

**T.C.  
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
2018-YL-017**

**KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN  
L-ASPARAJİNAZİN MANYETİK  
NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU**

**Hande ORHAN**

**Tez Danışmanı:  
Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN**

**AYDIN**



**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Hande ORHAN tarafından hazırlanan “Kanser Tedavisinde Kullanılan L-Asparajinazın Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu” başlıklı tez, 14.05.2018 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

| Ünvanı, Adı Soyadı                    | Kurumu    | İmzası |
|---------------------------------------|-----------|--------|
| Başkan : Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER | ADÜ       | .....  |
| Üye : Prof. Dr. Sinan AKGÖL           | EGE Üniv. | .....  |
| Üye : Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN     | ADÜ       | .....  |

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun .....Sayılı kararıyla ..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Aydın ÜNAY  
Enstitü Müdürü



**T.C.**  
**ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE**  
**AYDIN**

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

.../.../20..

Hande ORHAN



## ÖZET

### KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILAN L-ASPARAJİNAZIN MANYETİK NANOPARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU

Hande ORHAN

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN

2018, 72 sayfa

Bu tezde, anti-lösemik enzim *E. coli* kaynaklı L-asparajinaz (EC 3.5.1.1) manyetik poli(HEMA-GMA) nanopartiküllerine immobilize edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları ile manyetik nanopartiküllerin ortalama boyutunun 117.5 nm olduğu ve asparajinazın sentezlenen manyetik nanopartiküllere kovalent olarak bağlandığı bulunmuştur. İmmobilize edilen asparajinaz enzimi miktarı 66.43 mg asparajinaz/g nanopartikül olarak hesaplanmıştır. İmmobilize asparajinazın aktivitesine pH, sıcaklık ve substrat derişiminin etkisi incelenmiştir. Serbest asparajinazın optimum pH'ı 7.5 bulunurken, immobilize asparajinazın pH'ı 6.5 olarak bulunmuştur. İmmobilize asparajinazın optimum sıcaklığı serbest asparajinaza göre 10°C artmış ve 55°C olarak gözlenmiştir. Serbest asparajinazın  $k_{cat}$  değeri ( $47356 \text{ dk}^{-1}$ ), immobilize asparajinazinkinden ( $497 \text{ dk}^{-1}$ ) daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca serbest ve immobilize asparajinazın ısıl ve depo kararlılıkları incelenmiş ve immobilize asparajinazın işlemsel kararlılığı belirlenmiştir. Bu tezde immobilize asparajinazın yapay insan serumundaki etkinliğini belirlemek üzere serbest ve immobilize enzimin aktivitesi ölçülmüş ve immobilize asparajinazın serbest asparajinaza göre %74.74 aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar hazırlanan asparajinaz immobilizasyon işleminin başarılı olduğunu göstermektedir.

**Anahtar sözcükler:** L-asparajinaz, manyetik nanopartikül, immobilizasyon, kanser





## ABSTRACT

### IMMOBILIZATION OF L-ASPARAGINASE USED FOR CANCER TREATMENT TO MAGNETIC NANOPARTICLES

Hande ORHAN

M. Sc. Thesis, Department of Chemistry  
Supervisor: Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN  
2018, 72 pages

In this thesis, anti-leukemic enzyme L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1.) from *E. coli* was immobilized on the magnetic poly(HEMA-GMA) nanoparticles. Characterization studies revealed that, the average size of the magnetic nanoparticles was 117.5 nm and asparaginase was covalently immobilized to the synthesized magnetic nanoparticles. Immobilized enzyme was calculated to be 66.43 mg asparaginase/g nanoparticles. The effects of pH, temperature and substrate concentration on the activity of the immobilized asparaginase were investigated. Optimum pH of free asparaginase was found to be 7.5, while optimum pH of the immobilized asparaginase was found to be 6.5. Optimum temperature of the immobilized asparaginase increased 10 °C, and was observed to be 55°C.  $k_{cat}$  value of free asparaginase ( $47356 \text{ min}^{-1}$ ) was found to be higher than that of immobilized asparaginase ( $497 \text{ min}^{-1}$ ). Additionally, thermal and storage stabilities of free and immobilized asparaginase were investigated, and operational stability of immobilized asparaginase was determined. In this presented thesis, in order to detect the efficiency of the immobilized asparaginase in artificial human serum, activities of free and immobilized asparaginase were measured, and it was observed that, immobilized asparaginase carried 74.74 % of its initial activity. These results showed that, asparaginase immobilization process in this work was successful.

**Key words:** L-asparaginase, magnetic nanoparticle, immobilization, cancer



## ÖNSÖZ

Bu çalışmada kanser tedavisinde kullanılan L-Asparajinazın manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu incelendi. Çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam boyunca engin bilgilerini, maddi, manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, akademik çalışmalarını ve yaşam tarzını örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. Deniz AKTAŞ UYGUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarım ve tez çalışmam boyunca bilimsel ve manevi desteklerinden dolayı değerli hocam Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e teşekkürü borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım ve tez yazım aşamalarımda benden hiçbir zaman yardımını esirgemeyen bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Murat UYGUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda yardımlarını ve desteğini benden esirgemeyen maddi, manevi her zaman yanımda olan değerli hocam Arş. Gör. Rukiye YAVAŞER TOMAY, Doktora Öğrencileri Çağdaş SUNNA, Sinem EVLİ ve Fatma AKPINAR'a, Yüksek Lisans Öğrencileri Melis BAYRAKTAROĞLU, Seçil GÜLBAHARLI, Hatice ARICI ve Ulviye KİLİMCİ'ye; bu çalışmayı FEF-17001 No'lu araştırma projesi olarak destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkürü borç bilirim.

Son olarak bana çalışmalarım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen daha da önemlisi duydukları güvenle her zaman yanımda olduklarını hissettiren değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Hande ORHAN



## İÇİNDEKİLER

|   |      |
|---|------|
| KABUL VE ONAY SAYFASI.....                                    | iii  |
| BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI .....                          | v    |
| ÖZET .....  | vii  |
| ABSTRACT.....   | ix   |
| ÖNSÖZ .....   | xi   |
| KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....                           | xvii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....  | xix  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                       | xxi  |
| 1. GİRİŞ .....  | 1    |
| 1.1. L-Asparajinaz.....                                       | 1    |
| 1.2. L-Aparajinaz Kataliz Mekanizması .....                   | 2    |
| 1.3. L-Asparajinazın Yapısı .....                             | 3    |
| 1.4. L-Asparajinazın Kaynakları .....                         | 4    |
| 1.5. L-Asparajinaz Uygulamaları .....                         | 5    |
| 1.5.1. Antikanser İlacı Olarak L-Asparajinaz.....             | 5    |
| 1.5.2. Biyosensörlerde L-Asparajinazın Rolü .....             | 6    |
| 1.5.3. Amino Asit Metabolizmasında L-Asparajinazın Rolü ..... | 6    |
| 1.5.4. Gıda Endüstrisinde L-Asparajinazın Rolü .....          | 6    |
| 1.6. Enzim İmmobilizasyonu .....                              | 7    |
| 1.6.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri .....                  | 8    |
| 1.6.1.1. Çapraz bağlama .....                                 | 8    |
| 1.6.1.2. Adsorpsiyon .....                                    | 8    |
| 1.6.1.3. İyonik bağlanma.....                                 | 9    |
| 1.6.1.4. Kovalent bağlanma.....                               | 9    |
| 1.6.1.5. Tutuklama, kapsülleme ve/veya mikrokapsülleme .....  | 10   |

|  |    |
|--|----|
| 1.7. Diğer İmmobilizasyon Yöntemleri.....                                | 11 |
| 1.7.1. Disülfit Bağları .....  | 11 |
| 1.7.2. Metal Bağlama .....   | 11 |
| 1.8. Nanoteknoloji .....   | 11 |
| 1.8.1. Nanoteknolojinin Tarihçesi .....                                  | 12 |
| 1.8.2. Nanomalzemeler.....   | 14 |
| 1.8.2.1. Kuantum Dotlar .....  | 15 |
| 1.8.2.2. Karbon Nanotüpler .....   | 16 |
| 1.8.2.3. Dendrimerler .....  | 17 |
| 1.8.2.4. Grafen.....   | 18 |
| 1.8.2.5. Grafen Oksit .....  | 18 |
| 1.8.2.6. Nanolifler.....   | 19 |
| 1.9. Nanopartiküller.....  | 20 |
| 1.9.1. Manyetik Nanopartiküller .....                                    | 20 |
| 1.9.2. Altın Nanopartiküller.....  | 21 |
| 1.9.3. Gümüş Nanopartiküller .....                                       | 22 |
| 1.9.4. Polimerik Nanopartiküller .....                                   | 23 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ.....  | 25 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....  | 35 |
| 3.1. Kimyasal ve Cihazlar .....  | 35 |
| 3.2. Yöntem .....  | 36 |
| 3.2.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi .....                    | 36 |
| 3.2.2. Manyetik Nanopartiküllere L-Asparajinaz İmmobilizasyonu .....     | 37 |
| 3.3. Manyetik Nanopartiküllerin [poli (HEMA-GMA)] Karakterizasyonu ..... | 37 |
| 3.4. Asparajinaz Aktivite Tayini .....                                   | 38 |

|   |    |
|---|----|
| 3.4.1. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi.....                                  | 39 |
| 3.4.2. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi.....                             | 39 |
| 3.4.3. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine Substrat Değişiminin Etkisinin İncelenmesi .....                  | 40 |
| 3.4.4. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Enziminin Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....                                 | 40 |
| 3.4.5. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Enziminin Depo Kararlılığının İncelenmesi.....                                 | 40 |
| 3.4.6. İmmobilize Asparajinaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi.....  | 41 |
| 3.4.7. İmmobilize Asparajinazın İnsan Serumunda L-Asparajin Hidrolizinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması .....      | 41 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....   | 43 |
| 4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu .....   | 40 |
| 4.2. Manyetik Nanopartiküllere L-Asparajinaz İmmobilizasyonu.....   | 49 |
| 4.2.1. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi .....                                 | 49 |
| 4.2.2. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi .....                            | 50 |
| 4.2.3. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine Substrat Değişiminin Etkisinin İncelenmesi.....                   | 51 |
| 4.2.4. Serbest ve İmmobilize Asparajinazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi.....   | 53 |
| 4.2.5. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Enziminin Depo Kararlılığının İncelenmesi .....                                | 54 |
| 4.2.6. İmmobilize Asparajinazın İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi .....   | 54 |
| 4.2.7. İmmobilize Asparajinazın Yapay İnsan Serumunda L-Asparajin Hidrolizinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması..... | 55 |
| 5. SONUÇ .....  | 57 |

|                |    |
|----------------|----|
| KAYNAKLAR..... | 59 |
| ÖZGEÇMİŞ.....  | 71 |



## KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| AFM                            | Atomik kuvvet mikroskobu                      |
| ALL                            | Akut lenfoblastik lösemi                      |
| BSA                            | Sığır serum albümini                          |
| DSC                            | Diferansiyel taramalı kalorimetre             |
| DTA                            | Diferansiyel termal analiz                    |
| EDX                            | Enerji dağılımlı X-ışını analizi              |
| EGDMA                          | Etilen glikol dimetakrilat                    |
| ESR                            | Elektron spin rezonans                        |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> | Magnetit                                      |
| FTIR                           | Fourier transform infrared spektrofotometrisi |
| GMA                            | Glisidil metakrilat                           |
| HEMA                           | 2-hidroksietil metakrilat                     |
| KBr                            | Potasyum bromür                               |
| KPS                            | Potasyum persülfat                            |
| NHS                            | N-hidroksisüksinimid                          |
| PVA                            | Poli(vinil alkol)                             |
| SEM                            | Taramalı elektron mikroskobu                  |
| TCA                            | Trikloroasetik asit                           |
| TEM                            | Geçirimli elektron mikroskopisi               |
| TGA                            | Termogravimetrik analiz                       |
| XPS                            | X-ışını fotoelektron spektroskopisi           |
| XRD                            | X-ışını difraksiyonu                          |
| MRI                            | Manyetik rezonans görüntüleme                 |
| MIT                            | Massachusetts Teknoloji Enstitüsü             |

xviii

|            |  |
|------------|--|
| STM        | Taramalı tünelleme mikroskobu                        |
| EDC        | 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid           |
| NHS        | N-Hidroksisüksinimid                                 |
| SDS-PAGE   | Sodyum dodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi |
| MAA-co-MMA | Metakrilik asit-ko-metil metakrilat                  |
| PEDOT      | poli(3,4-etilendioksitiyofen)                        |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|  |    |
|--|----|
| Şekil 1.1. L-asparajinaz'ın reaksiyon mekanizmasının şematik gösterimi .....   | 1  |
| Şekil 1.2. Normal ve tümörlü hücrelerde L-asparajinazın etki mekanizması .....   | 3  |
| Şekil 1.3. L-asparajinaz'ın üç boyutlu yapısı .....  | 4  |
| Şekil 1.4. Nanometre boyutlu yapılara örnekler.....  | 14 |
| Şekil 1.5. Biyogörüntüleme kuantum dotlar.....   | 16 |
| Şekil 1.6. Tek duvarlı karbon nanotüp yapı .....   | 16 |
| Şekil 1.7. Temel bileşenleri belirtilen üç dendrimer gösterimi .....   | 17 |
| Şekil 1.8. Grafenin şematik gösterimi .....  | 18 |
| Şekil 1.9. Grafen oksitin şematik gösterimi .....  | 19 |
| Şekil 1.10. Farklı morfolojilerdeki nanoliflerin taramalı elektron mikroskobu<br>görüntüleri .....   | 19 |
| Şekil 1.11. Manyetik nanopartiküllerin yapısı .....  | 21 |
| Şekil 1.12. Altın nanopartiküllerin şematik gösterimi .....  | 22 |
| Şekil 1.13. Gümüş nanopartiküllerin şematik gösterimi .....  | 23 |
| Şekil 1.14. Polimerik nanopartiküllerin şematik gösterimi .....  | 23 |
| Şekil 3.1. Manyetik nanopartiküllerin [poli(HEMA-GMA)] sentezlenmesi.....  | 37 |
| Şekil 3.2. Asparajinaz aktivite tayini .....   | 39 |
| Şekil 4.1. Manyetik nanopartikül [poli(HEMA-GMA)] (a) ve L-asparajinaz<br>bağlı manyetik nanopartikülün [poli(HEMA-GMA)]'nın kimyasal<br>yapısı (b)..... | 43 |
| Şekil 4.2. Enzim taşıyan ve enzim taşımayan nanopolimerlerin FTIR<br>spektrumları.....   | 44 |
| Şekil 4.3. Asparajinaz bağlı manyetik nanopartiküllerin EDX spektrumu .....  | 45 |
| Şekil 4.4. Manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu.....   | 46 |
| Şekil 4.5. Manyetik nanopartiküllerin SEM ve AFM fotoğrafı ( a ve b ) .....  | 48 |
| Şekil 4.6. Serbest ve İmmobilize asparajinaz aktivitesine pH'ın etkisi .....   | 50 |

|  |    |
|--|----|
| Şekil 4.7. Serbest ve immobilize asparajinaz aktivitesine sıcaklığın etkisi .....                | 51 |
| Şekil 4.8. Serbest asparajinaz için Lineweaver-Burk grafiği .....                                | 52 |
| Şekil 4.9. İmmobilize asparajinaz için Lineweaver-Burk grafiği.....                              | 52 |
| Şekil 4.10. Serbest ve immobilize asparajinaz aktivitesinin 55 °C’de zamana bağlı değişimi ..... | 53 |
| Şekil 4.11. Serbest ve immobilize asparajinazın depo kararlılığının incelenmesi                  | 54 |
| Şekil 4.12. İmmobilize asparajinazın işlemsel kararlılığının incelenmesi .....                   | 55 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

