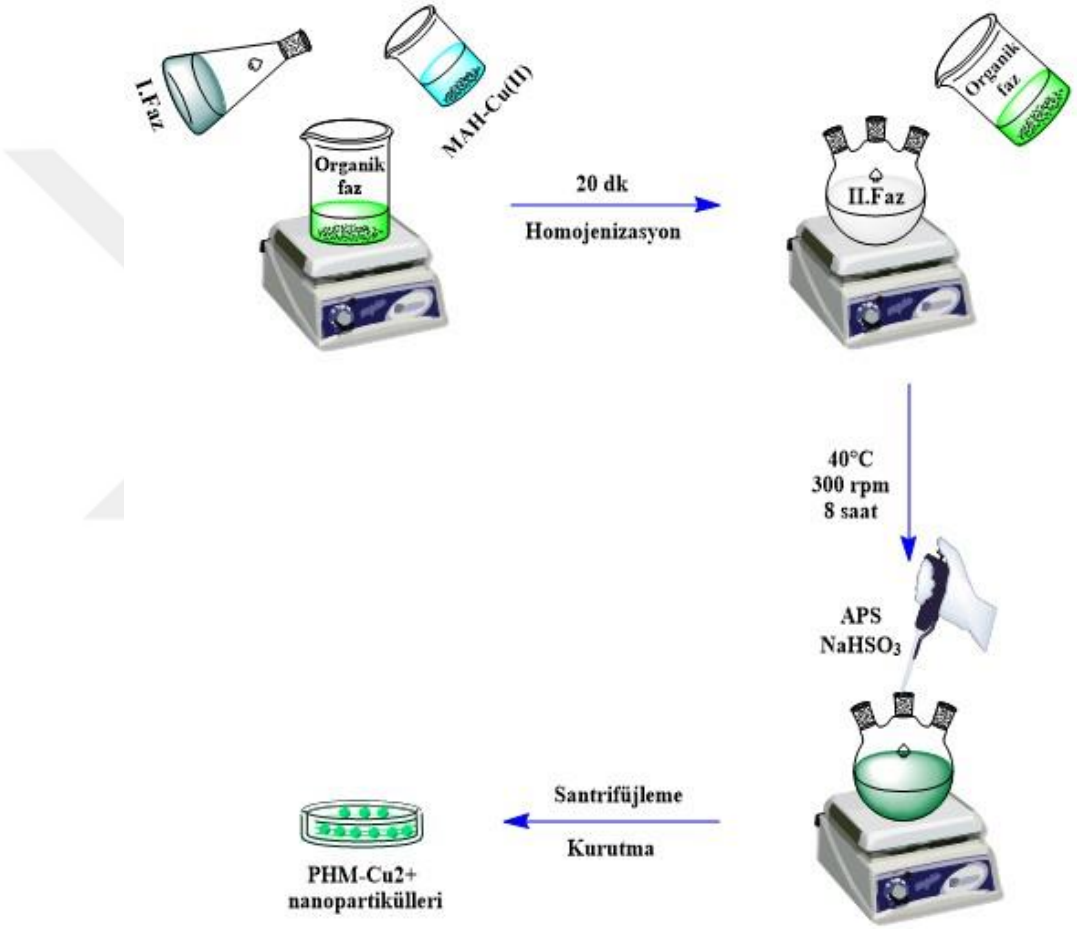


Şekil 3.1. MAH monomeri sentezinin şematik gösterimi

3.2.2. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin sentezi ve karakterizasyonu

L-ASNaz enziminin immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılacak PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlendi. Nanopartiküllerin sentezinde EGDMA çapraz bağlayıcı HEMA ve MAH sırasıyla komonomer ve monomer olarak kullanıldı. Polimerizasyon karışımının hazırlanması için, I. sulu faz, II. sulu faz ve organik faz (yağ fazı) olmak üzere üç ayrı çözelti hazırlandı. I. sulu faz için, polivinil alkol (PVA), sodyum dodesil sülfat (SDS) ve $NaHCO_3$ 5 mL ultra saf su içerisinde çözüldü. II. sulu faz için, PVA ve SDS 100 mL ultra saf suda çözüldü. Son aşama olan ve organik faz olarak da adlandırılan III.faz ise HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak kullanılan EGDMA'ın karıştırılması ile hazırlandı. Öncesinde 1:1 (mmol/mmol) oranında hazırlanmış olan MAH-Cu^{2+} kompleksi ve I. sulu faz organik faza eklenerek 20 dk homojenizatörde 20000 rpm hızda karıştırıldı. Elde edilen karışım cam balondaki II. sulu

faz'a aktarıldı. Sodyum bisülfit ve amonyum persülfat (APS) başlatıcı çiftinin reaksiyon ortamına eklenmesinin ardından karışım 300 rpm sabit hızda ve 40°C sabit sıcaklıkta 24 saat polimerleştirildi. Sentezlenen PHM-Cu^{2+} nanopartiküller 8000 rpm'de santrifüjlenip çöktürüldükten sonra 15 000 rpm hızında 30 dk süre ile etanol ve su ile reaksiyona girmemiş monomerler ve yüzey aktif maddeler uzaklaşıncaya kadar yıkandı. Daha sonra elde edilen PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri 40°C'de vakum etüvünde kurutuldu. Nanopartiküllerin sentez aşamaları Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin sentezi

Sentezlenen PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri FTIR analizi ile karakterize edildi (Perkin Elmer Spectrum 100). Spektrumlar 400-4000 cm^{-1} frekans aralığında hazırlandı.

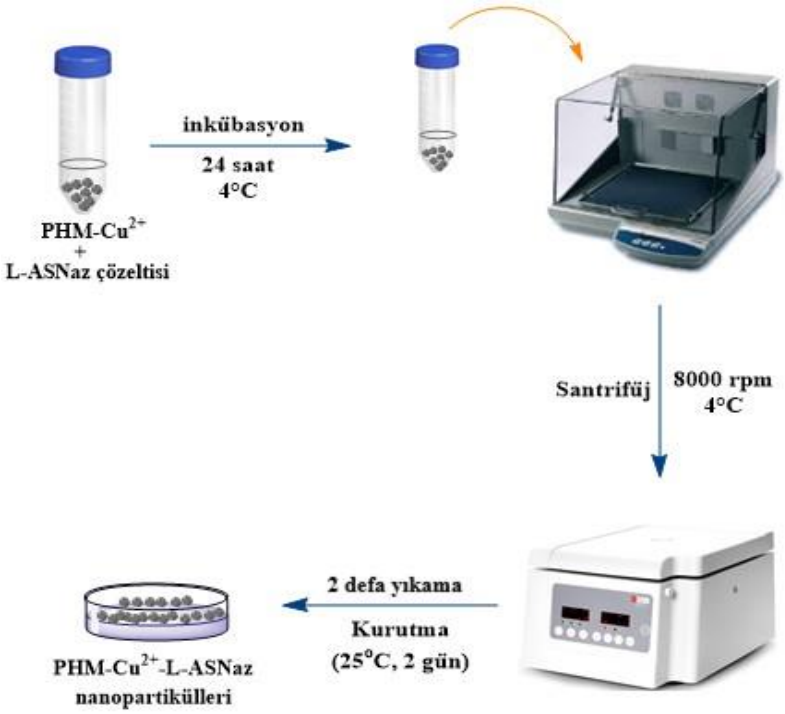
SEM-EDX (Carl Zeiss Gemini 300) analizi yapıldı. SEM analizi ile PHM-Cu^{2+} nanopartikülerinin morfolojik özellikleri araştırıldı ve Cu^{2+} iyonu varlığı EDX analizi ile araştırıldı.

PHM-Cu^{2+} nanopartiküller geçirimli elektron mikroskobu (TEM) (FEI Tecnai G^2 Spirit Biotwin, Hillsboro, ABD) analizi ile görüntülendi. PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri bir tüpün içerisine konuldu ve içerisine etanol ilave edilerek homojen bir şekilde dağılana kadar su banyosu içerisinde bekletildi. Sabitlenmiş karbon kaplı ızgara üzerine süspansiyondan 10 µl damlatıldı ve kuruyana kadar bekletildi. Mikroskopta aydınlık alan kırınım görüntülemesi yöntemi ile PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri görüntülendi.

PHM-Cu^{2+} nanopartikülerin Zeta potansiyel ve boyut dağılımı parçacık boyutu / Zeta potansiyel analizörü (Malvern Instrument Company, UK) kullanılarak belirlendi.

3.2.3. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllere L-ASNaz immobilizasyonu

İmmobilizasyon için 100 mg PHM-Cu^{2+} nanopartikül 100 U L-ASNaz enzim çözeltisi (saf su ile çözüldü) ile karıştırıldı. Elde edilen bu karışım 4°C'de 24 saat inkübe edildi. Ardından PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartiküller 8000 rpm'de 4°C'de santrifüj edildi. Ardından, nanopartiküller non-spesifik bağlanmış enzimi uzaklaştırmak için saf su ile 2 kez yıkandı. 2 gün 25°C'de kurutulan nanopartiküller 4°C'de saklandı. İmmobilizasyon prosedürü Şekil 3.3'de özetlenmiştir.



Şekil 3.3. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllere L-ASNaz immobilizasyon prosedürü

3.2.4. L-ASNaz aktivitesinin belirlenmesi

L-ASNaz enzim aktivitesi ölçümü için Mashburn'nun 1964 yılında geliştirdiği nesslerizasyon yöntemi kullanıldı. Nesslerizasyon yöntemi L-Asn'nin L-ASNaz tarafından hidroliziyle oluşan amonyağın kolorimetrik olarak ölçümü yaklaşımına dayanmaktadır. Buna göre; serbest ve immobilize L-ASNaz üzerine Tris-HCl (50 mM, pH 8.6) tamponu ile L-Asn (substrat, 10 mM, 1 mL) çözeltisi eklendi. Elde edilen karışımlar 50°C'de 15 dakika bekletildi. Ardından trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi (1,5 M, 100 µL) eklenerek enzimatik reaksiyon sonlandırıldı. Daha sonra elde edilen çözeltiler 96 kuyucuklu plakalara (100 µL) konuldu ve üzerine 100 µL Nessler reaktifi (K_2HgI_4) eklendi. Elde edilen sarı-turuncu renkli çözelti oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra çözeltinin absorbansı mikroplaka okuyucu (800 TS microplate reader) ile 480 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.
Enzim aktivitesi (IU), optimum koşullar altında dakikada 1 µmol amonyak açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlandı. Tüm deneyler üç kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar en yüksek aktivite %100 kabul edilerek hesaplandı ve bağıl aktivite (%) olarak verildi.

İmmobilizasyon etkinliğini belirlemek için; immobilizasyon verimi (%), aktivite verimi (%) ve immobilizasyon etkinliği (%); Denklem (1.1), Denklem (1.2) ve Denklem (1.3) kullanılarak hesaplandı.

$$\text{İ}mmobilizasyon\ verimi\ (\%) = \frac{C_i - C_s}{C_i} \text{ x } 100 \qquad (1.1)$$

Denklemde C_i enzimin başlangıç derişimini, C_s ise süpernatant ve yıkama çözeltilerindeki bağlanmamış enzimin derişimini göstermektedir.

$$Aktivite\ verimi\ (\%) = \frac{A_i}{A_f} \text{ x } 100 \qquad (1.2)$$

Denklem 1.2'de A_i, PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz, A_f ise serbest L-ASNaz'ın aktivitesini ifade etmektedir.

$$\text{İ}mmobilizasyon\ etkinliği(\%) = \frac{Aktivite\ verimi}{\text{İ}mmobilizasyon\ verimi} \text{ x } 100 \qquad (1.3)$$

3.2.5. Enzim aktivitesine etki eden parametrelerin araştırılması

3.2.5.1. pH etkisi

Serbest ve immobilize L-ASNaz aktivitesine pH'ın etkisini belirlemek için farklı tamponlar ile hazırlanan substrat çözeltileri (10 mM) kullanılarak enzim aktiviteleri ölçüldü. pH 4,0, 5,0 ve 6,0 için 50 mM sitrat tamponu, pH 7,0, 7,5 ve 8,0 için fosfat tamponu ve pH 8,5, 9,0 ve 10,0 için 50 mM Tris-HCl tamponu kullanıldı. Hazırlanan substrat çözeltileri (10 mM, 1 mL) serbest ve immobilize L-ASNaz üzerine eklendi ve standart enzim aktivite ölçümü yapıldı. En yüksek enzim aktivitesinin elde edildiği pH değeri optimum pH olarak belirlendi.

3.2.5.2. Sıcaklık etkisi

PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz ve L-ASNaz aktivitesine sıcaklığın etkisini belirlemek için, enzimler farklı sıcaklıklarda (30-60°C) 30 dk inkübe edildi ve optimum pH değerinde (pH 8,0) hazırlanan substrat çözeltisi (10 mM) 1 mL eklenerek aktiviteleri ölçüldü. En yüksek enzim aktivitesinin elde edildiği sıcaklık değeri optimum sıcaklık olarak kaydedildi.

3.2.5.3. Termal kararlılık

Termak kararlılık parametresi için serbest ve immobilize L-ASNaz 50°C'de pH 8,0'de hazırlanan 10 mM substrat çözeltisi içerisinde 3 saat su banyosunda bekletildi. Farklı zaman aralıklarında alınan örneklerin enzim aktiviteleri ölçüldü. Serbest ve immobilize enzimler için başlangıç aktivitesi %100 kabul edilerek kalan aktivite değerleri hesaplandı.

3.2.5.4. Tekrar kullanılabilirlik

PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz enziminin tekrar kullanılabilirliğini değerlendirmek için immobilize enzim, hazırlanan substrat çözeltisi (10 mM, pH 8,0) içerisinde 50°C'de bekletilerek on iki kez aktivitesi ölçüldü. Her döngüden sonra numune ultra saf su ile yıkandı. Her reaksiyon döngüsünden sonra PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz santrifüjleme ile reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı ve Tris-HCl tamponu (pH 8,6) ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından yeni substrat çözeltisi eklendi. İlk enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve sonraki aktiviteler bağıl olarak hesaplandı.

3.2.5.5. Depolama kararlılığı

Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın depolama kararlılığını incelemek için enzimler oda sıcaklığında 4 hafta boyunca depolandı ve her hafta enzim aktivitesi optimum koşullar altında (50°C, pH 8,0) ölçüldü. İlk enzim aktivitesi %100 olarak kabul edildi ve sonraki aktiviteler bağıl olarak hesaplandı.

3.2.5.6. Proteaz dayanımı

Tıbbi ilaç olarak kullanılan bakteriyel enzimlerin proteazlara karşı düşük stabiliteye sahip olmaları büyük sorunlara sebep olabilmektedir. Bundan dolayı hem serbest hem de immobilize L-ASNaz enziminin bir proteaz olan tripsin enzimine karşı dayanımını belirlemek için 100 U serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz 100 µL (0.5 mg /mL) tripsin çözeltisi ile (0 dk-120 dk aralığında) inkübe edildi. Belirlenen zamanlarda alınan örnek üzerine 1 mL substrat çözeltisi (10 mM) eklenerek enzim aktivitesi ölçüldü.

3.2.5.7. Metal iyonu etkisi

Metal iyonlarının (K^+, Li^+, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}) serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için, enzimler 1 mL metal iyonu çözeltisi ile (10 mM) etkileştirildi (oda sıcaklığında (~25°C'de) 24 saat). Enzim aktiviteleri optimum koşullar (50°C, pH 8,0) altında ölçüldü. Herhangi bir metal iyonu çözeltisi ile muamele edilmemiş enzim aktivitesi %100 kabul edilerek % aktivite değerleri hesaplandı.

3.2.5.8. Organik çözücü etkisi

Serbest ve immobilize enzim aktivitesine çözücü etkisini belirlemek için aseton, asetonitril, etanol, etil asetat, etilen glikol, diklorometan (DCM) ve dimetil sülfoksit (DMSO) çözücüleri (%5 v/v) kullanıldı. Enzimler 1 mL çözücü ile oda sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra optimum koşullar altında enzim aktivitesi ölçüldü. Herhangi bir metal iyonu ve organik çözücü ile muamele edilmemiş enzim aktivitesi %100 kabul edilerek % aktivite değerleri hesaplandı.

3.2.5.9. Kinetik parametreler

Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz enzimlerinin kinetik parametreleri (*Km* ve *Vmax*) belirlendi. Bunun için farklı derişimlerde (0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ve 10 mM) substrat çözeltileri hazırlandı ve başlangıç reaksiyon hızları standart enzim aktivitesi ölçümü ile optimum koşullar (50°C, pH 8,0) altında ölçüldü. *Km* ve *Vmax* değerleri Lineweaver-Burk eşitliği Denklem (1.4) kullanılarak hesaplandı.