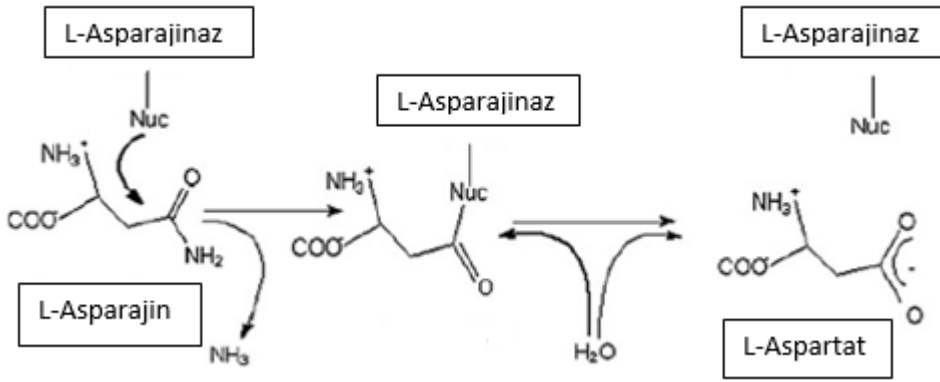
|   |    |
|---|----|
| Çizelge 4.1. Proteinlerin ve peptitlerin karakteristik IR bantlarının şematik gösterimi.....  | 45 |
| Çizelge 4.2. Asparajinaz bağlı manyetik nanopartiküllerin EDX analizine ilişkin veriler ..... | 46 |
| Çizelge 4.3. Serbest ve İmmobilize asparajinazın kinetik parametreleri .....                  | 53 |



# 1. GİRİŞ

## 1.1. L-Asparajinaz

L-Asparajinaz (L-Asparajin amidohidrolaz EC 3.5.1.1) amidaz grubu enzimlerin üyesi olarak bilinen bir amidohidrolaz sınıfı enzimdir ve L-asparajin amino asidinin aspartat ve amonyağa yıkımını katalizler.



Şekil 1.1. L-Asparajinaz'ın reaksiyon mekanizmasının şematik gösterimi

L-Asparajinaz araştırmacılar tarafından kapsamlı olarak çalışılmış olan antineoplastik özellikli ilk terapötik enzimdir. L-Asparajinaz 1904'de Lang tarafından ilk kez gözlenmiştir (Lang ve Uber, 1904). L-Asparajinazın fizyolojik özellikleri üzerindeki araştırmalar yarım yüzyıldan fazla süredir devam etmektedir ve bu konudaki sıçrama 1922'de Clementi'nin kobay kan serumunda L-asparajinazın bulunduğunu ortaya çıkarmasıyla gerçekleşmiştir (Clementi, 1922). Kidd 1953'de kobay serumunun tümör inhibisyon kabiliyetini kanıtlamak üzere ileri düzeyde deneyler yapmıştır. Kidd, deri altına lenfosarkom uygulanmış farelerle yaptığı deneylerde kobay serumu enjekte edilenlerde tümör büyümesinin olmadığı buna karşılık, işlem görmemiş kontrol farelerinin ise karsinoma nedeniyle öldüğünü gözlemlemiştir. Kidd deneyin ikinci kısmında memeli karsinoma ve fibrosarkoma isimli iki farklı lenfomanın, kobay serumu ile muamele edildiğinde dejenere olarak yok olduğunu görmüştür (Kidd, 1953). 1961'de daha yenilikçi bir atılım Broome tarafından yapılmış ve substrat özgüllüğü ile kobay serumundaki L-asparajinazın antitümör ajanı olduğu gösterilmiştir (Broome, 1961). Sonrasında bazı diğer substrat spesifik

asparajınların tümörleri inhibe ettiği bulunmuştur (Broome, 1968; Capizzi vd., 1969; Clubb vd., 1965).

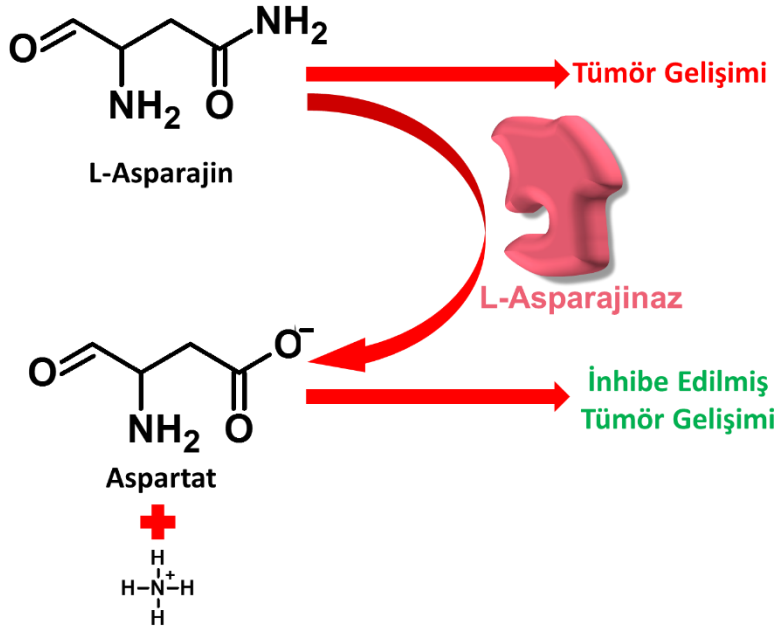
McCoy, yaptığı *in vitro* denemelerde asparajın amino asidinin Walker karsinoma 256 için merkezi öneme sahip olduğunu göstermiştir (McCoy vd., 1956). 1954'de Alternbern ve 1965'de Broome sırasıyla bakteri ve mayadaki L-asparajın antitümör aktivitesini rapor etmişlerdir (Alternbern ve Housewright, 1954; Broome, 1965).

Sonraki çalışmalarda L-asparajın kobay ve kemiricilerin serumunda bulunduğu fakat insanlarda bulunmadığı ortaya çıkarılmıştır (Holmquist, 1963). Fareler, köpekler ve ratlardaki tümörler kobay serumu, *E.coli* ve daha az düzeyde olmakla birlikte tavuk karaciğerinden saflaştırılan asparajın enzimi ile önlenebilir. L-asparajın tip 1 ve tip 2 olan iki izoenzimi, hem L-asparajın hem de L-glutamin için enzim aktivitesi ile karakterize edilebilir. Bununla birlikte, tip II asparajın, L-asparajine karşı daha yüksek spesifik davranış sergiler. Tip II asparajın tam olarak antitümör aktivitesi gösterir ve akut lenfoblastik lösemi (ALL)'de kemoterapötik ajan olarak kullanılır (Kotzia ve Labrou, 2007). Piyasadan temin edilebilen asparajınların ticari isimleri Kolopas, Krasnitin, Krisantas, Pasum, Kidrolaz, Elspar, Erwinaz PEG-asparajın ve Pegasparagasum'dur (Batoool vd., 2016).

## 1.2. L-Asparajın Kataliz Mekanizması

Hidrolik özellikleri nedeniyle, asparajın enzimi ALL tedavisinde önemli unsurlardan biridir. Hem normal hem de lösemik hücreler, metabolik ihtiyaçları için L-asparajın amino asidine gereksinim duyarlar. Normal hücreler transaminaz enzimi ile okzaloasetat ve glutamattan aspartat ve  $\alpha$ -ketoglutarat oluşturur. Sağlıklı hücreler büyümeleri için aspartatı, L-asparajın sentetaz enzimi ile asparajine dönüştürürler. Sonuç olarak sağlıklı hücrelerde aspartat, asparajın sentetaz enzimi ile asparajine dönüştürülür. Neoplastik hücreler, L-asparajın sentetaz enziminin eksikliği nedeniyle asparajın sentezleme kabiliyetinden yoksundurlar. Dolayısıyla varlıkları ve üremeleri için dış kaynaklı asparajın desteğine ihtiyaç duyarlar. Sonuç olarak tümör hücreleri için dolaşımda gerekli olan asparajının tümü biter ve bu kanser hücrelerinin beslenme yetersizliğine sebep olur ve nihayetinde kanser hücreleri ölür.





Şekil 1.2. Normal ve tümörlü hücrelerde L-asparajinazın etki mekanizması

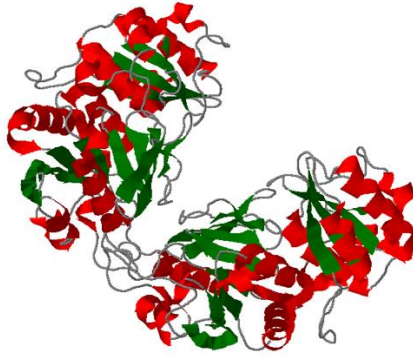
Klinik veriler son yirmi yıldan fazladır asparajinazın ALL tedavisi için çok önemli bir bileşen olduğunu ortaya koymuştur. L-asparajinaz ökaryotlarda ve mikroorganizmalarda yaygın olarak bulunur (Savitri ve Azmi, 2003) ve ayrıca gıda endüstrisinde gıda işleyici olarak potansiyel bir role sahiptir (Dhanam ve Kannan , 2013; Batool vd., 2016).

### 1.3. L-Asparajinazın Yapısı

L-Asparajinazın yapısını aydınlatmak için birçok araştırmacı tarafından moleküler düzeyde çok sayıda araştırma yapılmıştır. Genellikle L-asparajinaz tetramer olarak bulunur fakat farklı kaynaklardan izole edilen asparajinazların hekzamerik, dimerik ve monomerik formları da bulunmuştur. Çoğu bakteriyel L-asparajinaz kuarterner ve tersiyer yapılar sergiler (Ramya vd., 2011).

*E.coli* ve *Erwinia sp*'nin moleküler yapıları oldukça iyi araştırılmıştır dolayısıyla yapısal bilgilerine kolayca ulaşılabilmektedir (Swain vd., 1993; Aghaiypour vd., 2001). Hem *E.coli* hem de *Erwinia sp.* benzer üç boyutlu yapıya sahiptir. (Lubkowski vd., 2002). *E. coli* asparajinazı dört özdeş alt birimden oluşan tetramerik bir enzimdir ve her alt birim 326 amino asit içerir. Aktif merkezindeki 2

threonin amino asidi aktivite için gereklidir. *Erwinia carotovora* asparajinazı her biri dört özdeş monomerden (A'dan H'ye) oluşan iki tetramer (ABCD ve EFGH) yapıya sahiptir. Her bir monomerde 14  $\alpha$ -ipi ve 8  $\beta$ -heliks ve bir büyük N-terminal bölge ve bir küçük C-terminal bölgeyi içeren iki alanı kapsayan 327 amino asit bulunur (Aghaiypour vd., 2001).



Şekil 1.3. L-Asparajinazın üç boyutlu yapısı ([https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.5.1.1&Suchword=asparaginase&reference=&UniProtAc c=&organism%5B%5D=&show\\_tm=0#PDB](https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.5.1.1&Suchword=asparaginase&reference=&UniProtAc c=&organism%5B%5D=&show_tm=0#PDB))

Aktif bölge iki komşu monomer (A ve C: B ve D) arasına yerleşmiştir. Bu tetramer dört özdeş alt üniteden oluşur. Bu tek parça molekül, dimerlerin bir dimeri olarak ele alınır. Her aktif bölge iki komşu monomer arasında amino asitlerin yerleşmesiyle şekillenir. Bu iki komşu monomerde yalnızca Ser254 bulunurken Thr15, Tyr29, Ser62, Glu63, Thr95, Asp96 ve Ala120 ve Lys168 amino asitleri aktif bölgeyi oluşturur (Park vd., 1981; Eden vd., 1990; Asselin vd., 1999; Jaskolski vd., 2001; Vieira vd., 2006; Narta vd., 2007; Janin vd., 2007; Ramya vd., 2011). Thr15 ve Thr95 enzimin katalitik aktivitesinden sorumlu olan amino asitlerdir (Batoool vd., 2016).

#### 1.4. L-Asparajinazın Kaynakları

İnsanlar hariç hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmaları (bakteriler, mantarlar, algler, mayalar ve aktinomisetler) kapsayan çeşitli organizmalarda L-asparajinaz varlığı rapor edilmiştir. Çeşitli hayvan ve bitki gruplarında asparajinaz bulunmasına rağmen yorucu ekstraksiyon işlemleri nedeniyle diğer makul kaynaklar (bakteriler, mantarlar, algler, mayalar ve aktinomisetler)

araştırmacılarca keşfedilmiştir. Mikroorganizmalardan bu enzimin büyük ölçekli üretimi, onların basit üretim metodları nedeniyle daha kolaydır.

L-Asparajınazın, karada ve denizde bulunan hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif türlerden elde edilebildiği rapor edilmiştir (Izadpanah vd., 2014). Gram pozitif bakteri kaynağı, gram negatif bakteri kaynağı ile karşılaştırıldığında daha önemsizdir.

Çoğu Gram negatif bakteriden alınan L-asparajınaz iki temel tipe ayrılabilir; Tip I ve Tip II, L-asparajınaz. Tip I L-asparajınaz nicelik olarak önemlidir ve hem L-glutamin hem de L-asparajin amino asitleri üzerinde enzimatik aktiviteye sahiptir ve yalnızca anaerobik koşullarda uyarılır (Sanches vd., 2001). *E. coli* ve *Erwinia chrysanthemiden* retilen Tip II asparajınaz 30 yıldan fazladır ALL'ın etkili tedavisi için antitümör ajanı olarak kullanılmaktadır. *E. coli* ve *E. carotovara* gibi iki bakteriyel kaynaktan alınan L-asparajınaz, ALL'nin tedavisi için şu anda klinik olarak kullanımdadır (Batool vd., 2016).

## **1.5. L-Asparajınaz Uygulamaları**

### **1.5.1. Antikanser İlacı Olarak L-Asparajınaz**

L-Asparajınaz, vinkristin ve glukokortikoid ile kombine edilerek ALL tedavisi için kullanılır. Antilsemik zellikleri nedeniyle L-asparajınaz terapötik olarak önemli bir antitümör ilaç olarak ele alınır. L-asparajınaz ALL (temel olarak ocuklarda), Hodgkin's hastalığı, akut miyelositik lösemi, akut miyelomonositik lösemi, kronik lenfatik lösemi, lenfasarkom, retiklosarkom ve melanosarkom gibi belli malignitlerin tedavisinde kullanılan ilaçlar ile kombine edilen çok iyi bilinen bir kemoterapi ajanıdır (Kidd, 1953; Broome. 1961). L-asparajınaz, L-asparajini aspartata dönüştürme kabiliyetine sahipken, L-asparajin, protein sentezi ve hücre büyümesinde rol alan ve birçok tümör hresi için esansiyel bir amino asittir; bu sebeple L-asparajınazın varlığında malign hücreler asparajinin uzaklaşması ile önemli bir büyüme faktöründen yoksun kalır ve sonuçta tümör hücreleri ölür (Salzer vd., 2014; Batool vd., 2016).

### 1.5.2. Biyosensörlerde L-Asparajın Rolü

L-Asparajınaz, gıda endüstrisinde ve lösemi tedavisinde asparajın düzeylerini analiz etmek için biyosensör olarak kullanılabilir. XRD, XPS, SEM ve TEM gibi çeşitli spektroskopik teknikler L-asparajın analizi için kullanımdadır fakat yüksek maliyet ve meşakkatli işlemleri onları daha az tercih edilir yapmıştır (Zubavichus vd., 2004). Böylesi bir durumda biyosensör teknolojisi güvenilir, ucuz ve kullanımı kolay bir yaklaşım olabilir. Biyosensörün davranış mekanizması asparajinin hidrolizi ile üretilen amonyum iyonunun pH, renk ve absorpsiyondaki değişimine sebep olan asparajınaz aktivitesine dayanır (Kumar vd., 2013; Batool vd., 2016).

### 1.5.3. Amino Asit Metabolizmasında L-Asparajın Rolü

L-Asparajınaz aspartik ailesinin üyeleri olan lizin, threonin ve methionin isimli amino asitlerin biyosentezinde hayati bir rol oynar. Kreb's döngüsünün yanısıra lizin ve threoninin direkt bir öncülü olan aspartik asit, aynı zamanda L-asparajınaz enziminin aktivitesi ile de oluşturulur (Sinha vd., 2013).

### 1.5.4. Gıda Endüstrisinde L-Asparajın Rolü

L-Asparajınaz gıda işleme katkısı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Gıda teknolojisindeki son gelişmeler, nişastalı gıdalar kızartıldığında veya 120 °C'ye kadar pişirildiğinde Maillard reaksiyonunun bir sonucu olarak renksiz ve kokusuz kristal bir katı olan akrilamidin (2-propenamid) oluştuğunu göstermiştir. Akrilamid bir nörotoksindir ve insanlar için karsinogenik olarak kategorize edilmiştir. Gıda endüstrisinde akrilamid pişirme ve kızartma sırasında serbest asparajinin alfa-amino grubu ve glukoz gibi indirgen şekerlerin karbonil grupları arasında sıcaklığın tetiklediği reaksiyonlarla oluşur.

L-Asparajini L-aspartata dönüştürme yeteneği nedeniyle, L-asparajınaz nişastalı (patates ve ekmek hamuru) gıdalarla ön işleme tabi tutularak Maillard reaksiyonu için öncüllerin sayısını azaltma olasılığını sunar ve bu da akrilamid oluşma riskini azaltır. Bununla birlikte akrilamidin tamamen uzaklaştırılması asparajin dışındaki oluşumlar nedeniyle imkansızdır. Gıda endüstrisinde kullanılan fungal asparajınazlar, *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger*'den elde edilen asparajınazlardır (Batool vd., 2016).

## 1.6. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, kataliz hızını artırarak biyokimyasal reaksiyonları destekleyen biyolojik katalizörlerdir ve biyoproses uygulamaları için olağanüstü yöntemlerden biridir (Brena ve Batista-Viera., 2006; Datta vd., 2013). Biyokataliz, üretim kolaylığı ve substrat özgüllüğü gibi avantajlarından dolayı pek çok alanda kabul görmüştür. Ancak biyokatalizörlerin büyük ölçüde ticarileşmesi için, yüksek maliyet gibi dezavantajları nedeniyle tekrar kullanılabilirliklerini sağlamak zorunluluk haline gelmiştir. Biyokimyasal reaksiyonlar sırasında yapısal kararlılıklarını koruyamamaları da enzimlerin dezavantajlarından biridir ve sonuç olarak immobilize enzimler fonksiyonel etkinlikleri ve tekrar kullanılabilirlikleri nedeni ile, enzimlerin yüksek maliyetlerine rağmen alternatifleri olarak kullanılırlar. İmmobilize enzim sistemlerinde enzim suda çözünmeyen matrikse, destek materyaline veya taşıyıcıya fiziksel olarak bağlı enzimdir (Bayındırlı, 1995). Yaygın olarak kullanılan materyaller inert polimerler veya inorganik maddelerdir (Datta vd., 2013).

İmmobilize enzim için ideal bir destek materyali çözünmez, rijid yapıda kararlı, tekrar kullanılabilir, fonksiyonel gruplarca zengin olmalıdır ve aynı zamanda mikrobiyal kontaminasyona karşı uzun süre direnç göstermelidir (Datta vd., 2013; Tischer ve Wedekind, 1999).

İmmobilize enzimlerin avantajları:

- a) Enzimin birçok kez geri kazanılması ve tekrar kullanılabilmesi
- b) Ürün ve enzimin birbirinden kolayca ayrılması
- c) Elde edilen üründe daha az kirlenme ve yüksek kalite
- d) Enzim stabilitesinde artış
- e) Düşük maliyetli işlemler ve kullanım kolaylığı

olarak sıralanabilir (Hettiarachey vd., 2018).

## 1.6.1. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

### 1.6.1.1. Çapraz bağlama

Moleküller arası bağlar, enzimlerin kovalent bağları, özellikle protein-protein etkileşimleri ya da çözünmeyen taşıyıcı destek yada matris üzerindeki fonksiyonel gruplar aracılığı ile gerçekleştirilen, geri dönüşümsüz bir enzimatik immobilizasyon yöntemidir. Amino (NH<sub>2</sub>), sülfhidril (SH), imidazol ve fenolik (OH) gruplar çapraz bağlanmaya katılabilir (Talekar vd., 2012). Bu immobilizasyon yöntemi basit olmasından dolayı oldukça ilgi çekicidir (Romanskevic vd., 2006).

### 1.6.1.2. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon yönteminde immobilizasyon; destek maddesi ile buna bağlanacak enzim arasında van der Waals etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimler gibi diğer kovalent olmayan etkileşimlerle gerçekleşir. Taşıyıcı/destek maddesi, fiziksel adsorpsiyon için (protein-ligand etkileşim prensiplerine dayanarak) enzim çözeltisinin aşırısı içine daldırılır veya enzim elektrot yüzeyi üzerinde kurutulur. Adsorpsiyon kolay, basit, ucuz ve geri dönüşümlü bir enzim immobilizasyon yöntemi olarak kabul edilir. Bunlara ek olarak bu yöntemin diğer avantajları şunlardır: minimum aktivasyon gerektirir ya da bir ön aktivasyon gerektirmez, bu nedenle ilave bir reaktife ihtiyaç gerek kalmaz. Proteoliz, agregatlaşma ve enzim-taşıyıcı kalitesini bozacak etkileşimlere karşı koruma sağlar ve çalışan enzimin hiçbirinin yerine yenileri gelmez. Bu yöntemin dezavantajı, enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanma ve bağlantı kurma kuvvetlerinin, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşimler, iyonik ve van der Waals kuvvetleri tarafından oluşturulmasından dolayı zayıf olmasıdır (Nisha vd., 2012). Bu sebeple sıcaklık, pH vb. koşullarda meydana gelebilecek bir değişiklik nedeniyle taşıyıcıdan herhangi bir zamanda enzim salımı meydana gelebilir. Adsorpsiyon, taşıyıcı materyalin enzim ile sulu çözelti ortamında belirli bir süre boyunca bir araya getirilmesi ve taşıyıcı ve enzimin yükündeki değişimin adsorpsiyon sınırlamalarını aşmaması kaydı ile pH'ın dikkatli bir şekilde kontrol edilmesiyle kolayca başarılabilir. Bunun nedeni, küçük pH değişikliklerinin enzim ve desteğin iyonik gücünü ve etkileşimini değiştirmesi ve hatta enzim salınımlarına neden olabilmesidir (Costa vd., 2005; Datta vd., 2013; Mohamad vd., 2015; Hettiarachchy vd., 2018).

### 1.6.1.3. İyonik bağlanma

İyonik bağlanma yöntemi, enzimin katı desteğe iyonik etkileşimler ya da tuz köprüleri ile tersinir olarak bağlandığı metottur. Bu yöntemde taşıyıcının özellikleri immobilize enzim bağlantısı ve aktivitesi açısından önemlidir. Buradaki etkileşim adsorpsiyon ile immobilizasyona göre daha güçlü ancak kovalent bağlanmadan daha zayıftır. İyonik bağlanma yöntemi adsorpsiyon ile benzerdir ancak taşıyıcı özellikleri ve dolayısıyla enzim ve taşıyıcı arasındaki bağlanmanın doğası nedeniyle farklılık gösterir (Hartmeier, 1988, Solas vd., 1994; Torres vd., 2002). Bu yöntemin en büyük avantajı, immobilize enzimin aktivitesinin yüksek olmasıdır. Çünkü immobilizasyon işlemine bağlı olarak enzimde küçük konformasyonel değişimler meydana gelir. Yöntemin en büyük dezavantajı ise, enzim-taşıyıcı etkileşimlerini sağlayan iyonlar dışındaki iyonların aracı olmasıdır. Bu iyonlar immobilize enzim ortamında pH veya iyonik kuvvet değişikliklerine neden olabilir ve bundan dolayı taşıyıcıdan enzim salınması gerçekleşir (Costa vd., 2005; Datta vd., 2013; Mohamad vd., 2015).

### 1.6.1.4. Kovalent bağlanma

Bu yöntemde enzimler matrikse, taşıyıcıya veya katı faz desteğe kovalent olarak bağlanırlar. Kovalent bağlar, enzimlerin amino asit birimleri ve taşıyıcının yüzeyindeki fonksiyonel gruplar tarafından oluşturulur. Etkileşime katılan amino asit fonksiyonel grupları sülfhidril (-SH), hidroksil (-OH), amino (-NH<sub>2</sub>) ve karboksil (-COOH) gruplarıdır. Agaroz, akrilamid, gözenekli cam ve silika gibi destek maddeleri kullanılır. Enzimler ile taşıyıcıları birleştirmek için alkilasyon, amidasyon, Schiff bazı oluşumu, diazolama reaksiyonları, peptit, tiyol-disülfid ve amino bağları üzerinden kovalent bağlanma gibi farklı yöntemler bildirilmiştir. Costa vd. (2005), kovalent bağlanmanın enzimi doğrudan desteğe bağlayarak veya enzim ile destek arasında bir uzatıcı kol ekleyerek de gerçekleştirilebileceğini bildirmiştir.

Çapraz bağlı enzim agregatları (CLEAs) gibi en güncel teknikler daha fazla enzim esnekliğine izin verir ve böylece aktivitesi daha yüksek hale getirilebilir. Kovalent bağlanma iki ana adımda gerçekleşir: siyanojen bromür gibi reaktif bir bileşik eklendiğinde taşıyıcı maddenin aktivasyonu ve onu aktive etmek için matris omurgasının modifikasyonu (Nisha vd., 2012). Bu, taşıyıcının aktive edildiğinde elektrofilik gruplar oluşturduğu ve daha sonra enzimlerin amino asit birimleri

üzerindeki nükleofilik gruplar ile reaksiyona girdiği anlamına gelir. Katılan amino asitler, sülfhidril ve/veya hidroksil grupları ile sistein, serin ve threonin amino asitleri; arjinin, aspartik asit, histidin gibi diğer amino asitler ve imidazol, indolil, fenolik hidroksil gibi fonksiyonel grupları taşıyan amino asitlerdir (Chae vd., 1998; D'Souza, 1999; Quirk vd., 2001; Yang vd., 2003; Costa vd., 2005; Bickerstaff, 2009; Nisha vd., 2012; DiCosmo vd., 2013; Datta vd., 2013).

Enzim aktif bölgesine herhangi bir hasar vermemek için dikkatli olunmalıdır. Bu enzim inaktivasyonunu önleyecektir. Bu bağlama yöntemi için çeşitli taşıyıcı malzemeler vardır ve en uygun olanını seçmek için taşıyıcıların spesifik özelliklerine önem verilmelidir. Bu yöntemde bağlanma diğer bağlanma yöntemleriyle karşılaştırıldığında sıcaklık ve çözücü gibi çevresel değişimlere karşı daha kararlı veya dirençlidir. Bu yöntemin dezavantajı, enzimin konformasyonunda değişikliklere ve bazen katalitik aktivitesinde azalmaya neden olmasıdır (Rosevear vd., 1987; Harold, 1991; Costa vd., 2005; Bickerstaff, 2009).

#### **1.6.1.5. Tutuklama, kapsülleme ve/veya mikrokapsülleme**

Tutuklama, kapsülleme ve/veya mikrokapsülleme, enzimi jelde veya doğal veya sentetik polimerik bir lif içinde çevreleyerek veya hapsederek gerçekleştirilir. Enzimin tutuklanmasını engelleyen ancak substratların ve ürünün geçmesine izin veren bir membran vardır. Bu yapı genellikle, enzimleri küre şeklinde, seçici olarak geçirgen membranlar içinde çapraz bağlayarak veya çevreleyerek elde edilir. Enzimler seçici olarak geçirgen, küre şekilli bir membran içinde çevrelendiğinde, bu yöntem kapsülleme veya mikrokapsülasyon olarak adlandırılır. Böylece enzim ve polimerik matriksler için büyük temas alanına imkan sağlamış olur. Enzimin kapsülleme sırasında deaktive olma ihtimali ve enzim aktif bölgesine substratın kütle transferinin azalması yöntemin dezavantajıdır (Nisha vd., 2012; Mohamad vd., 2015).

Bu yöntemlerin avantajları, düşük maliyetli olmaları, uygun işlem koşulları sağlamaları, enzim ve substrat arasında geniş temas alanı ve hızlı başarı sağlamasıdır. Dezavantajları ise, enzim kaybını önlemek için kalıbın gözenek büyüklüğüne bağlı olan kütle akışının transferi veya azalması, ihtiyaç duyulan enzim miktarının yüksek olması ve enzim aktivitesinde kayıpların meydana gelebilmesidir (Rosevear vd., 1987).