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (1.4)$$

Denklem (1.4)'de; V_o başlangıç hızını, [S] substratın molar derişimini (mM), *Vmax* maksimum reaksiyon hızını (µmol/dk), *Km* ise Michaelis-Menten sabitini (mM) ifade etmektedir.

3.2.6. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın *in vitro* yarı ömrünün belirlenmesi

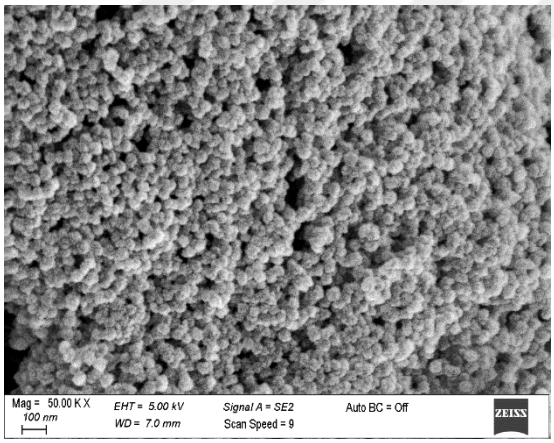
In vitro yarı ömrün belirlenmesi, serbest ve immobilize L-ASNaz'ın çeşitli biyolojik uygulamalarda kullanılabilirliğinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bu amaçla serbest ve immobilize L-ASNaz enzimleri (1000U) yapay serum ile 1 hafta 37°C'de inkübe edildi. Serbest ve immobilize enzimin aktivitesi her gün ölçülerek *in vitro* yarı ömürleri hesaplandı. Bunu için serbest ve immobilize enzimin ilk gün ölçülen aktivitesi %100 olarak kabul edildi. Enzim aktivitesindeki değişim bağıl aktivite olarak hesaplandı.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

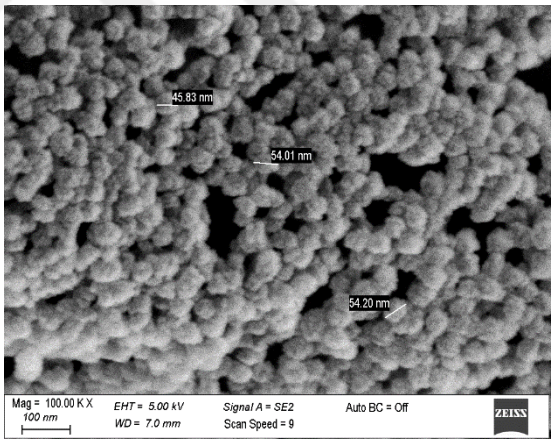
4.1. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin özellikleri

4.1.1. SEM-EDX analizi

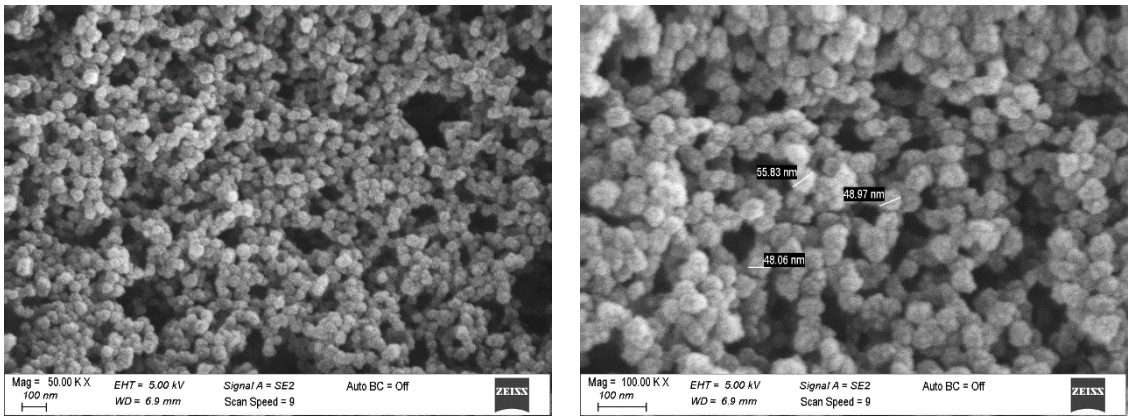
İmmobilizasyondan önce ve sonra PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin yapısı, yüzey morfolojisi ve yaklaşık boyutları SEM ile aydınlatılmıştır. PHM-Cu^{2+} ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartiküllerinin farklı büyütmelerde elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.1'de gösterilmektedir. SEM fotoğraflarında emülsiyon polimerizasyon prosedürünün küresel formdaki PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerini elde etmede başarılı olduğu açıkça görülmektedir. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin ortalama çapının yaklaşık 50 nm olduğu görülmektedir (Şekil 4.1). Sentezlenen PHM-Cu^{2+} nanopartiküller tedavi amaçlı kullanımında hücre içine alımda önemli bir avantaj sağlayacak boyuttadır. Şekil 4.1c ve Şekil 4.1d'deki SEM görüntüleri incelendiğinde, immobilizasyondan sonra PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin şekillerinin değişmediği görülmektedir. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin boyutları çok küçük olduğu için yüzey morfolojisi hakkında yorum yapılamamaktadır.



(a)



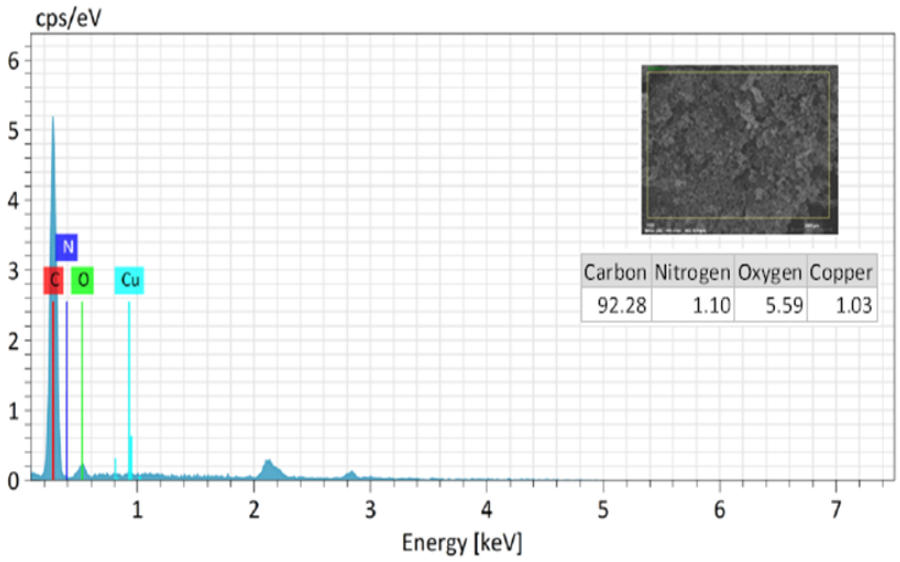
(b)



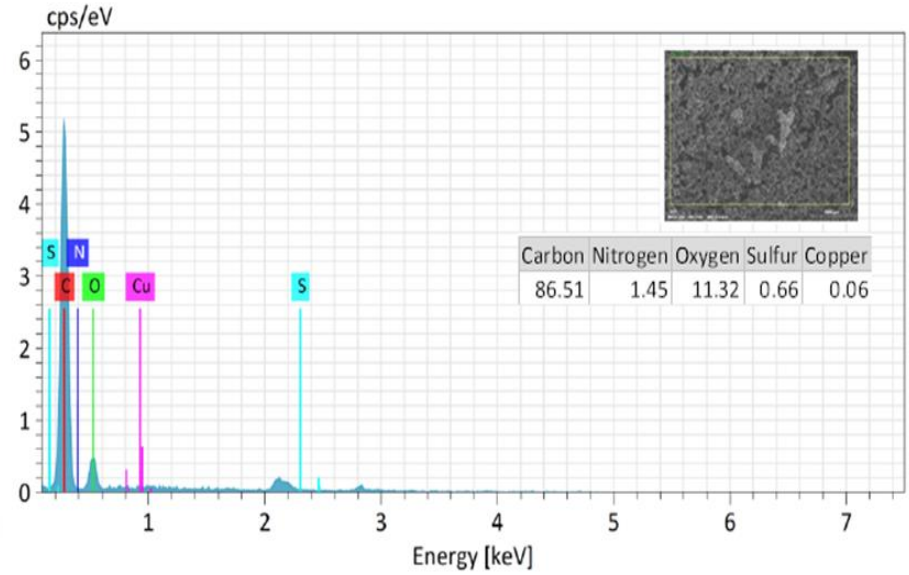
(c) (d)

Şekil 4.1. PHM-Cu^{2+} (a,b) ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz (c,d) nanopartiküllerinin farklı büyütme oranlarında alınmış SEM görüntüleri

PHM-Cu^{2+} ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartiküllerinin element içeriklerini belirlemek için EDX analizi yapılmıştır (Şekil 4.2). Analiz sonucunda, PHM-Cu^{2+} ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'da karbon (C), azot (N), oksijen (O) ve bakır (Cu) elementlerinin varlığı saptanmıştır. Ayrıca, PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartikülleri ek olarak kükürt (S) elementini de içermektedir (%0,66). İmmobilizasyondan sonra azot oranı %1,10'dan %1,45'e, oksijen oranı %5,59'dan %11,32'ye yükselirken; karbon oranı %92,28'den %86,51'e, bakır oranı %1,03'den %0,06'ya düşmüştür. Sonuç olarak, immobilizasyondan sonra PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin element bileşimi değişiklik göstermiştir. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin yapısında S elementinin bulunması L-ASNaz enziminin başarıyla immobilize edildiğini kanıtlamaktadır.



(a)



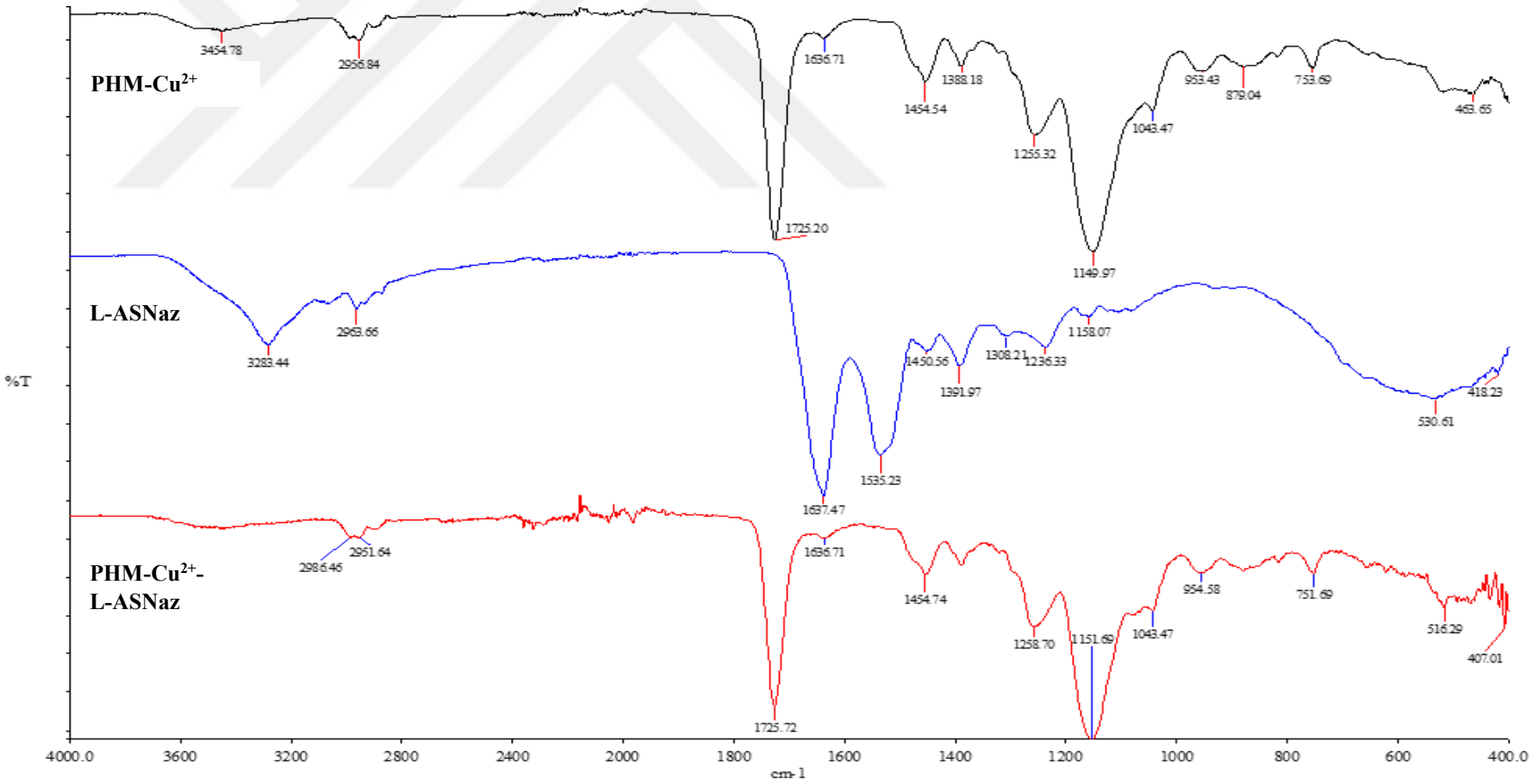
(b)

Şekil 4.2. PHM-Cu^{2+} (a) ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz (b) nanopartiküllerinin SEM-EDX spektrumları

4.1.2. FTIR analizi

Kimyasal yapılarını tanımlamak ve nanopartiküllere bağlı L-ASNaz'ın varlığını kanıtlamak için L-ASNaz enzimi, PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz FTIR analizi ile karakterize edildi. FTIR spektrumları Şekil 4.3'de verilmiştir. Serbest L-ASNaz'ın FTIR spektrumunda, 3283 cm^{-1} ve 2963 cm-1'de sırasıyla O-H gerilme bandı ve alkil grubuna ait gerilme bandı (-CH_2) yer almaktadır. 1638 cm^{-1}, 1535 cm^{-1} ve 1450 cm^{-1}'deki karakteristik pikler sırasıyla (-CONH-) amid I, amid II ve amid III bandına karşılık gelmektedir. 1236 cm^{-1} ve 1158 cm^{-1}'deki absorpsiyon bantları ise alifatik aminlere (C-N bağ gerilmesi) karşılık gelmektedir. 3283 cm^{-1}'de tespit edilen absorpsiyon bandı O-H gerilme bandına atfedilmiştir (Cakir, 2019). PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin spektrumunda, 2956 cm^{-1}'de tekrar eden alifatik C-H bağlarının absorpsiyon pikleri ve 1725 cm^{-1}'de ester karbonil (C=O) grubuna ait pik gözlenmiştir. Spektrumda amid bağlarının (1638 cm^{-1}, 1535 cm^{-1} ve 1450 cm^{-1}) varlığı, PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin yapısına metal şelatlayıcı monomerlerin dahil olduğunu göstermektedir (Bakhshpour ve ark., 2018). PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz spektrumuna benzer şekilde, nanopartiküller 1255 cm^{-1} ve 1149 cm^{-1}'de C-N gerilme bantlarına sahiptir. Ayrıca, 500-400 cm^{-1} arası gözlenen karakteristik pikler Cu-N gerilme bantlarına karşılık