Genel olarak, enzimler ve destek malzemesi arasında en güçlü kimyasal ilişkiyi oluşturulan yöntemler çapraz bağlama ve kovalent bağlama yöntemleridir. Ancak, bu iki yöntem enzim aktivitesini önemli ölçüde azaltabilir. Ayrıca, diğer yöntemlere kıyasla yüksek maliyetli olabilir ve yoğun çalışma gerektirebilirler. Diğer taraftan, jelde tutulma ve adsorpsiyon gibi yöntemlerde destek materyali ve enzimler arasında kuvvetli bir bağlanmanın olmadığı belirtilmektedir. Bu yöntemler hala etkilidir ve gerçekleştirilmesi kolaydır, ancak enzimler sıklıkla kalıptan ürüne akar veya damlar. Bu problem genellikle enzimlerin glutaraldehit ile çapraz bağlanmasıyla çözülür (Bayindirli, 1995; Costa vd., 2005; Bickerstaff, 2009; Nisha vd., 2012; DiCosimo vd., 2013; Datta vd., 2013).

## **1.7. Diğer İmmobilizasyon Yöntemleri**

### **1.7.1. Disülfid Bağları**

Disülfid bağının, bağlantılarının veya köprülerinin oluşumu, enzimlerin immobilizasyonu için bildirilen bir diğer yöntemdir. Disülfid bağları veya S-S köprüleri, iki tiyol grubunun birleşmesiyle oluşan kovalent bağlardır. Genel olarak bu tür bağlantılar, enzim veya hücre immobilizasyonu için kullanılan kovalent bağlanma olarak düşünülebilir (Brena ve Batista-Viera, 2006).

### **1.7.2. Metal Bağlama**

Metal bağlama veya şelatlama, geçiş metallere türetilen hidroksitler veya tuzlar kullanılarak koordinasyon, kovalent veya dipolar bağlarla gerçekleşir. Zirkonyum ve titanyum, enzimi taşıyıcıya bağlamak için sıkça kullanılır. Bunun için, metallere bazı serbest elektronları enzimin hidrofilik grupları ile koordine edilebilir. Bu şekilde, enzim immobilize edilir (Cabral vd., 1986; Brena ve Batista-Viera, 2006).

## **1.8. Nanoteknoloji**

Nanoteknoloji, nanometre büyüklüğündeki objeleri ele alan teknolojidir. Nanoteknolojinin maddeler, aygıtlar ve sistemler düzeyinde gelişeceği beklenmektedir. Maddeler, aygıtlar ve sistemler. Nanomateryaller şu anda, hem bilimsel hem de ticari uygulamaları açısından oldukça gelişmiştir. Bundan on yıl

önce, nanopartiküller boyuta bağlı fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle çalışılmaktaydı. Günümüzde nanomateryaller ticari keşif dönemine girmişlerdir.

Yaşayan organizmalar, genellikle 10 nm boyutlarında hücrelerden yapılmışlardır. Bununla birlikte hücre kısımları çok daha küçüktür ve mikron altı büyüklüğündeki alanlara sahiptirler. En küçük insan yapımı nanopartiküllerin boyutları bile, çok daha küçük sadece 5 nm boyutunda olan proteinlerin boyutları ile karşılaştırılabilir seviyededir. Bu basit büyüklük karşılaştırması, çok fazla girişim göstermeksizin hücresel makineleri gözetlememize izin veren çok küçük problemler olarak nanopartikülleri kullanma fikrini verir. Nano düzeyindeki biyolojik işlemleri anlamak, nanoteknolojinin gelişmesi için önemli bir konudur.

Biyoloji ve tıpta nanomateryallerin uygulamalarının bazıları:

- ✓ Biyolojik floresan etiketleme
- ✓ İlaç ve gen dağılımı
- ✓ Patogenlerin biyobelirlenmesi
- ✓ Proteinlerin belirlenmesi
- ✓ Doku mühendisliği
- ✓ Isıtma yoluyla tümör yıkımı
- ✓ Biyolojik moleküllerin ve hücrelerin ayrılması ve saflaştırılması
- ✓ MRI kontrast geliştirme
- ✓ Fagokinetik çalışmalar

(Salata, 2004)

### **1.8.1. Nanoteknolojinin Tarihçesi**

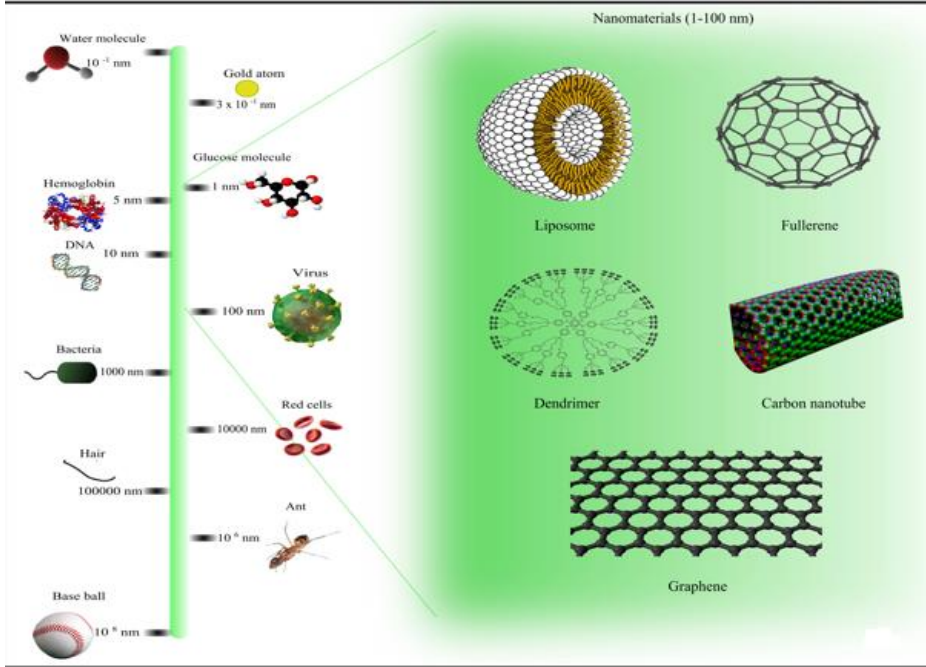
Fizikçi Richard Feynman'ın Amerikan Fizik Derneğinde 1959'da yaptığı 'Dipte çok miktarda boşluk var (There's Plenty of Room at the Bottom)' başlıklı konuşmasında ilk kez nanoteknoloji yaklaşımı gündeme gelmiştir. Feynman meşhur söyleminde "Görebildiğim kadarıyla, fizik prensipleri nesnelere atom düzeyinde manipüle edilmesine karşı değildir. Bu, herhangi bir yasayı ihlal girişimi olmayıp, prensipte yapılabilir olan fakat biz çok büyük olduğumuz için pratikte şimdiye kadar yapılmamış olan bir şeydir" demiştir.

Bununla birlikte, “nanoteknoloji” terimi ilk kez Tokyo Science Üniversitesi’nden Profesör Norio Taniguchi’nin 1974’de yayımladığı makalede “nanoteknoloji maddenin tek bir atom veya tek bir molekül düzeyinde ayrılması, birleştirilmesi ve deforme edilmesi süreçlerinden oluşur” şeklinde tanımlanmıştır.

Feynman’ın önerisinden sonraki yıllarda nanoteknoloji alanı Eric Drexler ve Richard Smalley; biyonanoteknoloji alanı da Chad Mirkin’in çalışmalarıyla başlamış kabul edilebilir. Rice Üniversitesinde bir kimya profesörü olan Richard Smalley nanoteknoloji alanının öncülüğünü yapmış ve 1996 yılında Nobel ile ödüllendirilmiştir.

Eric Drexler 1991’de MIT’de moleküler nanoteknoloji alanındaki ilk doktora yapmıştır. Chad Mirkin ise nanosistemlerde kimyasal modifikasyon üzerine yaptığı çalışmalar ile biyonanoteknoloji alanına yeni açılımlar getiren öncü kimyacılarından birisi olmuştur. Ayrıca 1980’lerde gerçekleşen iki önemli gelişme: cluster (küme) biliminin doğuşu ve taramalı tünelleme mikroskop (scanning tunneling microscope: STM)’un icadı nanoteknoloji ve nanobilimin başlamasına öncülük etmiştir. Bu gelişmeler 1986’da fullerenlerin ve birkaç yıl sonra da karbon nanotüplerin keşfine neden olmuştur.

Daha sonra yarı iletken nanokristallerin sentezi ve özelliklerinin incelenmesi ve atomik kuvvet mikroskopunun (AFM) icadı nanoteknoloji alanına çok önemli katkılar sağlamıştır. Köken olarak Yunanca nanos’dan gelen “nano” cüce anlamına gelmektedir. Bir nanometre, metrenin milyarda biridir ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) ve saç telinin kalınlığı ile kıyaslandığında bir nanometre saç telinin yüz binde biridir (Yıldırım vd., 2010).



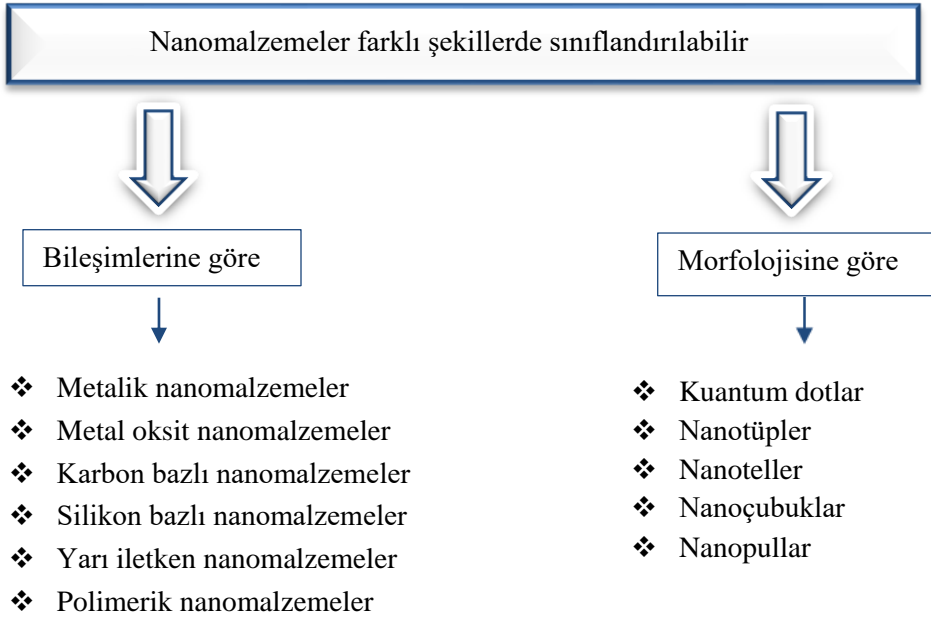
Şekil 1.4. Nanometre boyutlu yapılara örnekler ([https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Comparison\\_of\\_nanomaterials\\_sizes.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Comparison_of_nanomaterials_sizes.jpg)).

Nanoteknoloji uygulamalarının temelinde materyal boyutlarının küçültülmesi sonucu fiziksel özelliklerin değişmesi vardır. Örneğin nanopartiküller çok büyük yüzey alanı/hacim oranına sahiptirler. Buna bağlı olarak floresans gibi optik özellikler partikül çapının bir fonksiyonu haline gelirler.

Nanopartiküller kullanılarak yapılan malzemelerde sertlik ve elastikiyet özellikleri değişir. Geleneksel polimer yapıların nanopartiküller kullanılarak güçlendirilmesi mümkündür. Böyle nanoteknolojik olarak güçlendirilmiş materyallerin kütlesi azalırken dayanıklılığı ve fonksiyonelliği artmaktadır.

### 1.8.2. Nanomalzemeler

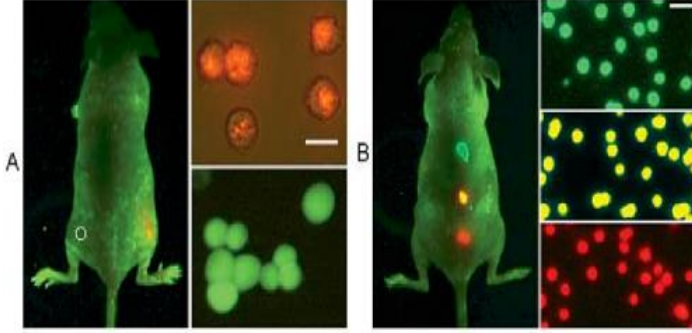
Nanomalzemeler, en azından tek bir boyutu 1-100 nm arasında olan ve mekanikte, elektrikte, optikte ve termotikte pek çok yeni özelliğe sahip olan malzemelerdir.



Nanomalzemeler bileşimleri, boyutları ve morfolojilerinin ayarlanabilmesinin yanında, protein ve peptitlerin bağlanabilmeleri için eşsiz yüzey modifikasyonlarına izin veren malzemelerdir. Nanomalzemelerin sunduğu bu özellikler onları enzim immobilizasyonunda tercih edilen destek materyalleri yapmıştır. Aşağıda bazı önemli nanomalzemeler hakkında bilgiler verilmektedir.

### 1.8.2.1. Kuantum Dotlar

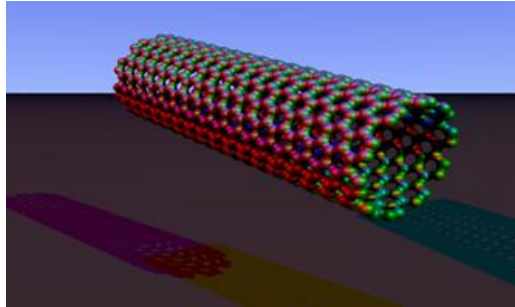
Kuantum dotlar, nano boyuttaki ışık emici moleküllerdir ve nanokristaller olarak da adlandırılırlar. ZnS ve CdS'den oluşan bir kabuk ile çevrilmiş CdSe, CdTe, PbS ve PbSe gibi yarı iletken maddelerden meydana gelmektedirler. Bu nano oluşumlar tipik olarak birkaç nanometreden 100 nanometreye kadar boyutlara sahiptir ancak daha büyük de olabilirler. Kuantum dotların spesifik özellikler kazanması amacıyla bazı polimer maddeler ile kaplanması söz konusudur. Kuantum dotlar biyo-etiketleme, biyo-görüntüleme ve biyo-hedefleme de yaygın olarak kullanılırlar. (Yıldırım vd., 2010).



Şekil 1.5. Biyogörüntüleme kuantum dotlar (Walling vd., 2009)

### 1.8.2.2. Karbon Nanotüpler

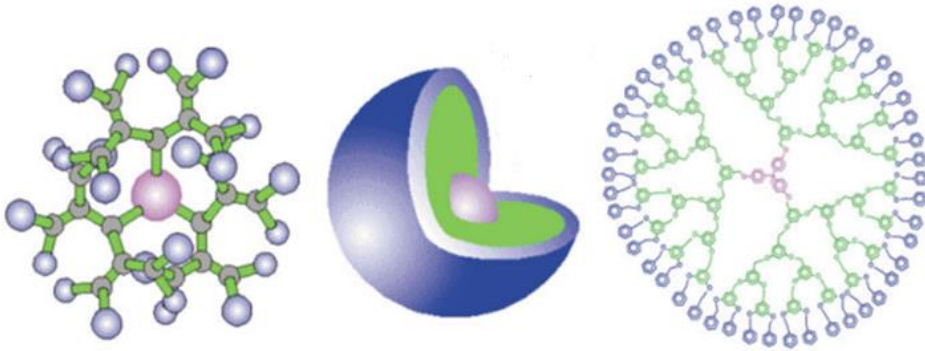
Karbon nanotüpler, tek bir grafit tabakasının silindir şeklinde kıvrılmasıyla hazırlanan, tek duvarlı veya çok duvarlı olabilen nanomalzemelerdir. Karbon nanotüpler farklı boyda, kalınlıkta, çok katmanlı ve spiral olarak hazırlanabilirler. Karbon nanotüpler, eşsiz elektronik, mekanik ve kimyasal özelliklerinden dolayı biyosensör uygulamalarında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Ayrıca, eşsiz yüzey özellikleri ve geniş yüzey alanı özelliklerinden dolayı, çeşitli bileşiklerin katı faz ekstraksiyonunda adsorban materyali olarak tercih edilmektedirler. Son yıllarda DNA, peptitler ve proteinler gibi biyolojik moleküller ile modifiye edilmiş karbon nanotüpler arasındaki etkileşimleri içeren çalışmalar bulunmaktadır (Du vd., 2007).



Şekil 1.6. Tek duvarlı karbon nanotüp yapısı (<http://reader.roodo.com/miss9ch/archives/11973895.html>).

### 1.8.2.3. Dendrimerler

Dendrimer kelimesi Yunanca ‘ağaç’ (dendron) kelimesinden türemiştir. Bir çekirdek ve çekirdek etrafında dallanmış birimlerden oluşan yapılardır. Dendrimerlerin çeşitliliği fonksiyonel gruplarla sağlanmaktadır. Boyutları 1-20 nm arasında değişen dendrimerler yüzeylerinde fonksiyonel gruplar taşırlar ve çekirdek, dallar ve uç grup olmak üzere 3 temel bileşenden oluşurlar.



Şekil 1.7. Temel bileşenleri belirtilen üç dendrimer gösterimi (Frechet, 2003).

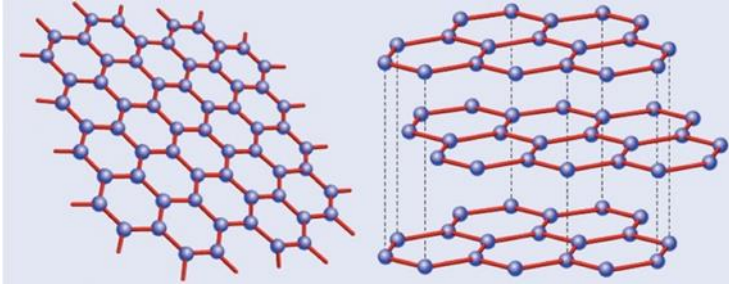
Dendrimerlerin kullanım alanları:

- 1) Biyotıp
  - ❖ İlaç ve DNA dağıtımı
  - ❖ Kanser teşhisi
- 2) Kataliz
- 3) Elektronikler
  - ❖ Işık toplayan cihazlar
  - ❖ Optik sensörler ve görüntüleme

Nanomalzemeler dendrimerler ile modifiye edilerek enzim ve protein immobilizasyonunda kullanılabilir (Wang vd., 2013).

### 1.8.2.4. Grafen

Hegzagonal simetride kimyasal olarak bağı olan karbon atomlarının tek atomik katmanı olan grafen gerçek iki boyutlu kristal yapı gösterir ve eşsiz özelliklere sahiptir. İlk kez laboratuvarında üretildiğinden beri grafen ve türevleri büyük araştırma ve teknolojik ilgiye sahip olmuştur. Laboratuvarlarda grafenin keşfi gerçek 2D kristallerinin doğada olup olmadığı hakkında uzun süreli bir tartışma ile sonlanmıştır. Bununla birlikte saf grafen tabakasının teorik yüzey alanı ( $2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), Young's modülü ( $\sim 1.0 \text{ Tpa}$ ), iç mobilitesi ( $\sim 2 \times 10^5 \text{ cm}^2 \text{ v}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), termal iletkenliği ( $5000 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) ve geniş dalga boyu aralığındaki iyi optik geçirgenliği ( $\sim 97,7\%$ ) gibi eşsiz özellikleri grafene ve onunla ilgili diğer materyallere birçok uygulama için potansiyel sağlamıştır. Örneğin grafen kullanılarak iskele materyalleri, elektronik aygıtlar, enerji depolama sistemleri (süper kapasitörler, ikincil lityum iyonu pilleri), enerji dönüşüm aygıtları (yakıt hücreleri güneş pilleri) ve biyokimyasal sensörler üretilmiştir. Grafen tek atom kalınlığında yalnızca karbon-karbon bağlarından oluşan, bal peteği yapısında oldukça sıkı paketlenmiş düzlemsel bir yapıdadır. Geniş yüzey alanı, yüksek mekanik kararlılık ve elektriksel iletkenliğinin yüksek olmasından dolayı grafen biyosensör/biyogörüntüleme, ilaç dağıtımında ve kanserin fototermal tedavisinde kullanılmaktadır (Zhang vd., 2013).



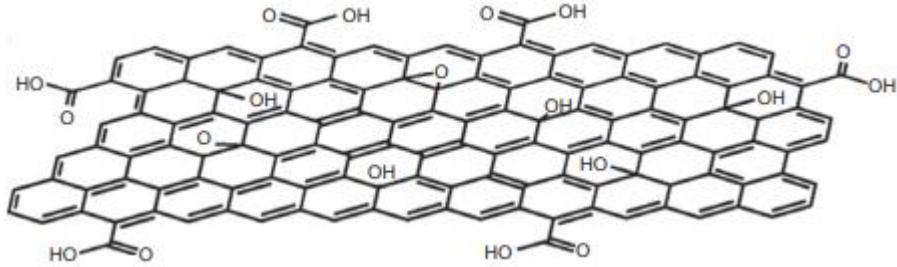
Şekil 1.8. Grafenin şematik gösterimi (<https://graphene.nus.edu.sg/what-exactly-is-graphene/>)

### 1.8.2.5. Grafen Oksit

Grafen oksit epoksit, hidroksil ve karboksil gibi oksijen içeren gruplarca zengin bir yüzeye sahiptir. Zenginleştirilmiş yüzey fonksiyonelliği nedeniyle grafen oksit tabakaları sulu çözeltilerde ve bazı polar organik çözücülerde iyi çözünürlüğe



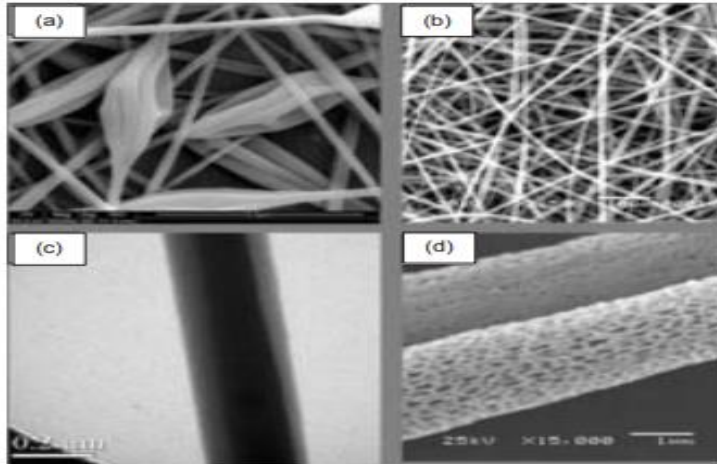
sahiptir ve ıslak kimyasal işlemle kolayca işlenebilir. Yüzeyindeki fonksiyonel gruplar, herhangi bir kimyasal bağlama ajanı veya ilave yüzey modifikasyonu kullanmaksızın küçük moleküller, polimerler, biyomakromoleküller ve inorganik nanopartiküller gibi dış grupların bağlanması için reaksiyon bölgelerinin bolluğunu da sağlar (Zhang vd., 2013).



Şekil 1.9. Grafen oksitin şematik gösterimi (Zhang vd., 2013)

### 1.8.2.6. Nanolifler

Nanolifler, nanometre çapına sahip lif yapısındaki malzemelerdir. Küçük çaplarından dolayı yüzey/hacim-kütle oranları yüksektir. Nanolif hazırlamada kullanılan yaygın yöntem elektro-eğirme yöntemidir. Bunun yanısıra bazı özel bakteri tiplerinin de nanolif ürettikleri bilinmektedir (Ma ve Ramakrishna, 2008).



Şekil 1.10. Farklı morfolojilerdeki nanoliflerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (Ramakrishna vd., 2006)

## 1.9. Nanopartiküller

Nanopartiküllerin çeşitli tipleri sayısız biyokimyasal ve biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmıştır. Nanopartiküller inorganik veya organik (polimerler gibi) maddelerden yapılmış mikronaltı boyutlardaki parçalardır. Klasik nanopartikül tanımında partikül boyutu 1-100 nm aralığında olmasına karşılık literatürde birkaç yüz nanometre boyutundaki partiküller için de bu tanım kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin önemi, aynı bileşimdeki kütle materyallerinden farklı özelliklere sahip olmaları nedeniyledir. Bu özellikler onların küçülmüş boyutlarına bağlı olarak oluşan yüzey etkileri, manyetik ve elektronik davranışlarını içerir (Huang ve Juan, 2011).

Nanopartiküller geniş yüzey alanları sebebiyle destek materyali olarak kullanıldıklarında yüksek miktarda enzim/protein bağlama kapasitesi sergilerler. Nanopartiküllere örnek olarak;

- ❖ Manyetik nanopartiküller
- ❖ Altın nanopartiküller
- ❖ Gümüş nanopartiküller
- ❖ Polimerik nanopartiküller

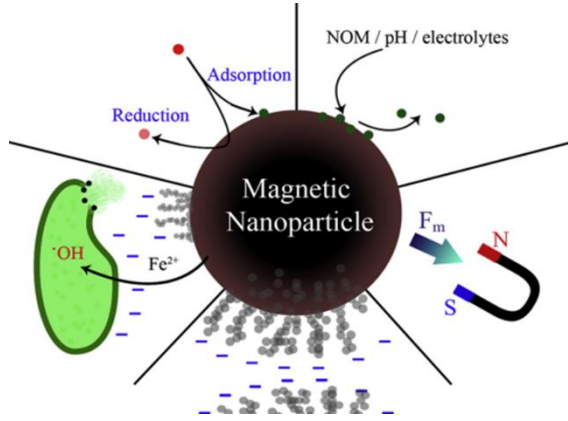
verilebilir.

### 1.9.1. Manyetik Nanopartiküller

Birçok biyomedikal uygulamada genellikle yüksek doygunlukta magnetizasyon içeren metaller (Fe, Co, Ni gibi) veya metal oksitlerini içeren materyaller tercih edilir. Saf metaller yüksek doygunlukta magnetizasyona sahip olmalarına rağmen oldukça toksiktir ve oksidasyona duyarlıdır. Bu sebeple bu metal nanopartiküller biyomedikal uygulamalara uygun değildirler. Aksine demir oksitler oksidasyona daha az duyarlıdır ve bu sebeple daha kararlı manyetik cevap verirler. Demir oksit manyetik nanopartiküller çok kristalli yapıya sahiptir ve çeşitli biyomedikal uygulamalarda  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemit) ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetit) sıkça kullanılır (Huang ve Juan, 2011).

Manyetik nanopartiküller bir manyetik alana cevapta eşsiz özellikler sunarlar. Farklı materyaller ve demir oksitlerin kombine olmasıyla hazırlanan

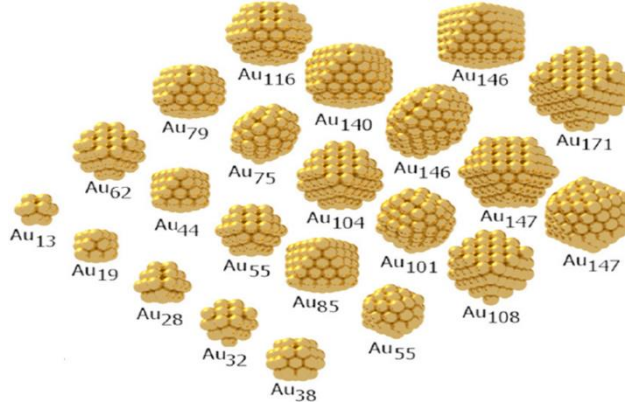
nanomateryaller, multifonksiyonel manyetik nanopartiküller olarak, içerdikleri farklı materyallerden dolayı yüksek özgülük, spesifik yüzey kimyası, özgül optik ve manyetik özellikler taşırlar ve bu özellikler onların yaygın kullanım alanları bulmasını sağlar. Bu kullanım alanları protein saflaştırma, enzim immobilizasyonu, kirlilik giderme, ilaç salımı, fototermal terapi ve manyetik rezonans görüntüleme olarak ifade edilebilir (Alpay, 2015).



Şekil 1.11. Manyetik nanopartiküllerin yapısı (<https://www.nanoshel.com/magnetic-nanoparticles/>)

### 1.9.2. Altın Nanopartiküller

Eşsiz ayarlanabilir optik özelliklere sahip, inert ve non-toksik nanomateryallerdendir. Tayin, belirleme ve görüntüleme amaçlı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Altın nanopartiküllerin sunduğu en önemli avantaj tiyol bağları vasıtasıyla kolayca modifiye edilebilmeleridir. Bu özellik, enzim immobilizasyonunda önemli avantajlar sunmaktadır (Bao vd., 2007).

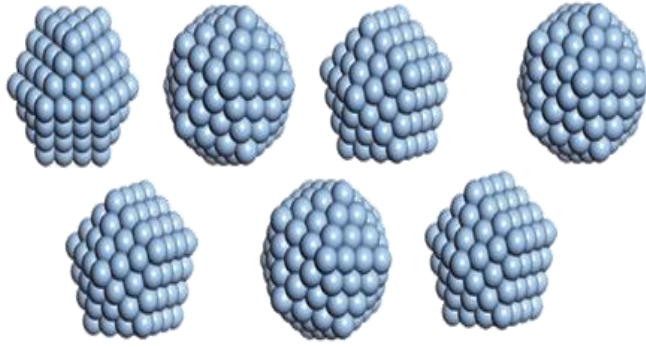


Şekil 1.12. Altın nanopartiküllerin şematik gösterimi ([https://www.researchgate.net/figure/Virtual-sample-set-of-relaxed-gold-nanoparticles-of-different-sizes-and-shapes-The\\_fig6\\_230912444](https://www.researchgate.net/figure/Virtual-sample-set-of-relaxed-gold-nanoparticles-of-different-sizes-and-shapes-The_fig6_230912444))

### 1.9.3. Gümüş Nanopartiküller

Gümüş nanopartiküller yüksek elektriksel ve termal iletkenlik, kimyasal dayanım, katalitik aktivite ve optik özellikleri açısından eşsiz fiziko-kimyasal özellikler sergilemektedir. Tüm bu özelliklerinden dolayı gümüş nanopartiküller biyosensör, mikroelektronik ve medikal biyo-görüntüleme uygulama alanları bulmuştur. Ayrıca, gümüş nanopartiküller geniş spektrumlu bakteri öldürücü etkiye sahiptir ve bu onlara birçok endüstriyel uygulama alanı sağlamıştır.