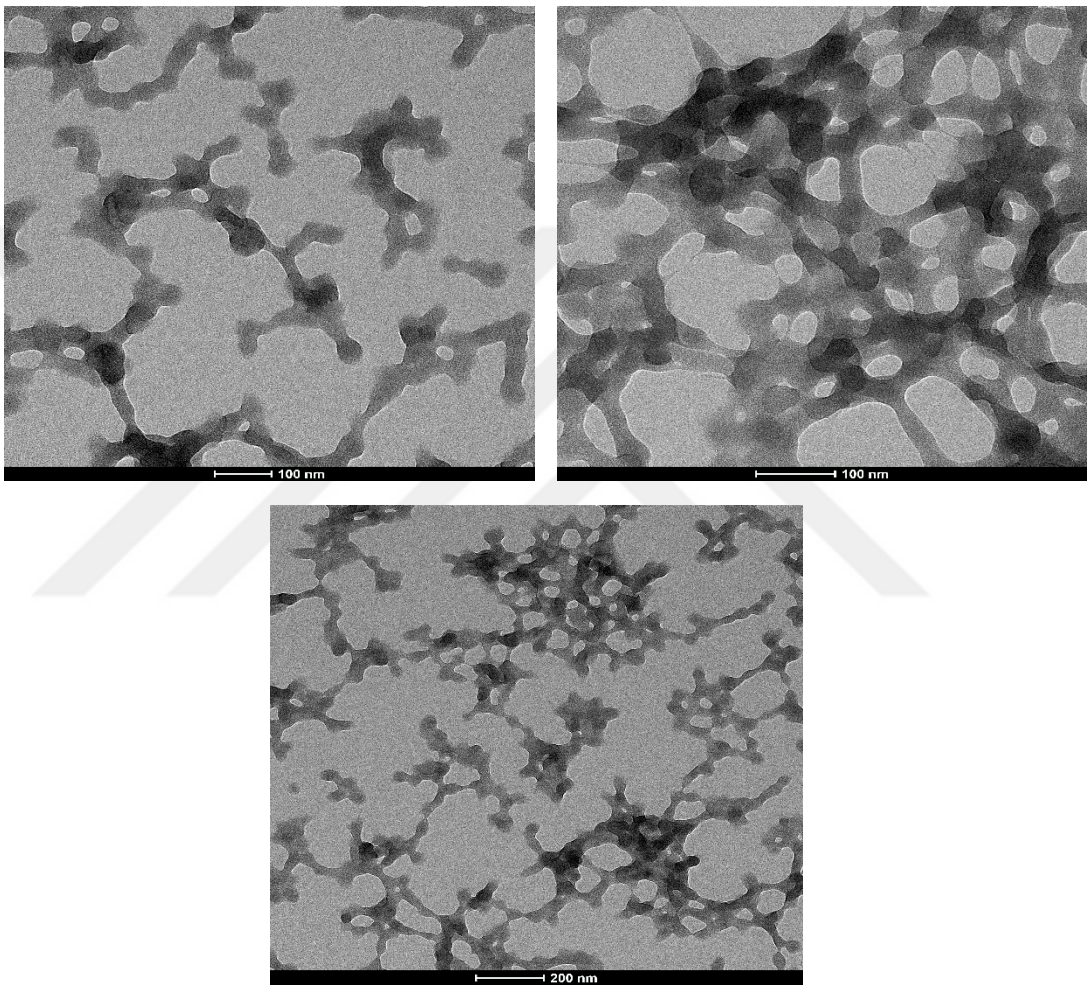
gelmektedir. PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın spektrumunda, karakteristik amid bantları varlığını korumaya devam etmiştir. 1725 cm^{-1}'de ester karbonil grubu, 2990 cm^{-1} ve 2951 cm^{-1}'de alifatik C-H bağı gözlenmiştir. Ayrıca, 1258 cm^{-1} ve 1152 cm^{-1}'de gözlemlenen pikler C-N titreşimlerine karşılık gelmektedir.



Şekil 4.3. L-ASNaz, PHM-Cu^{2+} ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartiküllerin FTIR spektrumları

4.1.3. TEM analizi

PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin TEM fotoğrafları Şekil 4.4'de verilmiştir. Verilen üç görüntü, PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin immobilizasyon öncesine aittir. Polimerik nanopartiküller arasındaki etkileşimler, yüksek yüzey enerjileri nedeniyle agregasyona neden olmuştur.

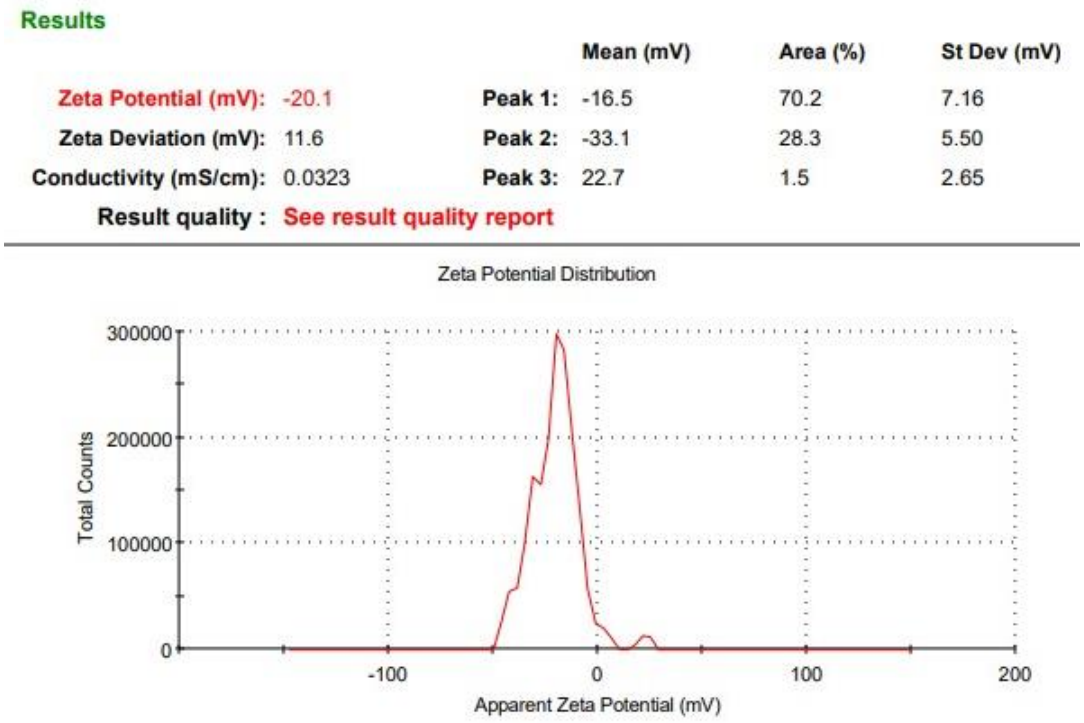


Şekil 4.4. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin TEM fotoğrafları

4.1.4. Zeta potansiyel ve boyut analizi

Bir nanopartikülü çevreleyen elektrik yükü Zeta potansiyel ölçümü ile açıklanmaktadır. Nanopartiküller arasındaki elektrostatik itme süspansiyondaki partikül stabilitesini önemli ölçüde etkileyebilir (Qi ve ark., 2004). Zeta potansiyel kolloid kimyasında dispersif sistemlerin sıvılar içindeki davranışlarını gözlemlemek için kullanılmaktadır.

Zeta potansiyeli -10 ile +10 mV arasında olan nanopartiküller nötr kabul edilmektedir. Ayrıca zeta potansiyeli +30 mV'den büyük olan nanopartiküller güçlü katyonik, 30 mV'den küçük olan nanopartiküller ise güçlü anyonik olarak kabul edilmektedir (Clogston ve Patri, 2011). Hücresel membranların çoğu negatif yüklü olduğundan Zeta potansiyeli bir nanopartikülün membranlara nüfuz etme eğilimini etkileyebilir ve katyonik partiküller genellikle hücre duvarı bozulmasıyla bağlantılı daha fazla toksisite gösterir (Clogston ve Patri, 2011). Sonuçlar, PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerin Zeta potansiyel değerinin -20.1 mV olduğunu göstermektedir (Şekil 4.5). Genel olarak literatüre bakıldığında, +25 mV'den fazla veya -25 mV'den az Zeta potansiyelinin partikül agregasyonunu önlemek için yeterli itme kuvveti sağladığı kabul edilir (Qi ve ark., 2004; Mittelman ve ark., 2015; Domínguez-Villegas ve ark., 2014; Suponik ve ark., 2016). PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartikülleri oldukça yüksek stabiliteye sahiptir ve sulu çözelti içerisinde belli derecede agrege olmaya meyillidir. Ancak, immobilizasyon ve kullanım sırasında uygulamada bir zorluk yaşanmamıştır.



Şekil 4.5. PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin zeta potansiyel analizi

4.2. İmmobilizasyon parametreleri

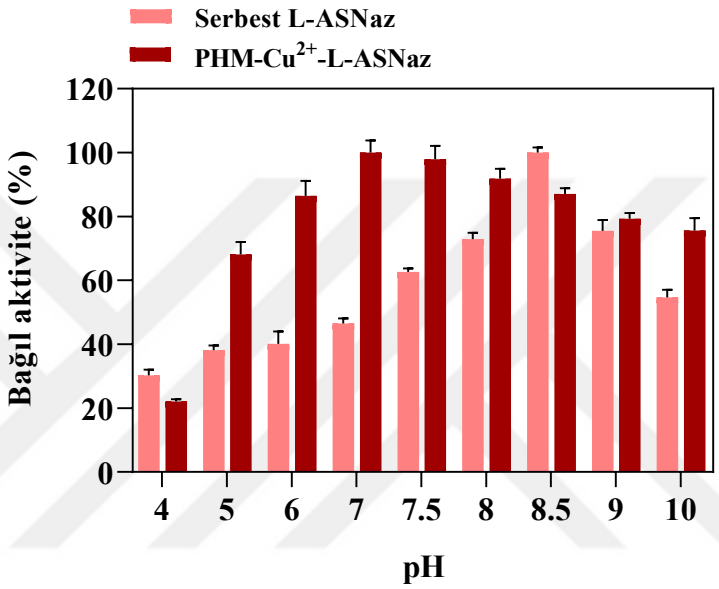
4.2.1. İmmobilizasyon verimi

İmmobilizasyon etkinliğini değerlendirmek için, immobilizasyon verimi (İ.V), aktivite verimi (A.V) ve immobilizasyon etkinliği (İ.E) belirlenmiştir. İ.V, enzimin destek malzemesine bağlanma kapasitesini gösterir ve destek üzerine ya da içine immobilize olan enzim yüzdesini tanımlamak için kullanılır (Boudrant ve ark., 2020). A.V, standart enzim aktivitesine karşılık immobilize enzimde korunan aktivite yüzdesini gösterir. Bu çalışma sonucunda, İ.V %86.46 ± 3.32, A.V %73.65 ± 4.78, İ.E ise %85.18 ± 4.36 olarak hesaplanmıştır. Noma ve ark. (2021) L-ASNaz immobilizasyonu için p(HEMA-GMA) kriyojeli kullanmış ve %68,8 İ.V elde etmişlerdir. İmmobilizasyon yöntemi aynı olmasına rağmen destek materyaline tutunan enzim miktarı düşük olduğu için immobilizasyon verimi bizim çalışmamıza kıyasla sınırlı kalmıştır. Tarhan ve ark. (2022) L-ASNaz'ın MNP üzerine adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonunu desteklemek için CMC MNP'ü kullanmış ve %68 İ.V bulmuştur. Sonuç olarak, PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz için immobilizasyon parametreleri diğer çalışmalarla düzeydedir. Elde edilen İ.V' nin yüksek olduğu (%86,46) yani desteğin L-ASNaz'a yüksek afinite ile bağlandığı ve bunun muhtemelen PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin Cu^{2+} iyonu ile şelatlaştırılmasından kaynaklandığı söylenebilir.

4.2.2. Optimum pH

Enzimatik reaksiyonların gerçekleştiği ortamlarda pH değişimleri enzimin yapısını ve aktivitesini etkileyebilmektedir. Bu nedenle enzim aktivitesi üzerine pH'ın etkisi araştırılarak optimum pH belirlenmelidir. Bu çalışmada serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın pH 4 ile 10 arasında enzim aktiviteleri ölçüldü. Serbest L-ASNaz'ın optimum pH'ı 8,5 iken immobilize L-ASNaz'ın optimum pH'ı 7 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Orhan ve Uygun (2020) yaptıkları çalışmada serbest ve immobilize L-ASNaz için optimum pH'ı sırasıyla 7,5 ve 6,5 olarak bulmuştur. Bu çalışmaya bakıldığında immobilize enzim pH'nın serbest enzime kıyasla daha düşük çıktığı görülmektedir. Serbest ve immobilize L-ASNaz'ın optimum pH değerlerinin farklı çıkması, ortamın asidik ve bazik özelliğinden, destek materyalinin yüzey özelliklerinden veya enzimin konformasyonel değişimi ve bunun gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır. Örneğin ortamın yüksek asiditeye sahip olması, enzimin aktif bölgesindeki fonksiyonel grupların

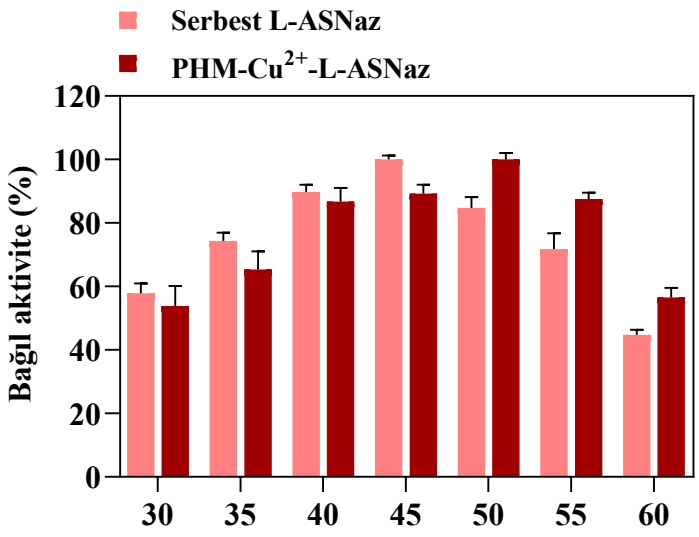
iyonizasyonunda bir değişikliğe sebep olup, enzim aktivitesinin düşmesine sebep olmaktadır. PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz, asidik ortamda (pH 5) yaklaşık %68 aktivite gösterirken, serbest L-ASNaz bu pH da yaklaşık %38 aktivite göstermiştir. Aynı zamanda, PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz ve serbest L-ASNaz, bazik ortamda (pH 10) sırasıyla %75 ve %54 aktivite göstermiştir. Sonuçlar immobilize L-ASNaz'ın pH'a karşı daha dirençli olduğunu ve stabilitesini koruduğunu göstermektedir.



Şekil 4.6. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz için optimum pH

4.2.3. Optimum sıcaklık

Enzim immobilizasyonu sonrası optimum sıcaklıkta bir değişiklik olup olmadığını belirlemek büyük bir öneme sahiptir. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın enzimatik aktivitesindeki değişikliği belirlemek için her iki enzim de 30°C ila 60°C arasında değişen farklı sıcaklıklarda 15 dakika inkübe edildi ve substrat çözeltisi kullanılarak aktivite ölçüldü. Elde edilen veriler bağıl aktivite olarak Şekil 4.7'de verilmiştir.

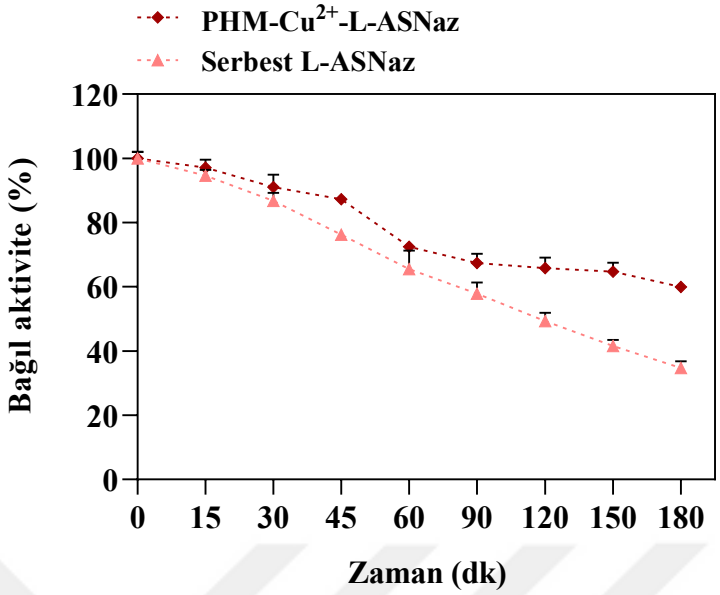


Şekil 4.7. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz için optimum sıcaklık

Serbest L-ASNaz en yüksek aktivitesini 45°C 'de göstermiştir. PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz için ise bu değer 50°C olarak bulunmuştur. Literatürdeki sonuçlarla karşılaştırıldığında, serbest ve immobilize L-ASNaz için optimum sıcaklık Orhan ve Uygun (2020) ekibinin yaptığı çalışma sonuçlarıyla aynı görülmektedir. Ayrıca immobilize enzimin aktivitesi 50°C'nin üzerinde keskin bir şekilde azalmıştır. PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz 60 °C'de bağıl aktivitesinin yaklaşık %56'sını korurken, serbest enzim aktivitesinin %44'ünü korumuştur. Serbest enzim 55°C'den sonra bağıl aktivitesinin yarısından fazlasını kaybetmiştir. Bu sonuç serbest enzimin yüksek sıcaklıklarda kararlılığını koruyamadığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlar PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın serbest enzime kıyasla daha yüksek termal dayanıma sahip olduğunu ortaya koymaktadır. İmmobilize enzimin termal kararlılığı enzimin serbest haline kıyasla termal titreşimlerinin azalmış olması ve aynı zamanda yapısal konformasyonunun korunuyor olmasından kaynaklanmaktadır.

4.2.4. L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın termal kararlılığı

Enzimlerin yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklılığını ortaya koymak için termal kararlılık çalışması yapıldı. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz 50°C'de belirli sürelerde (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 dakika) su banyosunda inkübe edilerek, enzim aktiviteleri ölçüldü ve termal kararlılıkları belirlendi (Şekil 4.8).



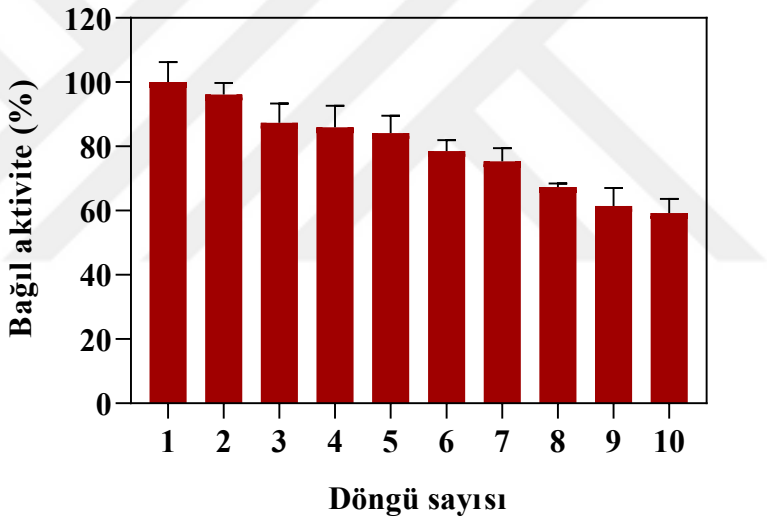
Şekil 4.8. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın termal kararlılığı

Sonuçlara göre serbest L-ASNaz'ın başlangıç aktivitesinden geriye %34'ü kalırken, PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz başlangıç aktivitesinin yaklaşık %60'ını korumuştur. Tarhan ve ark. (2022) yaptıkları çalışmada immobilize L-ASNaz 90 dakika sonunda aktivitesinin %65'ini korurken, bu çalışmada immobilize enzim 180 dakika sonunda aktivitesinin %60'ını koruyarak kullandığımız yöntemin olumlu etkisini ortaya koymuştur. Ayrıca, sıcaklık artışıyla birlikte immobilize L-ASNaz'ın aktivitesi daha yavaş bir düşüş göstermiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra, enzim ve destek materyali arasında oluşan bağlar enzimin hareket kabiliyetini sınırlar. Bu durumda sonuç olarak enzim dayanıklılığı artabilir ve zorlu koşullar altında enzimin yapısal değişiklikleri önlenebilir. Bu nedenle immobilize edilmiş enzimlerin termal kararlılığının daha yüksek olması muhtemeldir. İmmobilize enzimlerin termal kararlılıklarının yüksek olması endüstride, (özellikle gıda endüstrisinde) sürekli işlenerek kullanımlarına olanak vermektedir (Rodrigues ve ark., 2013).

4.2.5. Tekrar kullanılabilirlik

Ticari açıdan özellikle endüstriyel ölçekte uygulandığında enzimin yeniden kullanılabilir olması önemli bir faktördür. Ayrıca enzimlerin yeniden kullanılabilir olması maliyeti en aza indirmektedir. L-ASNaz immobilizasyonu sayesinde serbest L-ASNaz'ın aksine enzim her reaksiyon döngüsünden sonra geri kazanılabilir ve daha sonra yeniden

kullanılabilir. Her 15 dakikalık reaksiyon döngüsünden sonra PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz ortamdan alınarak tampon ile yıkandı ve bir sonraki reaksiyon döngüsü için yeni substrat çözeltisi ile karıştırıldı. Bu işlem 10 kez tekrarlanarak enzim aktivitesi ölçüldü ve bağıl aktiviteler hesaplandı (Şekil 4.9). Noma ve ark. (2021) tarafından yürütülen çalışmada immobilize enzim 10 tekrar kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %52'sini korurken, Monajati ve ark. (2018) tarafından yapılan bir başka çalışmada immobilize enzim 8 defa tekrar kullanım sonrasında aktivitesinin %42'sini korumuştur. Bu çalışma sonucunda immobilize L-ASNaz'ın ilk aktivitesinin neredeyse %60'ını koruduğu belirlendi. Nispeten de olsa enzim aktivitesinin azalması enzimin yapısının değişiminden veya enzimin sızıntısından olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın yeniden kullanım için uygun olduğunu göstermektedir.

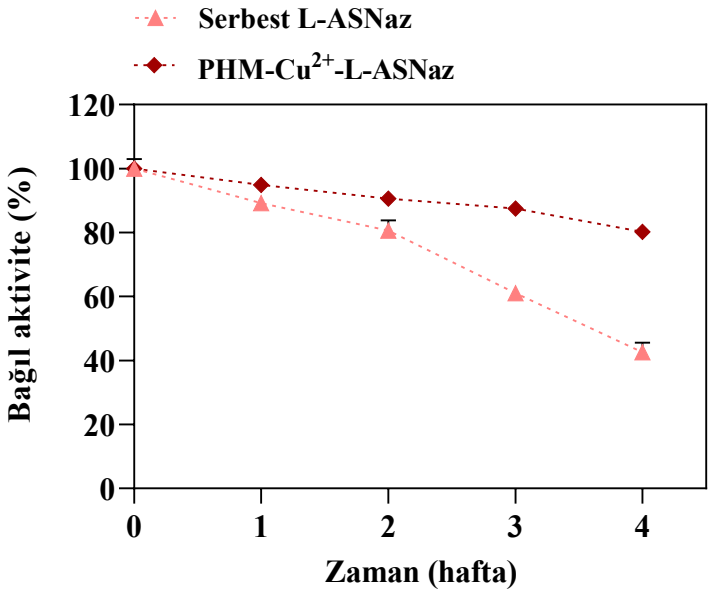


Şekil 4.9. PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın tekrar kullanılabilirliği

4.2.6. L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın depolama kararlılığı

Depolama kararlılığının yüksek olması enzimlerin ticari ölçekte kullanımını kolaylaştırır. Enzimlerin depolama sırasında stabilitelerinin düşük olması zaman içerisinde enzim aktivitesinde azalmaya neden olur. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz enzimlerinin uzun süreli depolama kararlılığını araştırmak için her iki enzim de oda sıcaklığında 4 hafta depolandı ve her hafta kalan aktiviteleri ölçüldü. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi her iki enzimin bağıl aktivitesinde benzer bir azalma gözlenmiştir. Ancak PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın kalan aktivitesi serbest L-ASNaz'a göre daha yavaş azalmıştır. Bunun nedeni immobilize enzimlerin destek materyali ile kurdukları etkileşimler sayesinde yapılarının daha kararlı hale gelmesi ve bu yüzden sıcaklık gibi çevresel faktörlerden önemli derecede etkilenmemesidir. Serbest L-ASNaz ve immobilize L-ASNaz 4 hafta sonra başlangıçtaki aktivitelerinin sırasıyla yaklaşık %58 ve %20'sini kaybetmiştir. Noma ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada immobilize enzim 4 hafta boyunca aktivitesinin %56,5'ini koruyarak yaptığımız çalışma ile benzer sonuçlar göstermiştir.

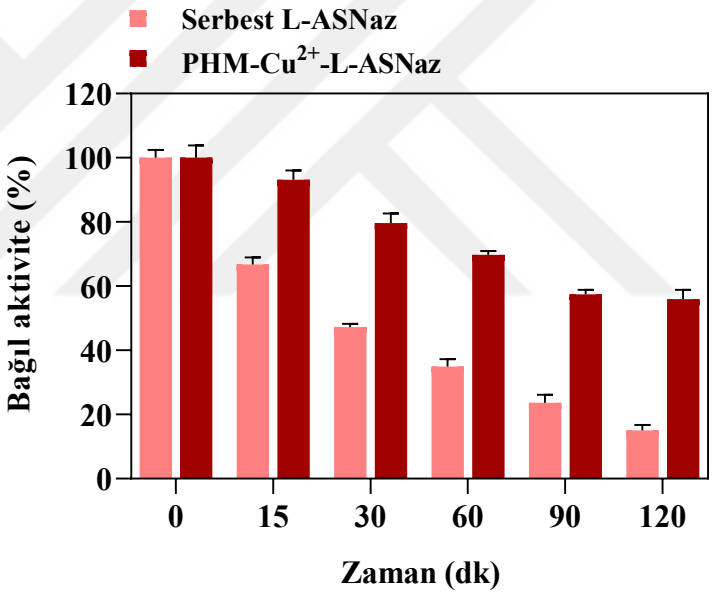
Bu sonuçlar serbest L-ASNaz'ın çevresel faktörlere karşı kararlılığını koruymadığını göstermektedir. Sonuç olarak L-ASNaz'ın uzun süreli stabilitesi PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri üzerine immobilize edilmesiyle önemli ölçüde artmıştır.



Şekil 4.10. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın depolama kararlılığı

4.2.7. Tripsin dayanıklılığı

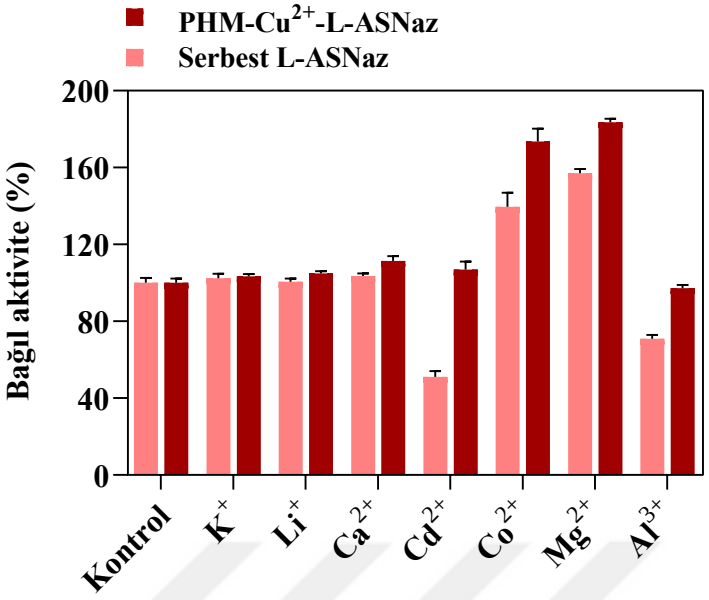
Enzimlerin proteaz enzimlerine karşı düşük dayanıklılıkları farmasötik uygulamaların önündeki en büyük engellerden biridir. Bu çalışma ile hem serbest L-ASNaz'ın hem de PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın tripsin hidrolizine karşı dayanımı belirlenmiştir. Sonuçlara göre immobilize enzimin tripsin parçalanmasına karşı dayanımının serbest L-ASNaz'a kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.11). Enzim çözeltilerine tripsin ilave edilmesiyle 120 dakika boyunca hidroliz işlemi takip edilmiştir. İşlemin sonucunda serbest L-ASNaz'ın neredeyse tamamı hidroliz olurken, PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın başlangıç aktivitesinin yaklaşık %45'i korunmuştur.



Şekil 4.11. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın tripsin enzimine karşı direnci

4.2.8. Metal iyonu etkisi

Enzimlerin belirli metal iyonlarına karşı dayanıklılığını değerlendirebilmek için serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz farklı metal iyonu çözeltileri ile inkübe edildi, daha sonra enzim aktiviteleri optimum koşullar altında ölçüldü.



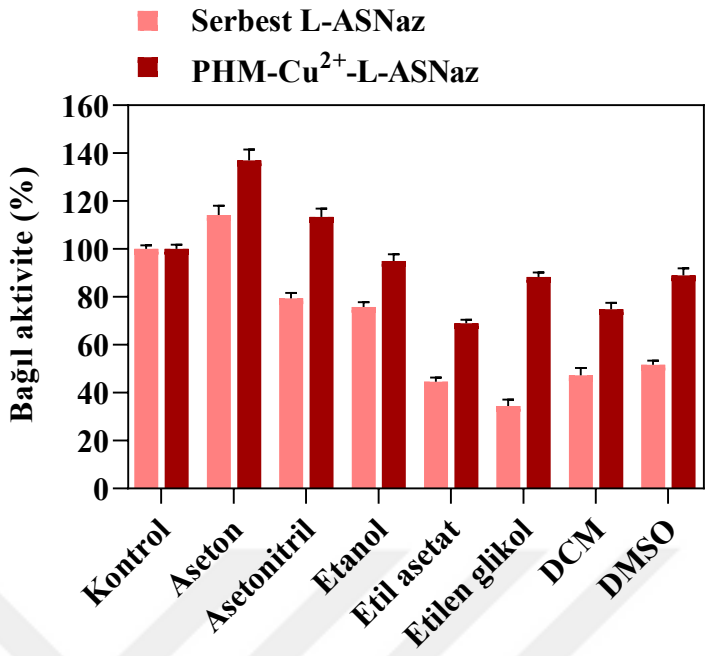
Şekil 4.12. Metal iyonlarının serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz aktivitesi üzerine etkisi

Elde edilen sonuçlara göre; Co^{2+} ve Mg^{2+} iyonları serbest ve immobilize L-ASNaz'ın aktivitesini belirgin bir şekilde arttırmıştır (Şekil 4.12). Cd^{2+} iyonu, serbest L-ASNaz'ın aktivitesinin azalmasına neden olurken, PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz aktivitesinde büyük bir değişikliğe neden olmamıştır. Al^{3+} katyonu serbest L-ASNaz'ın aktivitesinde %30 kayıba neden olurken, immobilize L-ASNaz aktivitesini neredeyse hiç değiştirmemiştir. Buna karşılık, K^{+}, Li^{+} ve Ca^{2+} katyonları varlığında enzim aktivitelerinde belirgin bir değişiklik olmamıştır. Sonuç olarak immobilize enzimin serbest enzime göre metal iyonları varlığında (K^{+}, Li^{+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}) inhibisyona uğramadığı söylenebilir. Literatüre bakıldığında; Ca^{2+}, Co^{2+} ve Mg^{2+} gibi katyonların, L-ASNaz aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (El-Naggar ve ark., 2018). Metal iyonları yumuşak, sınırda ve sert olarak sınıflandırılır. Protein yapısındaki amino asitler için farklı bağlanma özellikleri gösterirler; örneğin, sert metal iyonları (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Li^{2+}, Al^{3+}) Asp ve Glu gibi amino asitlerin O bağışlayıcı atomlarına bağlanırken, yumuşak/sınırda metal iyonları (Co^{2+}, K^{+}, Cd^{2+}) His ve Cys gibi amino asitlerin N ve S bağışlayıcı atomlarına bağlanır (Zhumabekova ve ark., 2024). Bu çalışmada, Co^{2+} ve Mg^{2+} serbest ve immobilize enzimin aktivitesini artırmıştır; bu bağlanma O, N ve S bağışlayıcı atomları aracılığıyla gerçekleşmiştir. Diğer taraftan, Cd^{2+} ve Al^{3+} gibi diğer metal iyonları, serbest enzim aktivitesini O, N ve S atomlarına bağlanarak azaltmıştır; bu durum, muhtemelen doğal

konformasyonun korunması için gereklidir. Ancak immobilize L-ASNaz'da aktivite azalmamıştır. Bu durum, muhtemelen immobilizasyonun polimerik destekle bağlanma yoluyla doğal konformasyonun stabilitesini artırmasından kaynaklanmaktadır (Zhumabekova ve ark., 2024).