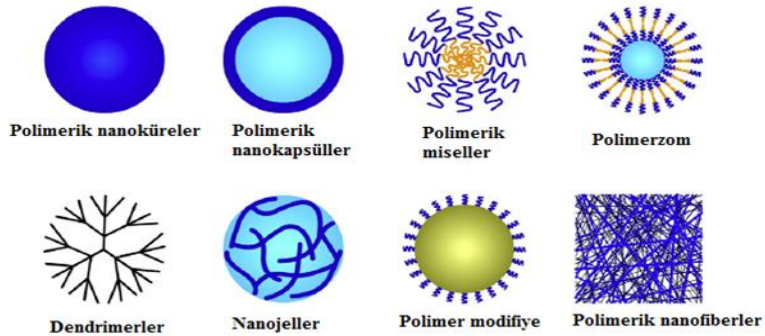
Altına benzer şekilde gümüşün de tiyol gruplarına ilgisi vardır ve bu yolla kükürt içeren ligandların gümüş nanopartiküllere bağlanması söz konusu olur. Ayrıca manyetik özellik gösteren bileşikler ile manyetik gümüş nanopartiküller hazırlanabilir ve enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak kullanılabilir (Bae vd., 2010).



Şekil 1.13. Gümüş nanopartiküllerin şematik gösterimi (<https://today.anl.gov/2016/01/silver-nanoparticle-synthesis/#prettyPhoto/0/>)

#### 1.9.4. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, polimerleşebilen monomer öncüllerinin uygun koşullarda polimerleştirilmesi ile sentezlenir. Oldukça kararlı olan polimerik nanopartiküller, çeşitli ligandlar kullanılarak yüzey modifikasyonları ile fonksiyonelleştirilmektedirler. Nanopolimerler lineer veya dallanmış olabilirler. Lineer polimerlere örnek olarak N-(2-hidroksipropil)metakrilamid veya polimalik asit, dallanmış polimerlere örnek olarak dendrimerler verilebilir. Nanopolimerlere bağlanabilen moleküller peptitler veya proteinler, kemoterapi ilaçları ve/veya oligonükleotidler, membranolitik gruplar ve tümör görüntüleme grupları olabilir (Ljubimova ve Holler, 2012).



Şekil 1.14. Polimerik nanopartiküllerin şematik gösterimi (das Neves vd., 2015)



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Enzimler protein yapısındaki katalizörlerdir ve geleneksel organik ve inorganik katalizörlerin aksine enzimler büyük ve narin moleküllerdir. Bu sebeple bilim adamları ve mühendisler çeşitli teknolojilerde tekrar tekrar kullanılmaları amacıyla kolaylıkla ayrılabilen bir destek üzerine enzim immobilizasyonunu başlangıçta zor bir işlem olarak görmüştür. Bilindiği üzere enzim immobilizasyonu enzimin defalarca kullanılması, kolay ürün ayrımı ve enzimin kararlılığındaki artış gibi avantajlarından dolayı endüstriyel uygulamalarda önem teşkil etmektedir. Enzim immobilizasyonu kovalent ve non-kovalent olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilir. Non-kovalent immobilizasyon çok ekonomik ve basit bir metottur ve enzim aktivitesi immobilizasyon sırasında korunur. Bu metodun temel dezavantajı enzimin desteğe zayıf bağlanmasıdır. Adsorbe enzimin kararlılığı, destek ve protein yüzeyindeki amino asit birimleri arasında oluşan non-kovalent bağların kuvvetine bağlıdır. Enzim ve destek arasında oluşan bağlar elektrostatik ve hidrojen bağlarıdır. Kovalent immobilizasyonda destek ve enzim molekülü arasında kovalent bağların oluşması söz konusudur. Bu metodun avantajı enzimin sızmasının söz konusu olmamasıdır. Ancak bazen kovalent bağların oluşumuna aktiviteden sorumlu amino asitlerin katılması nedeniyle aktivitenin azalması gibi dezavantajlar ortaya çıkmaktadır.

Son yıllarda biyoteknoloji alanında manyetik nanopartiküllerin kullanımı çok popülerdir. Enzim immobilizasyonunda destek materyali olarak manyetik nanopartiküllerin kullanılması daha fazla enzim yüklemesine imkan veren geniş spesifik yüzey alanı, düşük kütle transfer direnci ve bir manyetik alanın uygulanması ile reaksiyon karışımından immobilize enzimin seçici olarak ayrılması gibi avantajlar sunar. Manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı enzim immobilizasyonu çalışmalarına örnek olarak şunlar verilebilir (Huang vd., 2011).

Liao ve Chen (2001) gerçekleştirdikleri bir immobilizasyon çalışmasında maya alkol dehidrogenaz enzimini  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartiküller üzerine immobilize etmişlerdir. Immobilize formdaki enzimin aktivitesinin %62 oranında korunduğu gözlenmiş ve 10 kat oranda artan bir kararlılık sergilenmiştir. Araştırmacılar serbest ve immobilize alkol dehidrogenazın kinetik parametrelerini de incelemişler ve substratına olan ilgisinin bir miktar azaldığını bulmuşlardır.

Chen ve Liao (2002) alkol dehidrogenaz enzimini kendi hazırladıkları  $Fe_3O_4$  nanopartiküllerin üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Sentezlenen nanopartiküllerin boyut analizini TEM ile gerçekleştiren araştırmacılar, alkol dehidrogenaz immobilizasyonunu FTIR ile göstermişlerdir. İmmobilizasyon veriminin neredeyse %100 olduğu çalışmada Michaelis sabitleri ve maksimum spesifik aktivite denemeleri de gerçekleştirilmiştir.

Karıştırılmalı proseslerde oluşan gaz baloncukları glukoz oksidaz enzimi üzerine olumsuz etkiler göstermektedir. Bu amaçla manyetik nanopartiküller üzerine immobilize edilen glukoz oksidaz enzimi dekstran aldehit ile kaplanarak gaz baloncuğu ile direkt teması engellenmiştir. Bu sayede artan kararlılığı ve stabilitesi ile birlikte karıştırılmalı fermantasyon sistemlerinde başarılı bir şekilde kullanılabilmesi ifade edilmiştir (Betancor vd., 2005).

Shaw vd. (2006), rekombinant esteraz (*Pseudomonas putida*'dan) enzimini manyetik nanopartiküller üzerine glutaraldehit aktivasyonu ile kovalent olarak bağlamışlardır. Sentezlenen  $Fe_3O_4$  nanopartikülleri XRD, TEM, ve FTIR analizleri ile karakterize etmişlerdir. Enzim, immobilizasyon sonrası başlangıç aktivitesinin %63'ünü korumuştur. İmmobilize enzim tekrar tekrar kullanılmış ve 10 döngü sonunda aktivitesinin %84'ünü göstermiştir.

Saiyed vd. (2007), manyetik  $Fe_3O_4$  nanopartiküller üzerine alkalin fosfat enzimini karbodiimid aktivasyonu ile immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyon verimi %80-100 ve aktivite verimi %43 olarak elde edilmiştir. İmmobilize enzimin 16 haftalık depolama süresinde aktivitesinin korunduğu bildirilmiştir. Hazırlanan immobilize enzimin uygulaması olarak plazmid DNA fosforilasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Yong vd. (2008),  $Fe^{3+}$  ve  $Fe^{2+}$  iyonlarını kimyasal olarak birlikte çöktürme yöntemi ile  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartikülleri hazırlamışlar ve partikül yüzeyinde reaktif gruplar oluşturması için manyetik nanopartikülleri vinil-trietoksisilikan ile doğrudan modifiye etmişlerdir. Ardından nanopartikülleri yüzey başlatıcılı radikal polimerizasyonu yöntemi ile glisidil metakrilat ve metakriloksietil trimetil amonyum klorür ile aşlamışlardır. Oluşan partikülleri X ışını toz kırınımı, TEM, FTIR ve titreşim örnek manyetometresi ile karakterize etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar polimer zincirlerinin  $Fe_3O_4$  nanopartiküllerinin yüzeyine etkili bir şekilde asıldığını göstermiştir. Araştırmacılar daha sonra lipaz enzimini %70.4 aktivite



verimi ile elektrostatik ve kovalent bağlanma ile ılımlı koşullar altında manyetik partiküllerin yüzeyine immobilize etmişlerdir. Araştırmacılar immobilize lipazın, serbest lipaz ile karşılaştırıldığında termal stabilitesinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Pan vd. (2009) manyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-kitosan nanopartikülleri, Fe<sup>2+</sup> ve Fe<sup>3+</sup>'ün birlikte çöktürülmesi ile oluşan Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin yüzeyine kitosanın elektrostatik adsorpsiyonu yoluyla hazırlamışlar ve *Aspergillus oryzae* β-galaktozidaz enzimini glutaraldehit aktivite ajanı yardımıyla kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Bu immobilizasyon işlemini immobilizasyon süresi, çapraz bağlama süresi, enzim derişimi, glutaraldehit derişimi ve glutaraldehit ve çözeltisinin başlangıç pH değerlerini inceleyerek optimize etmişlerdir. Sonuç olarak immobilize enzim serbest enzime göre daha yüksek depolama, pH ve termal stabilite göstermiştir. İmmobilize enzim 15 kez kullanıldıktan sonra başlangıç aktivitesinin %92'sini korumuştur. İmmobilize β-galaktozidaz ile substrat olarak laktoz kullanıldığında galaktaoligosakkaritler oluşmuş ve laktozun %50'si hidrolizlendiğinde maksimum verim %15.5 (w/v) olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar manyetik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-kitosan nanopartiküllerin, β-galaktozidaz immobilizasyonu için etkili bir destek olduğunu göstermiştir.

Huang vd. (2010), glukoz oksidaz enzimini glutaraldehit kullanarak Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> manyetik nanopartiküllere kovalent olarak immobilize etmiştir. Optimum immobilizasyon pH 6'da %2'lik (w/v) 3-aminopropiltrioksolan, %3'lük (w/v) glutaraldehit ve gram taşıyıcı başına 0.143 g glukoz oksidaz derişiminde gerçekleşmiştir. İmmobilize glukoz oksidazın aktivitesi pH 7.0 ve 50°C'de 4570 U/g olarak bulunmuştur. Kırk beş °C'de 6 saat bekletildiğinde serbest enzim başlangıç aktivitesinin yalnızca %20'sini gösterirken, immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %80'ini göstermiştir. İmmobilize glukoz oksidaz altı kez kullanıldıktan sonra başlangıç aktivitesinin %60'ını göstermiştir. Ayrıca serbest ve immobilize enzimin depo kararlılığı 4°C'de 1 ay boyunca incelendiğinde serbest enzim başlangıç aktivitesinin %62'sini korurken, immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %75'ini korumuştur.

Zhu vd. (2014), karboksil grupları ile fonksiyonelleştirilmiş silika kaplı manyetik nanopartikülleri kullanarak, EDC/NHS bağlama reaksiyonu ile yeni bir immobilize pankreatik lipaz hazırlamışlardır. Araştırmacılar manyetik

nanopartiküllerin yüzeyine 50 mg enzim/g manyetik nanopartikül immobilizasyon verimi ile pankreatik lipazın kovalent olarak bağlandığını rapor etmişlerdir. İmmobilize lipazın özellikleri ile serbest lipazın özelliklerini karşılaştırmışlar ve immobilize lipazın enzimatik aktivitesinin, tekrar kullanılabilirliğinin, termal stabilitesinin ve depo stabilitesinin önemli oranda yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Atacan vd. (2016), gallik asit ile ön işleme bırakılan  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartiküllerin yüzeyine tripsin enzimini başarılı bir şekilde immobilize etmişlerdir. İmmobilize enzimin Bradford metodu ile proteinin yükleme ölçümlerini ve N- $\alpha$ -benzoil-DL-arjinin-4-nitroanilit hidroklorürün hidrolizi ile aktivite ölçümlerini gerçekleştirmişlerdir. İmmobilize tripsinin yüksek sıcaklıklarda (45-55°C) ve bazik pH'larda (6.0-10.5) daha yüksek enzim aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir. İmmobilize enzimin 4°C'de 120 gün depolamadan sonra başlangıç aktivitesinin %92'sini ve ard arda sekiz kez kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %54.5'ini koruduğunu gözlemişlerdir. İmmobilize tripsinin performansını sığır serum albümin proteinin hidrolizini inceleyerek göstermişlerdir. Ayrıca gerçek bir gıda örneği olarak sığır sütü kullanılmış ve immobilize tripsin ile proteinlerin parçalandığı SDS-PAGE ile gösterilmiştir.

Rodrigues vd. (2018), organofosfor pestisitlerinin belirlenmesi için tek kullanımlık, düşük maliyetli ve duyarlı bir sensör geliştirmek amacıyla kitosan ile modifiye edilmiş  $Fe_3O_4$  manyetik nanopartiküllere asetilkolinesteraz enzimini glutaraldehit yardımıyla immobilize etmişlerdir. Daha sonra enzim bağlı manyetik nanopartikülleri perde baskılı elektrot yüzeyine bağlamışlar ve malathion pestisidinin tayininde kullanmışlardır. Ayrıca hazırlanan sensör domates sosu ve göl suyu gibi gerçek örneklerde denenmiş ve hazırlanan sensörün malathion tayininde iyi duyarlılık ve düşük dedeksiyon limiti gösterdiği görülmüştür.

Tümör hücreleri, daha spesifik olarak lenfatik tümör hücreleri, hızlı malin büyümesini devam ettirebilmek için çok miktarda asparajine ihtiyaç duymaktadır. Hücre diyetten gelen (kan serumu) ve kendi ürettiği (sınırlı miktarda) asparajini bu ihtiyacını karşılamakta kullanmaktadır. Lösemik lenfoblast ve diğer bazı tümör hücreleri asparajin sentetaz enziminden yoksundur veya çok az düzeyde sahiptir ve bu yüzden asparajini *de novo* olarak sentezleyemez ve hayatta kalabilmesi için serumda var olan asparajine ihtiyaç duyar. Asparajinaz serum asparajin düzeyini düşürür ve protein sentezi için gerekli bir faktörün uzaklaştırılması ile tümör

hücrelerini öldürür. Yeterli miktarda asparajin sentetaz enzimi içeren sağlıklı hücreler ise etkilenmeden sağlam kalırlar (Narta vd., 2007; Verma vd. 2007). L-Asparajinaz L-asparajinin L-aspartik asit ve amonyağa hidrolizini spesifik olarak katalizleyen bir enzimdir ve akut lenfoblastik lösemnin tedavisi için kemoterapi ajanı olarak kullanılır (Zhang vd., 2004). L-asparajinaz yüksek terapötik etkisine karşılık alerjik reaksiyonlar oluşturması ve sık dozajlama gereksinimi oluşturan kısa yarı ömre sahip olması gibi bazı kusurlara hala sahiptir (Agrawal vd., 2003). Bu dezavantajların üstesinden gelmek için L-asparajinaz son otuz yıldan fazladır organik, inorganik ve hibrit materyalleri gibi çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmiştir.

Asparajinaz immobilizasyonuna ilişkin yapılan ilk çalışmalardan biri 1982 yılında Poznansky vd. (1982) tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacılar kemoterapi ajanı olarak L-asparajinaz-albumin polimerinin kullanımının avantajlı olduğunu ve bu yapının proteolize karşı serbest enzime göre daha kararlı olduğunu rapor etmişlerdir. Antitümör aktivitesi açısından, immobilize enzimin serbest enzimden 20 kat daha etkili olduğunu ve insan pankreatik tümör hücrelerinin büyümesini önemli oranda inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Gombotz vd. (1985) L-asparajinaz enzimini bir plazma filtresinin gözenekli polipropilen hollow fiberlerine immobilize etmişlerdir. Bu amaçla fiberlerin yüzeyine karboksil grubu içermesi nedeniyle poli(metakrilik asit) radyasyonla aşılınmış ve ardından karbodimid ve NHS kimyası kullanılarak L-asparajinaz enzimi kovalent olarak immobilize edilmiştir. *In vitro* çalışmalar kapsamında immobilize enzimin stabilitesi, kinetik parametreleri ve optimum pH'ı belirlenmiştir. *In vivo* çalışma ise bir hayvan modeli olarak koyun üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacılar bir immobilize L-asparajinaz plazma filtresi kullanan plazmoferezin, akut lenfositik lösemnin tedavisinde yararlı bir klinik araç olduğunu rapor etmişlerdir.

Jean-Francois ve Fortier (1996), L-asparajinaz enzimini poli(etilen glikol) ve BSA'dan yapılmış bir hidrojel matrisine immobilize etmişler ve BSA kullanmanın poli(etilen glikol)'ün biyoyumluluğunu artırdığını belirtmişlerdir. Elli günlük depolama sonunda serbest enzimin başlangıç aktivitesinin %43'ü korunurken, immobilize enzimin aktivitesinin %90'ını koruduğunu rapor etmişlerdir.

Vina vd. (2001), *Erwina carotovora* L-asparajinazını biyolojik olarak aktif fruktoz polimeri levan üzerine kovalent olarak bağlamışlardır. Araştırmacılar immobilizasyon ile immobilize asparajinazın pH'a bağlı aktivite grafiğinde genişleme olduğunu ve 40 ve 50°C'deki stabilitesinin önemli ölçüde arttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca immobilize enzimin stabilitesini yaklaşık 1 ay koruduğunu göstermişlerdir.

Balcao vd. (2001), tetramerik bir enzim olan *E. coli* L-asparajinazını glutaraldehit ile aktive edilmiş agaroz çok noktalı kovalent immobilizasyon yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Araştırmacılar bu immobilize sistemin 50°C'de 80 saat inkübasyondan sonra bile aktivitesini tamamıyla koruduğunu göstermişlerdir ve böylece yüksek stabilitenin özellikle klinikteki ekstrakorporal aygıtlarda önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Zhang vd. (2004), L-asparajinazı ipek özü proteini olan serisin mikropartiküllerine kovalent olarak immobilize etmişler ve immobilize enzimin orijinal enzim aktivitesinin % 62.5'ini gösterdiğini rapor etmişlerdir. Serisine immobilize olmuş enzimin  $K_m$  değeri serbest enziminkinden 8 kat daha düşük ve 40-50°C'deki sıcaklık stabilitesi daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca immobilize asparajinazın serbest enzim ile kıyaslandığında tripsin ile parçalanmaya karşı dayanıklılığının arttığı ifade edilmiştir.

Teodor vd. (2009) hidrojel manyetik nanopartikülleri sentezlemişler ve elde ettikleri nano yapılara L-asparajinaz enzimini tutuklama yöntemi ile immobilize etmişlerdir. Nanopartiküllerin sitotoksitesini ve ayrıca mikroorganizmalar ile etkileşimlerini de değerlendirmişlerdir. L-Asparajinaz tutuklanmış biyoyumlu hidrojel manyetik nanopartiküllerin şişmiş durumda 300 nm ve kurutulmuş durumda 30 nm boyutunda olduğunu ve bu yapıların hücre ve dokulara girebileceğini rapor etmişlerdir. Ayrıca yapılan bu çalışmada elde edilen nano yapıların biyoyumlu olduğu ve tümörlü dokularda L-asparajinaz salımında kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Qiao vd. (2011) poli(glisidil metakrilat-ko-etilen dimetakrilat) polimerini kullanarak L-asparajinaz için monolitik reaktörler hazırlamışlardır. Sonra L-asparajinazı polimerik monolite kovalent olarak immobilize ederek bir kapilere yerleştirmişlerdir. Bu enzimatik mikroreaktörlerin aktivite özelliğini incelemek için Michaelis-Menten kinetik sabitlerini araştırmışlardır. Araştırmacılar insan

serumuna L-asparajin ekleyerek bu enzimatik mikroreaktörün kullanılabilirliğini göstermişler ve bu ekstrakorporal şöntün, enjeksiyonla hastalara doğrudan bir antikanser ilacı olarak L-asparajinazın uygulandığında oluşabilecek yan etkileri ortadan kaldırılabileceğini rapor etmişlerdir.

Ghosh vd. (2012)'in yaptığı bir çalışmada polianilin nanoflifer sentezlenmiş ve L-asparajinaz enzimi adsorpsiyon yoluyla bu nanoflilere immobilize edilmiştir ve enzim içeren destek XPS, XRD, TEM ve FTIR teknikleri ile karakterize edilmiştir. Araştırmacılar immobilize L-asparajinazın serbest enzim ile kıyaslandığında farklı sıcaklık ve pH'larda gerçekleşen parçalanma/denatürasyon işlemlerine karşı daha yüksek kararlılığa sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca immobilizasyondan sonra  $V_{max}$ 'ın yaklaşık iki kat arttığı ve  $K_m$ 'in de yaklaşık 2 kat azaldığı rapor edilmiştir.

Sundaramoorthi vd. (2012) Umman Denizi etrafındaki farklı toprak örneklerinden izole ettikleri on iki izolatin L-asparajinaz aktivitesini taramış ve beş izolatin L-asparajinaz aktivitesi gösterdiğini bulmuşlardır. Daha sonra bu fungusların ürettiği L-asparajinaz enzimini alarak farklı destekler üzerine (silika jel, agaroz, aktive edilmiş karbon, karboksimetil selüloz, yumurta kabuğu, trikalsiyum fosfat) glutaraldehit vasıtasıyla kovalent olarak bağlamaya çalışmışlardır. En yüksek immobilizasyon aktivitesini ve verimini %86.84 olarak silika jel ile elde etmişlerdir.

Mu vd. (2014), manyetik nanopartikülleri tersinir ekleme-parçalanma zincir transfer polimerizasyonu tekniği kullanarak hazırlanmış poli(2-vinil-4,4-dimetilazlaktan) polimeri ile fonksiyonelleştirmişler ve bu desteğe L-asparajinaz enzimini kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Immobilize enzim sisteminin 10 kez kullanımdan sonra bile aktivitesini %95.7'sini koruduğunu ve 10 haftalık depolama sonunda başlangıç aktivitesinin %72.6'sından fazlasını gösterdiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca bu hazırlanan L-asparajinaz reaktörünün lösemi tedavisinde potansiyel uygulama kabiliyetini göstermek için bir ekstrakorporal şönt sistemi simülasyonunu hazırlamışlardır.

Bahreini vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, pAED4 plasmidinde klonlanmış asparajinaz II geni *E. coli*'ye yerleştirilmiş ve optimum koşullarda ekspres edilmiştir. Bu şekilde üretilen ve kristallendirilen L-asparajinaz II enzimi iyonotropik jelleşme metoduyla kitosan-tripolifosfat nanopartiküllere

yüklenmiştir. Optimum tutuklama koşulları ve protein yükleme miktarı araştırılmış ve kitosan-tripolifosfat nanopartiküllere enzimin bağlandığı FTIR ile gösterilmiştir. İmmobilize enzimin serbest enzimle kıyaslandığında *in vitro* yarılanma ömrünün arttığı, immobilize enzimin sıcaklık ve pH stabilitesinin serbest enzimle karşılaştırılabilir olduğu rapor edilmiştir.

Ulu vd. (2016a), L-asparajinaz immobilizasyonu için poli(MAA-co-MMA)-nişasta kompozitini hazırlamışlar ve FTIR, TGA, DTA ve DSC ile karakterize etmişlerdir. İmmobilizasyondan önce ve sonra yapılan SEM, EDX ve AFM analizleri ile kompozitlerin yüzeyi analizlenmiştir. İmmobilize asparajinazın özellikleri araştırılmış ve serbest asparajinaz ile karşılaştırılmıştır. İmmobilize asparajinazın daha iyi sıcaklık ve pH stabilitesine sahip olduğu ve 25°C'de 30 gün depolamadan sonra bile kararlılığını koruduğu rapor edilmiştir.

Ulu vd. (2016b) yayınladıkları başka bir makalede poli(HEMA)-nişasta kompozitlerinin de asparajinaz immobilizasyonunda kullanılabileceğini rapor etmişlerdir. Asparajinaz aktivitesinin optimum koşullarının immobilizasyondan etkilenmediğini, serbest ve immobilize enzimin optimum pH'nın 8.5 ve optimum sıcaklığının 45-50°C olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca immobilize asparajinazın yüksek pH ve sıcaklıkta daha kararlı olduğunu bulmuşlar ve serbest ve immobilize enzimin  $K_m$  değerlerini 1.58 ve 0.56 mM ve  $V_{max}$  değerlerini 5882 ve 3610 U/mg olarak hesaplamışlardır.

Bahraman ve Alemzadeh (2017), *E. coli* ATCC 11303 asparajinaz enzimini kalsiyum aljinat kürelere başarılı bir şekilde immobilize etmişler ve maksimum asparajinaz aktivitesini elde etmek amacıyla en iyi immobilizasyon koşullarının belirlenmesi için yüzey yanıt yöntemini kullanmışlardır. Sodyum aljinat derişimi, kalsiyum aljinat klorür derişimi ve enzim yükleme gibi en etkili bileşenler arasındaki etkileşimi yüzey yanıt yöntemi ile incelemişler ve kullanılan herhangi bir kalsiyum klorür derişiminde, sodyum aljinat derişimi arttığında yüzde asparajinaz aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Optimum immobilizasyon koşullarının % 1.98 sodyum aljinat, % 3.70 kalsiyum klorür ve % 46.91 enzim yüklemesi olduğunu ifade etmişler ve en yüksek asparajinaz aktivitesini % 34.49 olarak bulmuşlardır.

Uygun vd. (2017), Au/Ni/Au/PEDOT-PPy-COOH segmentlerini içeren ultrasound sürücülü nanoteller sentezleyerek asparajinaz enziminin immobilizasyonunda kullanmışlardır. Araştırmacılar nanotel motorlarının yüzeyine asparajinaz enziminin immobilizasyonu ile enzimin sıcaklık ve pH stabilitesinin, proteazlara karşı direncinin, substratına olan afinitesinin arttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca asparajinaz taşıyan nanotellerin EL4 lenfoma kanser hücrelerini öldürme etkinliğinin % 92 olduğunu belirtmişlerdir.





### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kimyasal ve Cihazlar

Deneylerde Vestel (White FR 540) buzdolabı, Radwag (AS220 C/2) analitik terazi, Beko (7216DF) dondurucu, Clifton çalkalamalı su banyosu, Memmert (Beschicung-Loading Modell 100-800) etüv, Sigma (3-30 KS) santrifüj cihazı, Hanna (pH 211) pH metre, Wisd (WB-22) soğutmalı su banyosu, Shimadzu (UV-1601) UV-Vis spektrometre, Daihan (MSH-20D) sıcaklık ayarlı karıştırıcı, Velp (Multistirrer 15) çoklu manyetik karıştırıcı, Heidolph (Promax 202) çalkalayıcı, Ultrasonic (LC30) ultrasonik banyo, GFL (2001/4) saf su cihazı, Isolab (CAPP) otomatik pipetler, ultra saf su cihazı (Millipore Simplicity UV) kullanıldı.

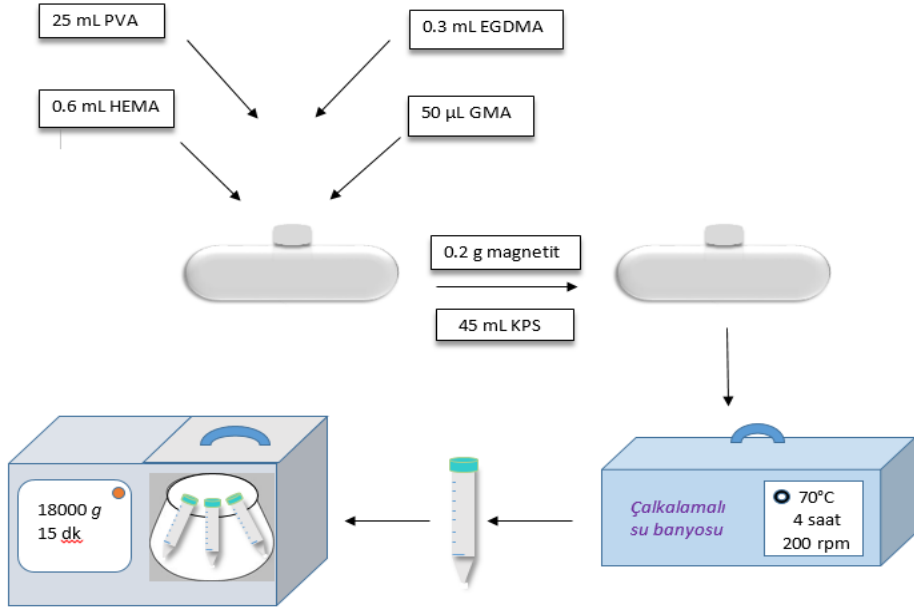
*Escherichia coli*'den saflaştırılmış L-Asparajinaz, L-asparajin, yapay insan serumu ve glisidil metakrilat Sigma-Aldrich (Steinheim, Almanya)'dan temin edildi. Poli(vinil alkol) [PVA], etil alkol, metil alkol, magnetit ( $Fe_3O_4$ ), Nessler reaktifi, etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) Aldrich (Steinheim, Almanya)'dan temin edildi; 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) Merck-Schuchardt'dan temin edildi.