4.2.9. Organik çözücü etkisi

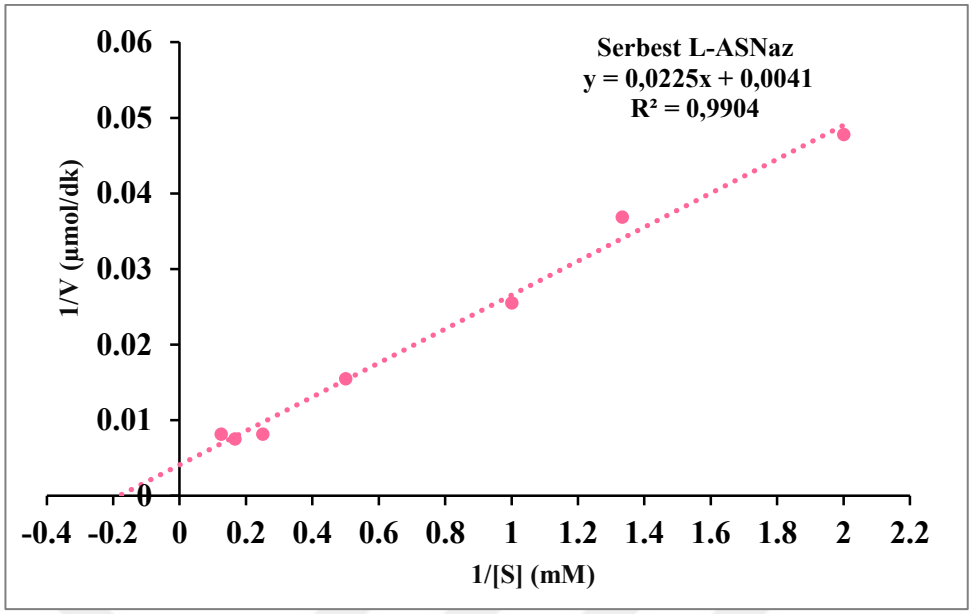
Organik çözücülerin (aseton, asetonitril, etanol, etil asetat, etilen glikol, diklorometan, DMSO) serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek için her iki enzim çözücülerin içerisinde oda sıcaklığında 24 saat bekletildikten sonra aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçlara göre aseton serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesini arttırmıştır (Şekil 4.13). Buna karşılık, asetonitril, immobilize enzimin aktivitesini arttırırken, serbest enzimin aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Etanol, etilen glikol, diklorometan (DCM) ve DMSO çözücüleri PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz aktivitesini önemli ölçüde değiştirmemiştir. Ancak serbest L-ASNaz aktivitesini sırasıyla %25, %66, %53 ve %50 oranında inhibe etmiştir. Daha az su molekülüne ihtiyaç duyan enzimler, organik ortamlarda daha yüksek bir reaksiyon hızına sahiptir (Lee ve Kim, 1995). Bu nedenle, reaksiyon hızı organik çözücülerin polarite indeksi ile yakından ilişkilidir. Organik çözücülerin polarite indeksi sırası DMSO > etilen glikol> asetonitril > aseton> etanol > etil asetat > DCM. Sonuçlar, düşük polarite indeksine sahip çözücülerin (etil asetat ve DCM) serbest L-ASNaz'ın aktivitesinde bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, aseton, asetonitril ve etanol immobilize L-ASNaz'ın aktivitesini artırmıştır. Sonuçlar PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın serbest L-ASNaz'a kıyasla organik çözücülere karşı daha yüksek kararlılığa sahip olduğunu göstermiştir.



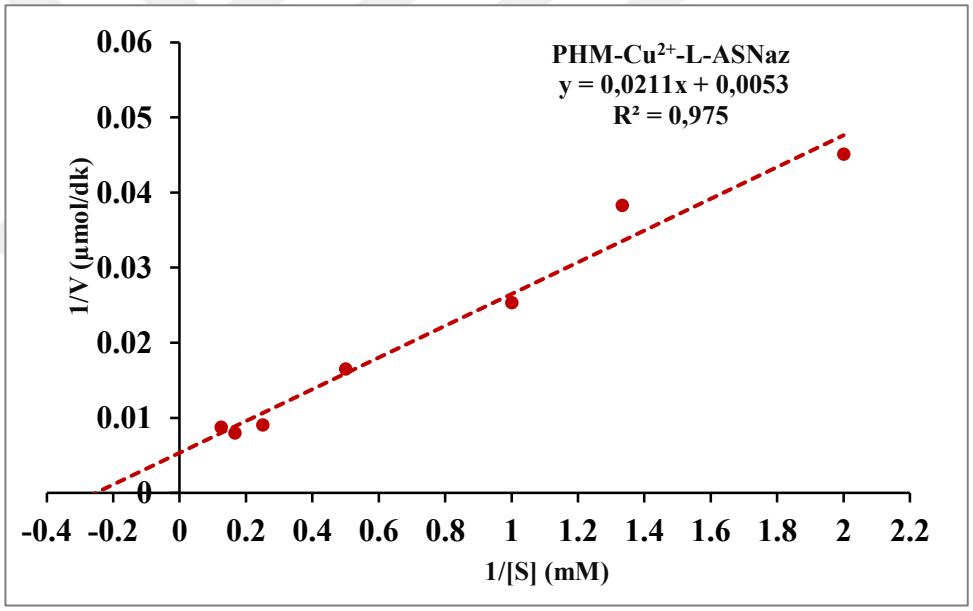
Şekil 4.13. Organik çözücülerin serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz aktivitesi üzerine etkisi

4.2.10. Kinetik parametreler

Hem serbest L-ASNaz hem de PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz için kinetik parametreler Lineweaver-Burk grafiği ile hesaplanmış ve Şekil 4.14'de gösterilmiştir. Serbest ve immobilize enzim için elde edilen *Km* değerleri sırasıyla 5,49 ve 3,98 mM olarak belirlenmiştir. Acet (2023)'in çalışmasında serbest ve immobilize L-ASNaz için sırasıyla 6.595 ve 1.902 mM Km ile 212.766 ve 49.02 µM/dk Vmax belirlenmiştir; bu sonuçlar, çalışmamızda serbest ve immobilize enzimler arasındaki benzerlikleri göstermektedir. İmmobilizasyon işleminden sonra *Km* değeri düşmektedir. Bu sonuç immobilize enzimin daha düşük substrat derişiminde maksimum katalitik verime ulaştığını açıkça göstermektedir. *Km* değerinin düşük olması, enzimin substratına olan afinitesinin yüksek olduğunu gösterir. Ayrıca serbest L-ASNaz'ın *Vmax* değeri 243,90 µmol/dk ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın 188,68 µmol/dk olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, L-ASNaz'ın PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartikülleri üzerine immobilizasyonunun substrat afinitesini arttırdığını ve enzim-substrat bileşiklerinin oluşumunu desteklediğini göstermiştir.



(a)



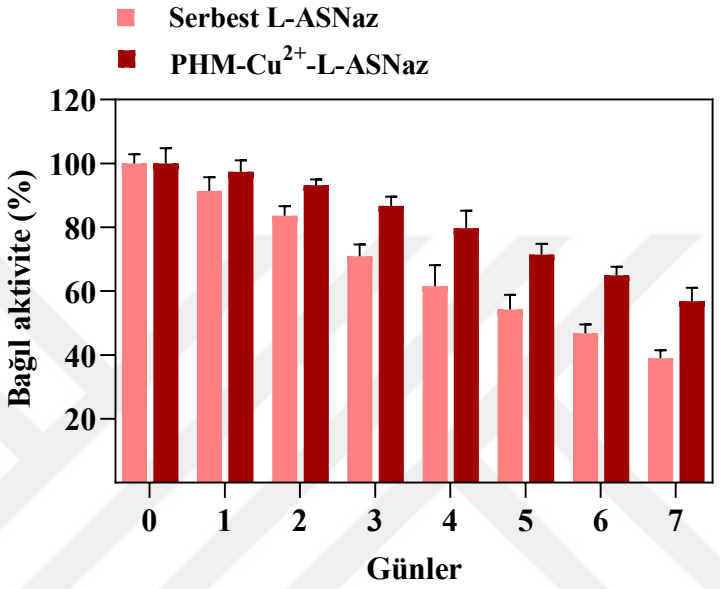
(b)

Şekil 4.14. Serbest L-ASNaz (a) ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz (b) için Lineweaver-Burk grafikleri

4.2.11. *In vitro* yarılanma ömrü

Hem serbest L-ASNaz hem de PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın biyouyumluluk özelleğini gözlemleyebilmek için yapay serum ortamında *in vitro* yarılanma ömrü belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzim 1 hafta boyunca 37°C yapay insan serumu ile inkübe edildi ve optimum koşullar altında her gün aktivitesi ölçüldü. Şekil 4.15'de gösterildiği gibi

enzimlerin aktivitesinde başlangıç aktivitesiyle karşılaştırıldığında her gün stabil bir düşüş gözlendi. 7 gün sonunda immobilize L-ASNaz bağıl aktivitesinin %56.87'sini korurken, serbest L-ASNaz bağıl aktivitesinin %38.98'ini korumuştur. Bunun sonucunda immobilize enzimin serbest enzime kıyasla yapay insan serumu ortamında daha kararlı olduğu görülmüştür.



Şekil 4.15. Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın *in vitro* yarı ömrü

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, L-ASNaz enzimi metal şelat afinite tekniği ile PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri üzerine immobilize edildi. L-ASNaz ve immobilize L-ASNaz enziminin aktivitesine etki eden parametreler araştırılarak karşılaştırma yapıldı. Serbest ve immobilize enzimin termal ve depolama kararlılığı, tripsin enzimine karşı dirençleri, kinetik özellikleri ve immobilize enzimin tekrar kullanılabilirliği araştırıldı. İmmobilize L-ASNaz enzimi, yapay serumda L-Asn hidrolizi için kullanıldı ve aktivitesi serbest L-ASNaz aktivitesi ile karşılaştırıldı. Çalışmada elde edilen bulgular aşağıdaki gibidir:

- Emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri, MAH monomerlerinin Cu^{2+} iyonlarıyla etkileştirilmesi sonrasında EGDMA ile çapraz bağlanmasıyla elde edilmiştir. Daha sonra, nanopartiküller SEM-EDX, FTIR, TEM, Zeta potansiyel ve boyut dağılımı analizleri ile karakterize edilmiştir.
- PHM-Cu^{2+}'nin SEM görüntüleri nanopartiküllerin ortalama 50 nm çapa sahip küresel bir yapıda olduğunu göstermiştir.
- SEM-EDX analizi PHM-Cu^{2+} ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartiküllerinin karbon (C), azot (N), oksijen (O) ve bakır (Cu) elementleri içerdiğini göstermiştir. Ayrıca PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz kükürt (S) elementini de içermektedir ve daha yüksek miktarda N ve O atomuna sahiptir.
- Zeta potansiyel ve boyut analizinde elde edilen sonuçlar PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz nanopartiküllerin Zeta potansiyel değerinin -20.1 mV olduğunu göstermektedir.
- İmmobilizasyon verimi %86.46 ± 3.32, aktivite verimi %73.65 ± 4.78, immobilizasyon etkinliği ise %85.18 ± 4.36 olarak hesaplanmıştır.
- Serbest L-ASNaz'ın optimum pH'ı 8,5, PHM-Cu^{2+} -L-ASNaz'ın optimum pH'ı 7 olarak belirlenmiştir.
- Serbest L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın optimum sıcaklığı sırasıyla 45°C ve 50°C olarak bulunmuştur.
- Serbest ve immobilize enzimin termal kararlılığı çalışılmıştır. Serbest ve immobilize L-ASNaz sırasıyla aktivitesinin %34'ünü ve %60'ını korumuştur.

- PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz enziminin tekrar kullanabilirliğini gözlemek amacıyla optimum koşullarda 10 kez aktivitesi ölçüldü. PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz enzimi başlangıç aktivitesinin %60'ını koruduğu belirlendi.
- L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz enzimlerinin uzun süreli depolama kararlılığı araştırılmıştır. L-ASNaz 4 hafta sonra başlangıçtaki aktivitesinin %58'ini kaybederken, immobilize L-ASNaz yaklaşık %20'sini kaybetmiştir.
- L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın tripsin hidrolizine karşı dayanımı araştırılmıştır. L-ASNaz'ın neredeyse tamamı hidroliz olurken, PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın başlangıç aktivitesinin yaklaşık %45'ini koruduğu gözlenmiştir. Bu sonuç immobilize L-ASNaz'ın proteaz enzimlerine karşı daha dayanıklı olduğunu göstermektedir.
- L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın farklı metal iyonlarına karşı dayanıklılığı araştırılmıştır. Co^{2+} ve Mg^{2+} katyonları serbest ve immobilize L-ASNaz'ın aktivitesini arttırmıştır. Cd^{2+} katyonu, serbest L-ASNaz'ın aktivitesinde düşüşe neden olmuştur. Al^{3+} iyonu, serbest L-ASNaz'ın aktivitesinde %30 kayıba neden olmuştur.
- Organik çözücülerin enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Aseton, serbest ve immobilize enzimlerin aktivitesini arttırırken, asetonitril PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın aktivitesini arttırmıştır ve L-ASNaz'ın aktivitesinde azalmaya neden olmuştur. Etanol, etilen glikol, diklorometan ve DMSO çözücüleri serbest enzim aktivitesinde sırasıyla %25, %66, %53 ve %50 oranında azalmaya neden olmuştur.
- Serbest enzim için elde edilen *Km* değeri 5,49 iken, immobilize enzimin *Km* değeri 3,98 mM olarak belirlenmiştir. L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın Vmax değeri sırasıyla 243,90 µmol/dk ve 188,68 µmol/dk olarak belirlenmiştir.
- L-ASNaz ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın yapay serum ortamında 7 gün sonunda bağıl aktivitelerinin sırasıyla %38.98 ve %56.87'sini korumuştur. Sonuçlar, PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın L-ASNaz'a kıyasla yapay insan serumu ortamında kararlılığını koruduğunu göstermektedir.

- Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, PHM-Cu^{2+} nanopartiküllerinin dayanıklı ve uzun ömürlü olduğunu kanıtlamıştır. L-ASNaz, PHM-Cu^{2+} nanopartikülleri üzerine başarılı bir şekilde immobilize edilmiş ve PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın aktivitesi ve kararlılığı L-ASNaz'dan daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, deneyler PHM-Cu^{2+}-L-ASNaz'ın yapay serum ortamında başlangıç aktivitesinin yarısından fazlasını koruduğunu göstermiştir. Bundan sonraki aşamada *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

Abdelfatah, A. S., & Mahmassani, H. S. (1998). System optimal time-dependent path assignment and signal timing in traffic network. *Transportation Research Record, 1645(1)*, 185-193. https://doi.org/10.3141/1645-23

Abdel-Fattah, Y. R., & Olama, Z. A. (2002). L-asparaginase production by Pseudomonas aeruginosa in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. *Process Biochemistry*, 38(1), 115-122. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00067-5

Acet, Ö. (2023). Design of Enhanced Smart Delivery Systems for Therapeutic Enzymes: Kinetic and Release Performance of Dual Effected Enzyme-Loaded Nanopolymers. *Catalysis Letters*, 1-11. https://doi.org/10.1007/s10562-023-04418-8

Aghaiypour, K., Wlodawer, A., & Lubkowski, J. (2001). Structural basis for the activity and substrate specificity of Erwinia chrysanthemi L-asparaginase. *Biochemistry*, 40(19), 5655-5664. https://doi.org/10.1021/bi0029595

AIa, N., Sokolov, N. N., Kozlov, E. A., & Kutsman, M. E. (1975). Isolation and properties of a homogeneous L-asparaginase preparation from Pseudomonas fluorescens AG. *Biokhimiia (Moscow, Russia)*, 40(5), 984-989.

Allison, J. P., Davidson, L., Gutierrez-Hartman, A., & Kitto, G. B. (1972). Insolubilization of L-asparaginase by covalent attachment to nylon tubing. *Biochemical and biophysical research communications*, 47(1), 66-73. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(72)80011-1

Amena, S., Vishalakshi, N., Prabhakar, M., Dayanand, A., & Lingappa, K. (2010). Production, purification and characterization of L-asparaginase from Streptomyces gulbargensis. *Brazilian journal of Microbiology*, 41, 173-178. https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100025

Armstrong, E. F. (1933). Enzymes: a discovery and its consequences. *Nature*, 131(3311), 535-537. https://doi.org/10.1038/131535a0

Arnold, F. H. (1991). Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. *Bio/technology*, 9(2), 151-156. https://doi.org/10.1038/nbt0291-151

Asselin, B. L., Kreissman, S., Coppola, D. J., Bernal, S. D., Leavitt, P. R., Gelber, R. D. & Cohen, H. J. (1999). Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology*, 21(1), 6-12.

Asthana, N., & Azmi, W. (2003). Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme.

Babaki, M., Yousefi, M., Habibi, Z., Brask, J., & Mohammadi, M. (2015). Preparation of highly reusable biocatalysts by immobilization of lipases on epoxy-functionalized

silica for production of biodiesel from canola oil. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 23-31. https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.04.020

Avramis, V. I., & Panosyan, E. H. (2005). Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations: the past, the present and recommendations for the future. *Clinical pharmacokinetics*, *44*, 367-393. https://doi.org/10.2165/00003088-200544040-00003

Bahraman, F., & Alemzadeh, I. (2017). Optimization of L-asparaginase immobilization onto calcium alginate beads. *Chemical Engineering Communications*, 204(2), 216-220.

Bahreini, E., Aghaiypour, K., Abbasalipourkabir, R., Mokarram, A. R., Goodarzi, M. T., & Saidijam, M. (2014). Preparation and nanoencapsulation of L-asparaginase II in chitosan-tripolyphosphate nanoparticles and in vitro release study. *Nanoscale research letters*, 9, 1-13. https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-340

Bai, L., Sun, W., Huang, M., Li, L., Geng, C., Liu, K., & Yan, D. (2020). Study on the Methods of Separation and Detection of Chelates. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 50(1), 78-89. https://doi.org/10.1080/10408347.2019.1573657

Bakhshpour, M., Derazshamshir, A., Bereli, N., Elkak, A., & Denizli, A. (2016). [PHEMA/PEI]–Cu (II) based immobilized metal affinity chromatography cryogels: application on the separation of IgG from human plasma. *Materials Science and Engineering: C*, 61, 824-831. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.005

Bakhshpour, M., Piskin, A. K., Yavuz, H., & Denizli, A. (2019). Quartz crystal microbalance biosensor for label-free MDA MB 231 cancer cell detection via notch-4 receptor. *Talanta*, 204, 840-845. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.060

Bakhshpour, M., Yavuz, H., & Denizli, A. (2018). Controlled release of mitomycin C from PHEMAH–Cu (II) cryogel membranes. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 946-954. https://doi.org/10.1080/21691401.2018.143984

Balakrish-Nair, G., Selvakumar, N., Chandramohan, D., & Natarajan, R. (1977). Distribution & activity of L asparaginase producing fungi in the marine environment of Porto Novo. *Indian journal of marine sciences*.

Balcao, V. M., Mateo, C., Fernández-Lafuente, R., Malcata, F. X., & Guisan, J. M. (2001). Structural and functional stabilization of L-asparaginase via multisubunit immobilization onto highly activated supports. *Biotechnology progress*, 17(3), 537-542. https://doi.org/10.1021/bp000163r

Barros, R. A., Cristóvão, R. O., Carabineiro, S. A., Neves, M. C., Freire, M. G., Faria, J. L., & Silva, C. G. (2022). Immobilization and Characterization of L-Asparaginase over Carbon Xerogels. *BioTech*, 11(2), 10. https://doi.org/10.3390/biotech11020010

Baskar, G., & Renganathan, S. (2009). Production of L-asparaginase from natural substrates by Aspergillus terreus MTCC 1782: Effect of substrate, supplementary nitrogen

source and L-asparagine. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 7(1). https://doi.org/10.2202/1542-6580.2050

Batool, T., Makky, E. A., Jalal, M., & Yusoff, M. M. (2016). A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178, 900-923. https://doi.org/10.1007/s12010-015-1917-3

Bell, T. L., & Adams, M. A. (2004). Ecophysiology of ectomycorrhizal fungi associated with Pinus spp. in low rainfall areas of Western Australia. *Plant Ecology*, 171(1-2), 35-52. https://doi.org/10.1023/B:VEGE.0000029372.78102.9d

Blanco, R. M., Terreros, P., Fernández-Pérez, M., Otero, C., & Díaz-González, G. (2004). Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 30(2), 83-93. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2004.03.012

Boice Jr, J. D., Mandel, J. S., Doody, M. M., Yoder, R. C., & Bsrt, R. M. (1992). A health survey of radiologic technologists. *Cancer*, 69(2), 586-598. https://doi.org/10.1002/1097-0142

Bon, E. P., Carvajal, E., Stanbrough, M., Rowen, D., & Magasanik, B. (1997). Asparaginase II of Saccharomyces cerevisiae: GLN3/JURE2 Regulation of a Periplasmic Enzyme. *Applied biochemistry and biotechnology*, 63, 203-212. https://doi.org/10.1007/BF02920425

Borek, D., & Jaskólski, M. (2001). Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica*, 48(4), 893-902. https://doi.org/10.18388/abp.2001_3855

Borek, D., Podkowinski, J., Kisiel, A., & Jaskolski, M. (1999). Isolation and characterization of cDNA encoding L-asparaginase from Lupinus luteus. *Plant Physiol*, 119, 1568.

Borisova, A. A., El'darov, M. A., Zhgun, A. A., Aleksandrova, S. S., Omel'ianiuk, N. M., Sokov, B. N., ... & Sokolov, N. N. (2003). Purification and properties of recombinant Erwinia carotovora L-asparaginase expressed in E. coli cells. *Biomeditsinskaia Khimiia*, 49(5), 502-507.

Borkotaky, B., & Bezbaruah, R. L. (2002). Production and properties of asparaginase from a new Erwinia sp. *Folia microbiologica*, 47, 473-476. https://doi.org/10.1007/BF02818783

Boros, Z., Weiser, D., Márkus, M., Abaháziová, E., Magyar, Á., Tomin, A., & Poppe, L. (2013). Hydrophobic adsorption and covalent immobilization of Candida antarctica lipase B on mixed-function-grafted silica gel supports for continuous-flow biotransformations. *Process Biochemistry*, 48(7), 1039-1047. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.05.002

Boudrant, J., Woodley, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry*, 90, 66-80.

https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026

Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*, 15-31. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2

Broome, J. D. (1961). Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature*, 191(4793), 1114-1115. https://doi.org/10.1038/1911114a0

Broome, J. D. (1963). Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects: I. properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. *The Journal of experimental medicine*, 118(1), 99-120. https://doi.org/10.1084/jem.118.1.99

Cabral, J. M., & Kennedy, J. F. (1991).Covalent and coordination immobilization of proteins. *Bioprocess technology*, 14, 73-138.

Cachumba, J. J. M., Antunes, F. A. F., Peres, G. F. D., Brumano, L. P., Santos, J. C. D., & Silva, S. S. D. (2016). Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *Brazilian journal of microbiology*, 47, 77-85. https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004

Cakir, O. (2019). A molecularly imprinted nanofilm-based quartz crystal microbalance sensor for the real-time detection of pirimicarb. *Journal of Molecular Recognition*, 32(9), e2785. https://doi.org/10.1002/jmr.2785

Castro, D., Marques, A. S. C., Almeida, M. R., de Paiva, G. B., Bento, H. B., Pedrolli, D. B., & Santos-Ebinuma, V. C. (2021). L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics. *Applied microbiology and biotechnology*, 105, 4515-4534. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11359-y

Chen, B., Hu, J., Miller, E. M., Xie, W., Cai, M., & Gross, R. A. (2008). Candida antarctica lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro-and nanobeads: catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules*, 9(2), 463-471. https://doi.org/10.1021/bm700949x

Cheung, R. C. F., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2012). Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 96, 1411-1420. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0

Chheda, A. H., & Vernekar, M. R. (2015). A natural preservative [epsilon]-poly-L-lysine: fermentative production and applications in food industry. *International Food Research Journal*, 22(1), 23.

Chien, W. W., Allas, S., Rachinel, N., Sahakian, P., Julien, M., Le Beux, C., & Salles, G. (2014). Pharmacology, immunogenicity, and efficacy of a novel pegylated recombinant Erwinia chrysanthemi-derived L-asparaginase. *Investigational new*

drugs, 32, 795-805. https://doi.org/10.1007/s10637-014-0102-9

Chouhan, R., & Bajpai, A. K. (2009). Real time in vitro studies of doxorubicin release from PHEMA nanoparticles. *Journal of nanobiotechnology*, 7, 1-12. https://doi.org/10.1186/1477-3155-7-5

Cirillo, G., Nicoletta, F. P., Curcio, M., Spizzirri, U. G., Picci, N., & Iemma, F. (2014). Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand. *Reactive and Functional Polymers*, 83, 62-69. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2014.07.010

Clementi, A. (1922). La désamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espéces animales et la signification physio logique de sa presence dans l'organisme. *Archives Internationales de Physiologie*, 19(4), 369-398. https://doi.org/10.3109/13813452209145156

Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta potential measurement. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*, 63-70. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6

Curran, M. P., Daniel, R. M., Guy, G. R., & Morgan, H. W. (1985). A specific L-asparaginase from Thermus aquaticus. *Archives of biochemistry and biophysics*, 241(2), 571-576. https://doi.org/10.1016/0003-9861(85)90582-X

Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3, 1-9. https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7

Daverey, A., & Pakshirajan, K. (2010). Kinetics of growth and enhanced sophorolipids production by Candida bombicola using a low-cost fermentative medium. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160, 2090-2101. https://doi.org/10.1007/s12010-009-8797-3

Dejong, P. J. (1972). L-Asparaginase production by Streptomyces griseus. *Applied microbiology*, 23(6), 1163-1164. https://doi.org/10.1128/am.23.6.1163-1164.1972

Dhanam, J. G., & Kannan, S. (2013). L-asparaginase-Types, perspectives and applications. *Advanced BioTech*, 13(1), 01-05.

Dhevendaran, K., & Annie, K. (1999). Antibiotic and L-asparaginase activity of streptomycetes isolated from fish, shellfish and sediment of Veli estuarine lake along Kerala coast.

Dhevendaran, K., & YK, A. (2012). L-asparaginase activity in growing conditions of Streptomyces spp. associated with Therapon jarbua and Villorita cyprinoids of Veli Lake, South India.

Dolowy, W. C., Henson, D., Cornet, J., & Sellin, H. (1966). Toxic and antineoplastic effects

of l-asparaginase: Study of mice with lymphoma and normal monkeys and report on a child with leukemia. *Cancer*,19(12), 1813-1819. https://doi.org/10.1002/1097-0142

Domínguez-Villegas, V., Clares-Naveros, B., García-López, M. L., Calpena-Campmany, A. C., Bustos-Zagal, P., & Garduño-Ramírez, M. L. (2014). Development and characterization of two nano-structured systems for topical application of flavanones isolated from Eysenhardtia platycarpa. *Colloids and surfaces b: biointerfaces*, *116*, 183-192. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.12.009

D'souza, S. F. (1999). Immobilized enzymes in bioprocess. *Current Science*, 69-79.

Duval, M., Suciu, S., Ferster, A., Rialland, X., Nelken, B., Lutz, P., ... & Philippe, N. (2002). Comparison of Escherichia coli–asparaginase with Erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 99(8), 2734-2739. https://doi.org/10.1182/blood.V99.8.2734

Eden, O. B., Shaw, M. P., Lilleyman, J. S., & Richards, S. (1990). Non-randomised study comparing toxicity of escherichia coli and erwinia asparaginase in children with leukaemia. *Medical and pediatric oncology*, 18(6), 497-502. https://doi.org/10.1002/mpo.2950180612

El-Naggar, N. E. A., Deraz, S. F., El-Ewasy, S. M., & Suddek, G. M. (2018). Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from Streptomyces brollosae NEAE-115. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 19(1), 1-15. https://doi.org/10.1186/s40360-018-0242-1

El-Naggar, N. E., El-Ewasy, S. M., & El-Shweihy, N. M. (2014). Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: the pros and cons. *Int J Pharmacol*, 10(4), 182-199. https://doi.org/10.3923/ijp.2014.

Erenler, S. O., & Geckil, H. (2014). Effect of vitreoscilla hemoglobin and culture conditions on production of bacterial L-asparaginase, an oncolytic enzyme. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173, 2140-2151. https://doi.org/10.1007/s12010-014-1016-x

Foda, M. S., Zedan, H. H., & Hashem, S. A. (1980). Formation and properties of L-glutaminase and L-asparaginase activities in Pichia polymorpha. *Acta Microbiologica Polonica*, 29(4), 343-352.

Fonseca, M. H. G., da Silva Fiúza, T., de Morais, S. B., & Trevizani, R. (2021). Circumventing the side effects of L-asparaginase. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111616. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111616

Gaofu, Q., Rongyue, C., Dan, M., Xiuyun, Z., Xuejun, W., Jie, W., & Jingjing, L. (2006). Asparaginase display of human cholesteryl ester transfer protein (CETP) B cell epitopes for inducing high titers of anti-CETP antibodies in vivo. *Protein and Peptide Letters*, 13(2), 149-154. https://doi.org/10.2174/092986606775101689

Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16), 2885-2904. https://doi.org/10.1002/adsc.201100534

Ghosh, S., Chaganti, S. R., & Prakasham, R. S. (2012). Polyaniline nanofiber as a novel immobilization matrix for the anti-leukemia enzyme l-asparaginase. *Journal of molecular catalysis b: enzymatic*, 74(1-2), 132-137. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.09.009

Gombotz, W. R., Hoffman, A. S., Schmer, G., & Uenoyama, S. (1985). The immobilization of L-asparaginase on porous hollow fiber plasma filters. *Journal of Controlled Release*, 2, 375-383. https://doi.org/10.1016/0168-3659(85)90059-8

Gómez, J. M., Romero, M. D., Fernández, T. M., & Díez, E. (2012). Immobilization of β-glucosidase in fixed bed reactor and evaluation of the enzymatic activity. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35, 1399-1405. https://doi.org/10.1007/s00449-012-0728-y

Göktürk, I., Bakhshpour, M., Çimen, D., Yılmaz, F., Bereli, N., & Denizli, A. (2022). SPR Signal Enhancement With Silver Nanoparticle-Assisted Plasmonic Sensor for Selective Adenosine Detection. *IEEE Sensors Journal*, 22(15), 14862-14869. https://doi.org/10.1109/JSEN.2022.3186518

Guisan, J. M. (2013). New opportunities for immobilization of enzymes. *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*, 1-13. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_1

Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2022). Metal ions, metal chelators and metal chelating assay as antioxidant method. *Processes*, 10(1), 132. https://doi.org/10.3390/pr10010132

Gupta, N., Mishra, S., & Basak, U. C. (2007). Occurrence of Streptomyces aurantiacus in mangroves of Bhitarkanika. *Malaysian J Microbiol*, 3, 7-14.

Gür, S. D., Bakhshpour, M., & Denizli, A. (2022). Nanoscale SPR sensor for the ultrasensitive detection of the ovarian cancer marker carbohydrate antigen 125. *New Journal of Chemistry*, 46(15), 7263-7270. https://doi.org/10.1039/D2NJ00127F

Haroun, A. A., Ahmed, E. F., & Hakeim, O. A. Biointerface research in applied chemistry. https://doi.org/10.33263/BRIAC104.733740

Heeschen, V., Matlok, J., Schrader, S., & Rudolph, H. (1996). Asparagine catabolism in bryophytes: Purification and characterization of two L-asparaginase isoforms from Sphagnum fallax. *Physiologia Plantarum*, 97(2), 402-410. https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1996.970227.x

Helfferich, F. (1961). 'Ligand exchange': a novel separation technique. *Nature*, 189(4769),

1001-1002. https://doi.org/10.1038/1891001a0

Hendriksen, H. V., Kornbrust, B. A., Østergaard, P. R., & Stringer, M. A. (2009). Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from Aspergillus oryzae. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4168-4176. https://doi.org/10.1021/jf900174q

Hendriksen, H. V., Kornbrust, B. A., Østergaard, P. R., & Stringer, M. A. (2009). Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from Aspergillus oryzae. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4168-4176. https://doi.org/10.1021/jf900174q

Homaei, A. (2015). Enzyme immobilization and its application in the food industry. *Advances in food biotechnology*, 145-164. https://doi.org/10.1002/9781118864463.ch09

Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F., & Stevanato, R. (2013). Enzyme immobilization: an update. *Journal of chemical biology*, 6, 185-205. https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9

Howard, J. B., & Carpenter, F. H. (1972). L-Asparaginase from Erwinia carotovora: substrate specificity and enzymatic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 247(4), 1020-1030. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)45610-X

Hymavathi, M., Sathish, T., Rao, C. S., & Prakasham, R. S. (2009). Enhancement of L-asparaginase production by isolated Bacillus circulans (MTCC 8574) using response surface methodology. *Applied biochemistry and biotechnology*, 159, 191-198. https://doi.org/10.1007/s12010-008-8438-2

Illarionova, N. G., Petrov, L. N., Olennikova, L. V., Roshchin, S. N., Pasechnik, A., Khalyapin, B. D., ... & Shtukina, T. B. T. B. (1980). Study of L-asparaginase EC-3.5. 1.1 secondry structure in a wide pH region. *Molekulyamaya Biologiya (Moscow)*, 14(4), 951-955.

Iraninasab, S., Homaei, A., Mosaddegh, E., & Torkzadeh-Mahani, M. (2023). Polyamidoamine Dendrimers Functionalized with ZnO-Chitosan Nanoparticles as an Efficient Surface for L-asparaginase Immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-21. https://doi.org/10.1007/s12010-023-04590-y

IuV, G., Chuplygina, E. G., & Klement'eva, T. A. (1981). Immobilization of Citrobacter L-asparaginase in polyacrylamide gel. *Voprosy meditsinskoi khimii*, 27(4), 534-537.

Ivry, S. L., Meyer, N. O., Winter, M. B., Bohn, M. F., Knudsen, G. M., O'Donoghue, A. J., & Craik, C. S. (2018). Global substrate specificity profiling of post-translational modifying enzymes. *Protein Science*, 27(3), 584-594. https://doi.org/10.1002/pro.3352

Izadpanah Qeshmi, F., Javadpour, S., Malekzadeh, K., Tamadoni Jahromi, S., &

Rahimzadeh, M. (2014). Persian gulf is a bioresource of potent L-asparaginase producing bacteria: Isolation & molecular differentiating. *International Journal of Environmental Research*, 8(3), 813-818.

Jalilzadeh, M., Uzun, L., Şenel, S., & Denizli, A. (2016). Specific heavy metal ion recovery with ion-imprinted cryogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(10). https://doi.org/10.1002/app.43095

Janin, J., Rodier, F., Chakrabarti, P., & Bahadur, R. P. (2007). Macromolecular recognition in the protein data bank. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 63(1), 1-8. https://doi.org/10.1107/S090744490603575X

Jaskolski, M., Kozak, M., Lubkowski, J., Palm, G., & Wlodawer, A. (2001). Structures of two highly homologous bacterial L-asparaginases: a case of enantiomorphic space groups. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 57(3), 369-377. https://doi.org/10.1107/S0907444900020175

Jean-Francois, J., D'Urso, E. M., & Fortier, G. (1997). Immobilization of L-asparaginase into a biocompatible poly (ethylene glycol)-albumin hydrogel: evaluation of performance *in vivo*. *Biotechnology and applied biochemistry*, 26(3), 203-212.

Jesionowski, T., Zdarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, 20, 801-821. https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y

Kidd, J. G. (1953). Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum: I. course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *The Journal of experimental medicine*, 98(6), 565-582. https://doi.org/10.1084/jem.98.6.565

Kil, J. O., Kim, G. N., & Park, I. (1995). Extraction of extracellular L-asparaginase from Candida utilis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(4), 749-750. https://doi.org/10.1271/bbb.59.749

Kim, M. I., Ham, H. O., Oh, S. D., Park, H. G., Chang, H. N., & Choi, S. H. (2006). Immobilization of Mucor javanicus lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 39(1-4), 62-68. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.01.028

Kotzia, G. A., Lappa, K., & Labrou, N. E. (2007). Tailoring structure–function properties of L-asparaginase: engineering resistance to trypsin cleavage. *Biochemical Journal*, 404(2), 337-343. https://doi.org/10.1042/BJ20061708

Kozak, M., & Jurga, S. (2002). A comparison between the crystal and solution structures of Escherichia coli asparaginase II. *Acta Biochimica Polonica*, 49(2), 509-513.

Kozak, M., Jaskólski, M., & Röhm, K. (2000). Preliminary crystallographic studies of Y25F mutant of periplasmic Escherichia coli L-asparaginase. *Acta Biochimica Polonica*, 47(3), 807-814.

Kuldeep Kumar, N. V. (2012). The Various Sources & Application of L-Asparaginase. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, 2, 2231-2560.

Kumar, K., Kataria, M., & Verma, N. (2013). Plant asparaginase-based asparagine biosensor for leukemia. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 41(3), 184-188. https://doi.org/10.3109/10731199.2012.716062

Kumar, K., Kaur, J., Walia, S., Pathak, T., & Aggarwal, D. (2014). L-asparaginase: an effective agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 55(2), 256-262. https://doi.org/10.3109/10428194.2013.803224

Kuo, W. H. K., & Chase, H. A. (2011). Exploiting the interactions between poly- histidine fusion tags and immobilized metal ions. *Biotechnology letters*, 33, 1075-1084. https://doi.org/10.1007/s10529-011-0554-3

Kwaśniewska, K., Gadzała-Kopciuch, R., & Buszewski, B. (2015). Magnetic molecular imprinted polymers as a tool for isolation and purification of biological samples. *Open Chemistry*, 13(1), 000010151520150137. https://doi.org/10.1515/chem-2015-0137

Lalonde, J., & Margolin, A. (2002). Immobilization of enzymes. *Enzyme catalysis in organic synthesis: a comprehensive handbook*, 163-184. https://doi.org/10.1002/9783527618262.ch6

Lee, S. B., & Kim, K. J. (1995). Effect of water activity on enzyme hydration and enzyme reaction rate in organic solvents. *Journal of fermentation and bioengineering*, *79*(5), 473-478. https://doi.org/10.1016/0922-338X(95)91264-6

Loughran, S. T., & Walls, D. (2011). Purification of poly-histidine-tagged proteins. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*, 311-335. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-913-0_17

Lubkowski, J., Dauter, M., Aghaiypour, K., Wlodawer, A., & Dauter, Z. (2003). Atomic resolution structure of Erwinia chrysanthemi L-asparaginase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59(1), 84-92. https://doi.org/10.1107/S0907444902019443

Lubkowski, J., Palm, G. J., Gilliland, G. L., Derst, C., Röhm, K. H., & Wlodawer, A. (1996). Crystal structure and amino acid sequence of Wolinella succinogenesl-asparaginase. *European journal of biochemistry*, 241(1), 201-207. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0201t.x

Lyklema, J. (1984). Proteins at solid—liquid interfaces A colloid-chemical review. *Colloids and Surfaces*, 10, 33-42. https://doi.org/10.1016/0166-6622(84)80005-0

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. http://dx.doi.org/10.1021/acsomega.2c07560

MAITA, T., MOROKUMA, K., & MATSUDA, G. (1979). Amino acid sequences of the tryptic peptides from carboxymethylated L-asparaginase from Escherichia coli. https://doi.org/10.1515/bchm2.1979.360.2.1483

Maladkar, N. K., Singh, V. K., & Naik, S. R. (1993). Fermentative production and isolation of L-asparaginase from Erwinia carotovora, EC-113. *Hindustan Antibiotics Bulletin*, 35(1-2), 77-86.

Margolin, A. L., & Navia, M. A. (2001). Protein crystals as novel catalytic materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(12), 2204-2222. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010618)40:12%3C2204::AID

Marini, B. L., Perissinotti, A. J., Bixby, D. L., Brown, J., & Burke, P. W. (2017). Catalyzing improvements in ALL therapy with asparaginase. *Blood Reviews*, 31(5), 328-338. https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.06.002

Mashburn, L. T. (1964). Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from Escherichia coli. Arch. Biochem. *Biophys*., 105, 450-452.

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

Mathioudakis, L., Bourbouli, M., Daklada, E., Kargatzi, S., Michaelidou, K., & Zaganas, I. (2019). Localization of human glutamate dehydrogenases provides insights into their metabolic role and their involvement in disease processes. *Neurochemical Research*, 44, 170-187. https://doi.org/10.1007/s11064-018-2575-y

Matuszewska, B., Norde, W., & Lyklema, J. (1981). Competitive adsorption of human plasma albumin and dextran on silver iodide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 84(2), 403-408. https://doi.org/10.1016/0021-9797(81)90231-9

Mauro-Lizcano, M., & López-Rivas, A. (2018). Glutamine metabolism regulates FLIP expression and sensitivity to TRAIL in triple-negative breast cancer cells. *Cell death & disease*, 9(2), 205. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0263-0

McCredie, K. B., Ho, D. H. W., & Freireich, E. J. (1973). L-asparaginase for the treatment of cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 23(4), 220-227. https://doi.org/10.3322/canjclin.23.4.220

Mehta, J., Bhardwaj, N., Bhardwaj, S. K., Kim, K. H., & Deep, A. (2016). Recent advances in enzyme immobilization techniques: Metal-organic frameworks as novel substrates. *Coordination Chemistry Reviews*, 322, 30-40. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.05.007

Mikucki, J., Szarapińska-Kwaszewska, J., & Krzemiński, Z. (1977). Factors influencing L-asparaginase production by Staphylococci. Zentralblatt für Bakteriologie,

Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. *Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie*, 132(2), 135-142. https://doi.org/10.1016/S0044-4057(77)80055-5

Miletić, N., Nastasović, A., & Loos, K. (2012). Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology*, 115, 126-135. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.054

Mishra, A. (2006). Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from Aspergillus niger using agricultural waste in solid state fermentation. *Applied biochemistry and biotechnology*, 135, 33-42. https://doi.org/10.1385/ABAB:135:1:33

Mittelman, A. M., Fortner, J. D., & Pennell, K. D. (2015). Effects of ultraviolet light on silver nanoparticle mobility and dissolution. *Environmental Science: Nano*, *2*(6), 683-691. https://doi.org/10.1039/C5EN00145E

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. https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192

Mohamed, S. A., Elshal, M. F., Kumosani, T. A., & Aldahlawi, A. M. (2015). Purification and characterization of asparaginase from Phaseolus vulgaris seeds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. https://doi.org/10.1155/2015/309214

Mohan Kumar, N. S., Shimray, C. A., Indrani, D., & Manonmani, H. K. (2014). Reduction of acrylamide formation in sweet bread with L-asparaginase treatment. *Food and Bioprocess Technology*, 7(3), 741-748. https://doi.org/10.1007/s11947-013-1108-6

Mohapatra, B. R., Bapuji, M., & Banerjee, U. C. (1997). Production and properties of L-asparaginase from Mucor species associated with a marine sponge (Spirastrella sp.). *Cytobios*, 92(370-371), 165-173.

Mohapatra, B. R., Sani, R. K., & Banerjee, U. C. (1995). Characterization of L-asparaginase from Bacillus sp. isolated from an intertidal marine alga (Sargassum sp.). *Letters in applied microbiology*, 21(6), 380-383. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb01086.x

Monajati, M., Borandeh, S., Hesami, A., Mansouri, D., & Tamaddon, A. M. (2018). Immobilization of L-asparaginase on aspartic acid functionalized graphene oxide nanosheet: enzyme kinetics and stability studies. *Chemical Engineering Journal*, 354, 1153-1163. https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.08.058

Moola, Z. B., Scawen, M. D., Atkinson, T., & Nicholls, D. J. (1994). Erwinia chrysanthemi L-asparaginase: epitope mapping and production of antigenically modified enzymes. *Biochemical Journal*, 302(3), 921-927. https://doi.org/10.1042/bj3020921

Morales, F., Capuano, E., & Fogliano, V. (2008). Mitigation strategies to reduce acrylamide formation in fried potato products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1126(1), 89-100. https://doi.org/10.1196/annals.1433.051

Mostafa, S. A. (1979). Activity of L-asparaginase in cells of Streptomyces karnatakensis. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. *Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*, 134(4), 343-351. https://doi.org/10.1016/S0323-6056(79)80007-5

Mostafa, S. A., & Salama, M. S. (1979). L-asparaginase-producing Streptomyces from the soil of Kuwait. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. *Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*, 134(4), 325-334. https://doi.org/10.1016/S0323-6056(79)80005-1

Mu, X., Qiao, J., Qi, L., Dong, P., & Ma, H. (2014). Poly (2-vinyl-4, 4-dimethylazlactone)-functionalized magnetic nanoparticles as carriers for enzyme immobilization and its application. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(23), 21346-21354. https://doi.org/10.1021/am5063025

Nagarajan, A., Thirunavukkarasu, N., Suryanarayanan, T. S., & Gummadi, S. N. (2014). Screening and isolation of novel glutaminase free L-asparaginase from fungal endophytes. *Research Journal of Microbiology*, 9(4), 163.

Nagarethinam, S., Naik, A. N., Udupa, N., Rao, V. J., & Vanathi, M. B. (2012). Microbial L-Asparaginase and its future prospects. *Asian Journal of Medical Research*, 1(4), 159-160.

Nakahama, K., Imada, A., Igarasi, S., & Tubaki, K. (1973). Formation of L-asparaginase by Fusarium species. *Microbiology*, 75(2), 269-273. https://doi.org/10.1099/00221287-75-2-269

Narayana, K. J. P., Kumar, K. G., & Vijayalakshmi, M. (2008). L-asparaginase production by Streptomyces albidoflavus. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 331-336. https://doi.org/10.1007/s12088-008-0018-1

Narta, U. K., Kanwar, S. S., & Azmi, W. (2007). Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology*, 61(3), 208-221. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.07.009

Narta, U., Roy, S., Kanwar, S. S., & Azmi, W. (2011). Improved production of L-asparaginase by Bacillus brevis cultivated in the presence of oxygen-vectors. *Bioresource technology*, 102(2), 2083-2085. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.118

Nelson, D.L., 2011, COX, M.M. Lehninger's Principles of Biochemistry. 5. ed. Porto.

Netrval, J. (1977). Stimulation of L-asparaginase production in Escherichia coli by organic and amino acids. *Folia Microbiologica Praha*., 22, 106–116. https://doi.org/10.1007/BF02881635

Neuman, R. E., & McCoy, T. A. (1956). Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 in vitro for asparagine and glutamine. *Science*, 124(3212), 124-125. https://doi.org/10.1126/science.124.3212.124

Noma, S. A. A., Acet, Ö., Ulu, A., Önal, B., Odabaşı, M., & Ateş, B. (2021). l-asparaginase immobilized p (HEMA-GMA) cryogels: A recent study for biochemical, thermodynamic and kinetic parameters. *Polymer Testing*, 93, 106980. https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106980

Noma, S. A. A., Ulu, A., Koytepe, S., & Ateş, B. (2020). Preparation and characterization of amino and carboxyl functionalized core-shell Fe3O4/SiO2 for L-asparaginase immobilization: A comparison study. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(5), 392-404. https://doi.org/10.1080/10242422.2020.1767605

Noma, S. A. A., Yılmaz, B. S., Ulu, A., Özdemir, N., & Ateş, B. (2021). Development of L-asparaginase@ hybrid nanoflowers (ASNase@ HNFs) reactor system with enhanced enzymatic reusability and stability. *Catalysis Letters*, 151, 1191-1201. https://doi.org/10.1007/s10562-020-03362-1

Obama, K., Tara, M., & Niina, K. (2003). L-asparaginase-based induction therapy for advanced extranodal NK/T-cell lymphoma. *International journal of hematology*, 78, 248-250. https://doi.org/10.1007/BF02983802

Orhan, H., & Aktaş Uygun, D. (2020). Immobilization of L-asparaginase on magnetic nanoparticles for cancer treatment. *Applied biochemistry and biotechnology*, 191, 1432-1443. https://doi.org/10.1007/s12010-020-03276-z

Park, Y. K., Abuchowski, A., Davis, S., & Davis, F. (1981). Pharmacology of Escherichia coli-L-asparaginase polyethylene glycol adduct. *Anticancer research*, 1(6), 373-376.

Pastuszak, I., & Szymona, M. (1976). Purification and properties of L-asparaginase from Mycobacterium phlei. *Acta Biochimica Polonica*, 23(1), 37-44.

Paterson, S. M., Shadforth, A. M., Brown, D. H., Madden, P. W., Chirila, T. V., & Baker, M. V. (2012). The synthesis and degradation of collagenase-degradable poly (2-hydroxyethyl methacrylate)-based hydrogels and sponges for potential applications as scaffolds in tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 32(8), 2536-2544. https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.07.037

Pedreschi, F., Kaack, K., & Granby, K. (2008). The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food chemistry*, 109(2), 386-392. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.057

Pennisi, M., Malaguarnera, G., Puglisi, V., Vinciguerra, L., Vacante, M., & Malaguarnera, M. (2013). Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers. *International journal of environmental research and public health*, 10(9), 3843-3854. https://doi.org/10.3390/ijerph10093843

Pochedly, C. (1977). Neurotoxicity due to CNS therapy for leukemia. *Medical and Pediatric Oncology*, 3(1), 101-115. https://doi.org/10.1002/mpo.2950030114

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. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.01.685

Porath, J., Carlsson, J. A. N., Olsson, I., & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258(5536), 598-599. https://doi.org/10.1038/258598a0

Porto, A. C. V., Freitas-Silva, O., Souza, E. F. D., & Gottschalk, L. M. F. (2019). Effect of asparaginase enzyme in the reduction of asparagine in green coffee. *Beverages*, 5(2), 32. https://doi.org/10.3390/beverages5020032

Poznansky, M. J., Shandling, M., Salkie, M. A., Elliott, J., & Lau, E. (1982). Advantages in the use of L-asparaginase-albumin polymer as an antitumor agent. *Cancer Research*, 42(3), 1020-1025.

Pritsa, A. A., & Kyriakidis, D. A. (2001). L-asparaginase of Thermus thermophilus: Purification, properties and identificaation of essential amino acids for its catalytic activity. *Molecular and cellular Biochemistry*, 216, 93-101. https://doi.org/10.1023/A:1011066129771

Pui, C. H., Robison, L. L., & Look, A. T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 371(9617), 1030-1043. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60457-2

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate research*, 339(16), 2693-2700. https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.09.007

Qian, G. Q., Zhou, J. Y., Ma, J. B., Wang, D. B., & He, B. L. (1996). Immobilization of E-coli L-asparaginase on chitosan microsphere. *CHEMICAL JOURNAL OF CHINESE UNIVERSITIES-CHINESE*, 17(7), 1147-1150.

Qiao, J., Qi, L., Mu, X., & Chen, Y. (2011). Monolith and coating enzymatic microreactors of L-asparaginase: kinetics study by MCE–LIF for potential application in acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment. *Analyst*, 136(10), 2077-2083. https://doi.org/10.1039/C1AN15067G

Raee, M. J., Ghoshoon, M. B., Ghasemi, Y., Gholami, A., Firoozi, F. R., Sadeghian, I., ... & Ebrahiminezhad, A. (2022). Magnetic immobilization of recombinant E. coli cells producing extracellular l-asparaginase II: evaluation of plasmid stability and

interaction of nanoparticles with the product. *Applied Physics A*, 128(12), 1133. https://doi.org/10.1007/s00339-022-06140-5

Raha, S. K., Roy, S. K., Dey, S. K., & Chakrabarty, S. L. (1990). Purification and properties of an L-asparaginase from Cylindrocarpon obtusisporum MB-10. *Biochemistry International*, 21(6), 987-1000.

Ramakrishnan, M. S., & Joseph, R. (1996). Characterization of an extracellular asparaginase of Rhodosporidium toruloides CBS14 exhibiting unique physicochemical properties. *Canadian Journal of microbiology*, 42(4), 316-325. https://doi.org/10.1139/m96-047

Ramya, L. N., Doble, M., Rekha, V. P. B., & Pulicherla, K. K. (2011). In silico engineering of L-asparaginase to have reduced glutaminase side activity for effective treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 33(8), 617-621. https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e31822aa4ec

Reddy, K. (1990). Effect of C and N sources on asparaginase production by bacteria. *Indian journal of microbiology. New Delhi*, 30(1), 81-83.

Rehm, F. B., Chen, S., & Rehm, B. H. (2016). Enzyme engineering for in situ immobilization. *Molecules*, 21(10), 1370. https://doi.org/10.3390/molecules21101370

Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., & Fernández-Lafuente, R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical society reviews*, 42(15), 6290-6307. https://doi.org/10.1039/C2CS35231A

Sahu, M. K., Sivakumar, K., Poorani, E., Thangaradjou, T., & Kannan, L. (2007). Studies on L-asparaginase enzyme of actinomycetes isolated from estuarine fishes. *Journal of Environmental Biology*, 28(2), 465.

Salzer, W. L., Asselin, B. L., Plourde, P. V., Corn, T., & Hunger, S. P. (2014). Development of asparaginase Erwinia chrysanthemi for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1329(1), 81-92. https://doi.org/10.1111/nyas.12496

Sanches, M., Krauchenco, S., & Polikarpov, I. (2007). Structure, substrate complexation and reaction mechanism of bacterial asparaginases. *Current Chemical Biology*, 1(1), 75-86. https://doi.org/10.2174/187231307779814057

Sarquis, M. I. D. M., Oliveira, E. M. M., Santos, A. S., & Costa, G. L. D. (2004). Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 489-492. https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000500005

SAXENA, R. K., & SINHA, U. (1981). L-asparaginase and glutaminase activities in the culture filtrates of Aspergillus nidulans.

Shaikh, H., Sener, G., Memon, N., Bhanger, M. I., Nizamani, S. M., Üzek, R., & Denizli, A. (2015). Molecularly imprinted surface plasmon resonance (SPR) based sensing of

bisphenol A for its selective detection in aqueous systems. *Analytical Methods*, 7(11), 4661-4670. https://doi.org/10.1039/C5AY00541H

Shakambari, G., Ashokkumar, B., & Varalakshmi, P. (2019). L-asparaginase–A promising biocatalyst for industrial and clinical applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 213-224. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.018

Sheldon, R. A. (2007)a. Cross-linked enzyme aggregates (CLEA® s): Stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1583-1587. https://doi.org/10.1042/BST03515833

Sheldon, R. A. (2007)b. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289-1307. https://doi.org/10.1002/adsc.200700082

Sheldon, R. A. (2011)a. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. *Organic Process Research & Development*, 15(1), 213-223. https://doi.org/10.1021/op100289f

Sheldon, R. A. (2011)b. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied microbiology and biotechnology*, 92(3), 467-477. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3554-2

Sheldon, R. A., & van Pelt, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6223-6235. https://doi.org/10.1039/C3CS60075K

Shrivastava, A., Khan, A. A., Shrivastav, A., Jain, S. K., & Singhal, P. K. (2012). Kinetic studies of L-asparaginase from Penicillium digitatum. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(6), 574-581. https://doi.org/10.1080/10826068.2012.672943

Sinha, R. A. T. I., Singh, H. R., & Jha, S. K. (2013). Microbial L-asparaginase: present and future prospective. *Int J Innov Res Sci Eng*, 2(11), 7031-7051.

Spahn, C., & Minteer, S. D. (2008). Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent patents on engineering*, 2(3), 195-200. https://doi.org/10.2174/187221208786306333

Stepanyan, K. R., & Davtyan, M. A. (1998). Some questions of thermostability of L-asparaginase of the yeast Candida guilliermondii. *Biol Zh Armenii*, 41, 599-603.

Straathof, A. J., Panke, S., & Schmid, A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations. *Current opinion in biotechnology*, 13(6), 548-556. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00360-9

Sulkowski, E. (1989). The saga of IMAC and MIT. *Bioessays*, 10(5), 170-175. https://doi.org/10.1002/bies.950100508

Sun, X., Chiu, J. F., & He, Q. Y. (2008). Fractionation of proteins by immobilized metal

affinity chromatography. In 2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation (pp. 205-212). *Totowa, NJ: Humana Press*.https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_17

Suponik, T., Lemanowicz, M., & Wrona, P. (2016). Stability of green tea nanoscale zero-valent iron. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 8, p. 01048). EDP Sciences. https://doi.org/10.1051/e3sconf/20160801048

Swain, A. L., Jaskólski, M., Housset, D., Rao, J. K., & Wlodawer, A. (1993). Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), 1474-1478. https://doi.org/10.1073/pnas.90.4.1474

Szymanska, B., Wilczynska-Kalak, U., Kang, M. H., Liem, N. L., Carol, H., Boehm, I., ... & Lock, R. B. (2012). Pharmacokinetic modeling of an induction regimen for in vivo combined testing of novel drugs against pediatric acute lymphoblastic leukemia xenografts. *PloS one*, 7(3), e33894. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033894

Takahashi, H., Inoue, J., Sakaguchi, K., Takagi, M., Mizutani, S., & Inazawa, J. (2017). Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene*, 36(30), 4267-4276. https://doi.org/10.1038/onc.2017.59

Tarhan, T., Dik, G., Ulu, A., Tural, B., Tural, S., & Ateş, B. (2022). Newly synthesized multifunctional biopolymer coated magnetic core/shell Fe3O4@ Au nanoparticles for evaluation of L-asparaginase immobilization. *Topics in Catalysis*, 1-15. https://doi.org/10.1007/s11244-022-01742-y

Taylor, R. F. (1996). Immobilization methods. Handbook of chemical and biological sensors, 203-219.

Teodor, E., Litescu, S. C., Lazar, V., & Somoghi, R. (2009). Hydrogel-magnetic nanoparticles with immobilized L-asparaginase for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 1307-1314. https://doi.org/10.1007/s10856-008-3684-y

Tiul'panova, E. S., Eremenko, V. V., & Mardashev, S. R. (1972). Activity and properties of L-asparaginase from Bacillus mesentericus 43A. *Mikrobiologiia*, 41(3), 423-429.

Tiwari, N., & Dua, R. D. (1996). Purification and preliminary characterization of L-asparaginase from Erwinia aroideae NRRL B-138. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 33(5), 371-376.

Tran, D. N., & Balkus Jr, K. J. (2011). Perspective of recent progress in immobilization of enzymes. *Acs Catalysis*, 1(8), 956-968. https://doi.org/10.1021/cs200124a

Ulu, A. (2020). Metal–organic frameworks (MOFs): a novel support platform for ASNase immobilization. *Journal of Materials Science*, 55(14), 6130-6144. https://doi.org/10.1007/s10853-020-04452-6

Ulu, A., Koytepe, S., & Ates, B. (2016)a. Design of starch functionalized biodegradable P (MAA-co-MMA) as carrier matrix for l-asparaginase immobilization. *Carbohydrate Polymers*, 153, 559–572. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.019

Ulu, A., Koytepe, S., & Ates, B. (2016)b. Synthesis and characterization of biodegradable pHEMA-starch composites for immobilization of L-asparaginase. *Polymer Bulletin*, 73, 1891-1907. https://doi.org/10.1007/s00289-015-1583-1

Ulu, A., Noma, S. A. A., Koytepe, S., & Ates, B. (2018). Magnetic Fe3O4@ MCM-41 core–shell nanoparticles functionalized with thiol silane for efficient l-asparaginase immobilization. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup2), 1035-1045. https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1478422

Verma, N., Bansal, M., & Kumar, S. (2012). Whole cell based miniaturized fiber optic biosensor to monitor L-asparagine. *Adv. Appl. Sci. Res*, 3(2), 809-814.

Verma, N., Kumar, K., Kaur, G., & Anand, S. (2007). L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Critical reviews in biotechnology*, 27(1), 45-62. https://doi.org/10.1080/07388550601173926

Vına, I., Karsakevich, A., & Bekers, M. (2001). Stabilization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 551-558. https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00043-6

Vına, I., Karsakevich, A., & Bekers, M. (2001). Stabilization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11(4-6), 551-558. https://doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00043-6

Vieira Pinheiro, J. P., Wenner, K., Escherich, G., Lanvers-Kaminsky, C., Würthwein, G., Janka-Schaub, G., & Boos, J. (2006). Serum asparaginase activities and asparagine concentrations in the cerebrospinal fluid after a single infusion of 2,500 IU/m2 PEG asparaginase in children with ALL treated according to protocol COALL-06-97. *Pediatric blood & cancer*, 46(1), 18-25. https://doi.org/10.1002/pbc.20406

Völler, S., Pichlmeier, U., Zens, A., & Hempel, G. (2018). Pharmacokinetics of recombinant asparaginase in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 81, 305-314. https://doi.org/10.1007/s00280-017-3492-5

Wong, L. S., Thirlway, J., & Micklefield, J. (2008). Direct site-selective covalent protein immobilization catalyzed by a phosphopantetheinyl transferase. *Journal of the American Chemical Society*, 130(37), 12456-12464. https://doi.org/10.1021/ja8030278

Wriston Jr, J. C. (1985). [79] Asparaginase. In Methods in enzymology (Vol. 113, pp. 608-618). *Academic Press*. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)13082-X

Wriston, J. C., & Yellin, T. O. (1973). L-asparaginase: a review. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 39, 185-248.

Yabutani, T., Sumi, H., Nakamura, T., Akatsuki, S., & Le, T. X. (2012). Multielemental elution behavior of metal ions adsorbed on iminodiacetic acid chelating resin by using hydrogen peroxide as an eluent. *Analytical Sciences*, 28(5), 463-468. https://doi.org/10.2116/analsci.28.463

Yamaguchi, H., Kiyota, Y., & Miyazaki, M. (2018). Techniques for preparation of cross-linked enzyme aggregates and their applications in bioconversions. *Catalysts*, 8(5), 174. https://doi.org/10.3390/catal8050174

Youssef, M. M., & Al-Omair, M. A. (2008). Cloning, purification, characterization and immobilization of L-asparaginase II from E. coli W3110. *Asian J. Biochem*, 3(6), 337-350.

Yun, M. K., Nourse, A., White, S. W., Rock, C. O., & Heath, R. J. (2007). Crystal structure and allosteric regulation of the cytoplasmic Escherichia coli L-asparaginase I. *Journal of molecular biology*, 369(3), 794-811. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.03.061

Yümlü, K. (2015). Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 16(1), 83-90. https://doi.org/10.18229/ktd.89419

Zaborsky, O. R. (1973). Immobilized enzymes. (No Title).

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

Zhang, D. H., Yuwen, L. X., & Peng, L. J. (2013). Parameters affecting the performance of immobilized enzyme. *Journal of chemistry*, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/946248

Zhang, Y. Q., Tao, M. L., Shen, W. D., Zhou, Y. Z., Ding, Y., Ma, Y., & Zhou, W. L. (2004). Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein and its characters. *Biomaterials*, 25(17), 3751-3759. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.019

Zhou, R., Liang, T., Li, T., Huang, J., & Chen, C. (2023). Possible mechanism of metabolic and drug resistance with L-asparaginase therapy in childhood leukaemia. *Frontiers in Oncology*, 13, 1070069. https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1070069

Zhumabekova, A., Noma, S. A. A., Tümay Özer, E., & Osman, B. (2024). Decolorization of Congo Red and Reactive Black 5 Dyes with Horseradish Peroxidase-Immobilized Cross-Linked Polymeric Microbeads. Arabian Journal for Science and Engineering, 1-18. https://doi.org/10.1007/s13369-024-08748-6

Zubavichus, Y., Fuchs, O., Weinhardt, L., Heske, C., Umbach, E., Denlinger, J. D., & Grunze, M. (2004). Soft X-ray-induced decomposition of amino acids: an XPS, mass spectrometry, and NEXAFS study. *Radiation Research*, 161(3), 346-358. https://doi.org/10.1667/RR3114.1

Zuo, S., Zhang, T., Jiang, B., & Mu, W. (2015). Reduction of acrylamide level through blanching with treatment by an extremely thermostable L-asparaginase during French fries processing. *Extremophiles*, 19, 841-851. https://doi.org/10.1007/s00792-015-0763-0

Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., ... & Villagran, M. D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(16), 4782-4787. https://doi.org/10.1021/jf034180i

Akademik Çalışmalar

Projeler:

1. "Kınanın Antioksidan Bileşen Profilinin On-Line HPLC-FRAP Yöntemi ile Belirlenmesi" Araştırmacı, **TÜBİTAK 2209-A, Karadeniz Teknik Üniversitesi.**
2. "Cu(II) iyonu içeren polimerik nanopartiküllere L-asparajinaz enziminin immobilizasyonu" Araştırmacı, **GAP, Bursa Uludağ Üniversitesi**.
3. "Peroksidaz enziminin polimerik mikroküre lere immobilizasyonu ve boya renk giderimindeki etkinliğinin araştırılması" Bursiyer, **BAP, Bursa Uludağ Üniversitesi.**

Sözlü Sunumlar:

1. **Kübra Kaya**, Melek Kaya, Aya Khudhair Khalaf, Uğur Kardil, Hacer Doğan, Murat Küçük. Kınanın Antioksidan Bileşen Profilinin On-Line HPLC-FRAP Yöntemi ile Belirlenmesi. **Uluslararası 12. Kozmetik Kongresi**, 18-20 Şubat 2022, Antalya/Türkiye.

2. Melek Kaya, **Kübra Kaya**, Aya Khudhair Khalaf, Uğur Kardil, Hacer Doğan, Murat Küçük. Kına Su ve Alkol Özütlerinin Biyoaktivite Değerlendirmesi. **Uluslararası 12. Kozmetik Kongresi**, 18-20 Şubat 2022, Antalya/Türkiye.

Posterler:

1. **Kübra Kaya**, Melek Kaya, Aya Khudhair Khalaf, Uğur Kardil, Hacer Doğan, Murat Küçük. Kınanın Antioksidan Bileşen Profilinin On-Line HPLC-FRAP Yöntemi ile Belirlenmesi. **Uluslararası 12. Kozmetik Kongresi**, 18-20 Şubat 2022, Antalya/Türkiye.

2. **Kübra Kaya**, Samir Abbas Ali Noma, Monireh Bakhshpour-Yücel, Bilgen Osman. L-aspajinaz Enziminin İmmobilizasyonu ve Uygulamaları. **Kromatografi XXI,** 14-16 Haziran 2023, Aydın/Türkiye.

3. Melek Kaya, **Kübra Kaya**, Aya Khudhair Khalaf, Uğur Kardil, Hacer Doğan, Murat Küçük. Kına Su ve Alkol Özütlerinin Biyoaktivite Değerlendirmesi. **Uluslararası 12. Kozmetik Kongresi**, 18-20 Şubat 2022, Antalya/Türkiye.