Sentezlenen mag-nano-poli(HEMA-GMA) polimerinin karakterizasyonu için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde bulunan FTIR spektrofotometresi (BX Perkin Elmer); İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Araştırma Merkezi'nde bulunan Taramalı Elektron Mikroskobu (Philips XL-30S FEG), Atomik Kuvvet Mikroskobu (Digital Instruments-MMSPM Nanoscape IV) ve Enerji Dağılımlı X-ışını analiz cihazı (LEO, EVO 40 Carl Zeiss NTS, Peabody, Massachusetts) ve Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma-Uygulama Merkezi'nde bulunan Elektron Spin Rezonans Spektrometresi (JEOL JES-FA300) kullanıldı.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Manyetik nanopartiküllerin [poli(HEMA-GMA)] sentezi için yüzey aktif madde içermeyen emülsiyon polimerizasyonu tekniği kullanıldı. Bu amaçla stabilizatör olarak kullanılan PVA'dan 0.5 g tartılıp 45 mL saf suda çözüldü. Hazırlanan PVA çözeltisinin 25.0 mL'si polimerizasyonun gerçekleşeceği 100 mL hacimli cam reaktöre aktarılarak üzerine 0.6 mL HEMA monomeri, 0.3 mL EGDMA çapraz bağlayıcısı ve 50.0 µL GMA monomeri ilave edilerek 30 saniye yavaş yavaş çalkalandı. Daha sonra, sentezlenen polimere manyetik özellik kazandırmak amacıyla 0.2 g Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve reaktöre başlatıcı olarak potasyum persülfat (KPS) çözeltisi (0.0198 g/45 mL su) ilave edildi. Hazırlanan çözelti 70°C'de 4 saat boyunca 200 rpm'de su banyosunda çalkalandı. Polimerleşmenin gerçekleşip gerçekleşmediği şeffaftan kıvılcımsı beyaza dönen renk takibi ile gözlemlendi. Polimerizasyon işleminin sonunda reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutuldu ve reaksiyona katılmayan monomerler ve magnetitin uzaklaştırılması için 10 dk 5000 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant alınıp 18000 g'de 15 dk santrifüjlenerek manyetik nanopartiküller çöktürüldü ve daha sonra sırasıyla 15'er mL etanol, etanol/su (1:1) ve su ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından çöken poli(HEMA-GMA) manyetik nanopartiküllere polimerizasyon hacmi (yaklaşık 71 mL) kadar saf su ilave edildi ve emülsiyon oluşturmaları sağlandı. Sentezlenen polimerler kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında ve mikrobiyal üremenin engellenmesi için % 0.02'lik NaN<sub>3</sub> çözeltisi içerisinde saklandı. İşlemler Şekil 3.1'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.1. Manyetik nanopartiküllerin [poli(HEMA-GMA)] sentezlenmesi

### 3.2.2. Manyetik Nanopartiküllere L-Asparajinaz İmmobilizasyonu

Manyetik nanopartiküllere L-asparajinazın immobilizasyonu için nanopartiküller önce 100 mM pH 8.0 fosfat tamponu ile dengelendi. Daha sonra 0.003 mg/mL derişimindeki asparajinaz çözeltisi (pH 8 potasyum fosfat tamponunda) mag-nano-poli(HEMA-GMA) polimerinin bulunduğu ortama ilave edildi. Nanopartikül ve enzim karışımı 24 saat boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılarak L-asparajinaz enziminin manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu gerçekleştirildi.

### 3.3. Manyetik Nanopartiküllerin [poli(HEMA-GMA)] Karakterizasyonu

Mag-nano-poli(HEMA-GMA) ve asparajinaz bağlı mag-nano-poli(HEMA-GMA)'nın FTIR spektrumlarının alınması amacıyla toz haline getirilen örnekler uygun miktarda (1:1) KBr ile karıştırıldıktan sonra pelet haline getirildi. FTIR spektrumları, BX Perkin Elmer FTIR cihazı kullanılarak elde edildi.

Sentezlenen polimerin manyetik özellik kazandığını belirlemek amacıyla uygun miktarda örnekler kurutulup oda sıcaklığında Elektron Spin Rezonans Spektrometre (SEOL JES-FA 300) cihazı kullanılarak ESR spektrumları alındı.

Sentezlenen polimerin yüzey ve boyut özellikleri SEM (Philips XL-30S FEG) ve AFM (Digital Instruments-MMSPM Nanoscope IV) cihazları kullanılarak incelendi. Manyetik nanopartiküllere L-asparajinaz enziminin bağlandığı ise SEM-EDX analizi ile belirlendi.

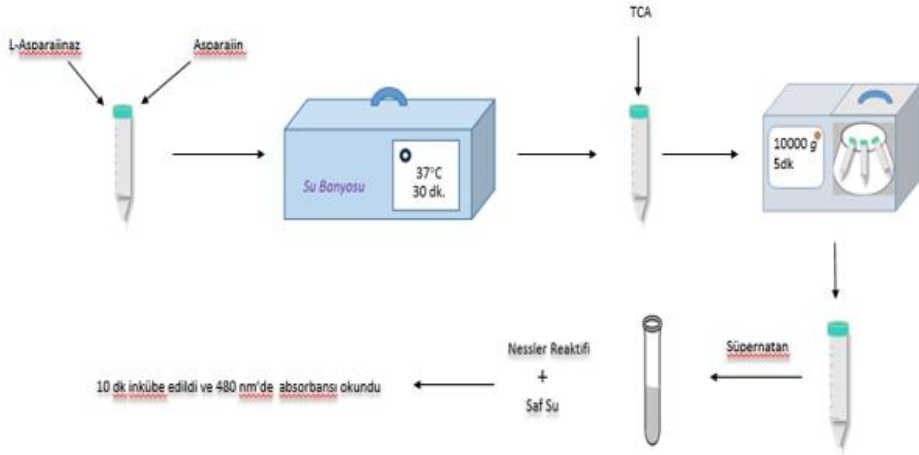
### 3.4. Asparajinaz Aktivite Tayini

Serbest ve immobilize asparajinazın aktivitesi Mashburn ve Wriston (1963) tarafından önerilen metoda göre yapıldı. Bu metodun temeli substrat olarak kullanılan asparajin hidrolizine bağlı olarak ortaya çıkan amonyak miktarının ölçülmesine dayanmaktadır.

Bu amaçla 1.0 mL 10 mM L-asparajin (0.05 M Tris-HCl pH 8.6 tamponunda) hazırlanmış ve belli miktarda enzim içeren reaksiyon karışımı 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için 0.1 mL 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) ortama ilave edildi. Reaksiyona katılmayan proteinleri ayırmak için karışım 10000 g'de 5 dk santrifüjlendi. Daha sonra süpernatandan 500 µL alındı ve üzerine 1.75 mL saf su 0.25 mL Nessler reaktifi eklenerek 10 dk inkübe edildi. Bu çözeltilerden 1 mL alınarak 480 nm'de absorbansı okundu. Bir ünite L-asparajinaz (U) 37°C'de, dakikada 1 µmol amonyak üretebilen enzim miktarı olarak tanımlandı ve ünite hesabı Eşitlik 3.1 kullanılarak yapıldı. (Ulu vd., 2016b)

$$U = \frac{\text{Serbestlenen Amonyak } (\mu\text{mol})}{\text{Zaman(dak)} \times \text{Reaksiyonkarışımındaki enzim miktarı (mg)}} \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

İzlenen yol Şekil 3.2'de şematize edilmiştir.



Şekil 3.2. Asparajinaz aktivite tayini

### 3.4.1. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize asparajinaz aktivitesine pH etkisinin incelenmesi için enzim ve substrat çözeltileri pH 4.5-5.5 asetat tamponu; pH 6.5 potasyum fosfat tamponu; pH 7.5-8.5 Tris-HCl tamponu ve pH 9.5 karbonat tamponunda hazırlandı. Aktivite ölçümleri Bölüm 3.4 anlatılan yöntemle yapıldı. Serbest ve immobilize enzimin aktivite değerleri ise Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplandı. En yüksek aktivite değeri % 100 kabul edilerek % aktivite değerleri hesaplandı ve pH değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirildi. Böylece serbest ve immobilize asparajinazın optimum pH değeri belirlendi.

### 3.4.2. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize asparajinaz aktivitesine sıcaklığın etkisinin incelenmesi için farklı sıcaklıklarda (15; 25; 35; 45; 55; 65°C) serbest ve immobilize asparajinaz çözeltileri hazırlandı. Aktivite ölçümleri Bölüm 3.4'de anlatılan yöntemle yapıldı. Serbest ve immobilize enzimin aktivite değerleri ise Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplandı. Hesaplanan aktivite değerlerinden en yüksek aktivite değeri %100 kabul edilerek % aktivite değerleri belirlendi. Sıcaklık değerlerine karşılık % aktivite değerleri grafiğe geçirildi. Böylece serbest ve immobilize asparajinazın optimum sıcaklık değerleri belirlendi.

### **3.4.3. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine Substrat Derişiminin Etkisinin İncelenmesi**

Serbest ve immobilize asparajinazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini incelemek üzere serbest enzim için pH 6.5 potasyum fosfat tamponunda immobilize enzim için pH 7.5 Tris-HCl tamponunda farklı derişimlerde (1.0; 1.2; 1.4; 1.6; 3.2; 6.4; 12.8; 25.6 mM) substrat (L-asparajin) çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilerle Bölüm 3.4'de anlatılan yöntemle göre aktivite ölçümleri yapıldı. Serbest ve immobilize asparajinaz için başlangıç hız değerleri hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Çizilen grafiklerden elde edilen verilerle  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri hesaplandı.

### **3.4.4. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Enziminin Isıl Kararlılığının İncelenmesi**

Serbest ve immobilize asparajinazın ısıl kararlılığının belirlenmesinde serbest ve immobilize enzim için 55°C'de aktivite ölçümleri yapıldı. Serbest ve immobilize enzim 55°C'ye ayarlanan ısıtıcı blokta 600 dk inkübe edilerek belli aralıklarla aktivite ölçümleri yapıldı. Aktivite ölçümleri Bölüm 3.4'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Aktivite değerleri serbest ve immobilize asparajinaz için belirtilen sıcaklıklarda zamana karşı % aktivite değeri olarak grafiğe geçirildi.

### **3.4.5. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Enziminin Depo Kararlılığının İncelenmesi**

Serbest ve immobilize asparajinazın depo kararlılığının belirlenmesi için serbest ve immobilize enzim +4°C'de 40 gün boyunca inkübe edildi. Bu süre içinde belirli aralıklarla aktivite ölçümleri yapıldı. Zamana bağlı olarak aktivitedeki değişiklikler Bölüm 3.4'de anlatıldığı gibi ölçüldü. Aktivite değerleri % aktivite olarak zamana karşı grafiğe geçirildi.

### **3.4.6. İmmobilize Asparajinaz Enziminin İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi**

İmmobilize enzimin işlemsel kararlılığının belirlenmesi için immobilize enzim ile art arda aktivite ölçümleri yapıldı ve bu ölçümler 8 kez tekrar edildi. Yapılan her ölçümün ardından immobilize asparajinaz pH 6.5 potasyum fosfat tamponu ile yıkandı. Aktivite ölçümleri döngü sayısına karşı % aktivite değeri olarak grafiğe geçirildi.

### **3.4.7. İmmobilize Asparajinazın İnsan Serumunda L-Asparajin Hidrolizinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması**

Manyetik nanopartiküllere immobilize edilen asparajinazın bir uygulaması olarak ticari olarak satın alınan insan serum örneğine belli bir miktarda asparajin ilave edilerek immobilize asparajinaz ile hidrolizi gerçekleştirildi. Serbest ve immobilize enzimin etkinlikleri kıyaslandı.



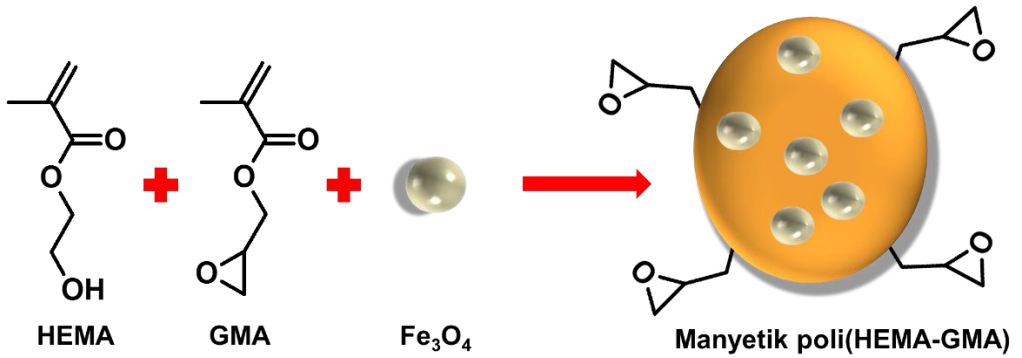


## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

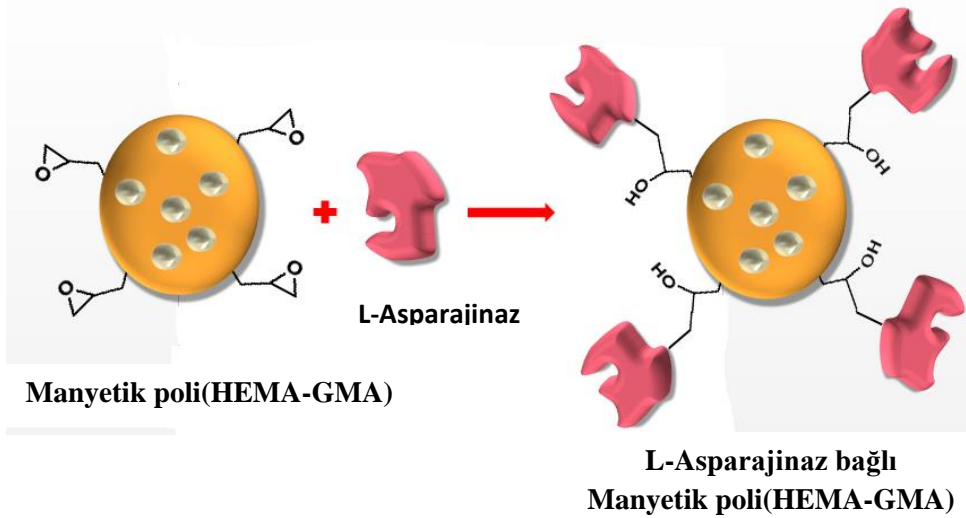
### 4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Bu tezde manyetik nanopartiküller [poli(HEMA-GMA)] sürfaktansız emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopolimerik yapının kimyasal yapısı ve şematik görüntüsü ve bu yapıya asparajinaz enziminin kovalent olarak bağlanmasına ilişkin önerilen mekanizma Şekil 4.1.a ve b'de gösterilmiştir.

a)

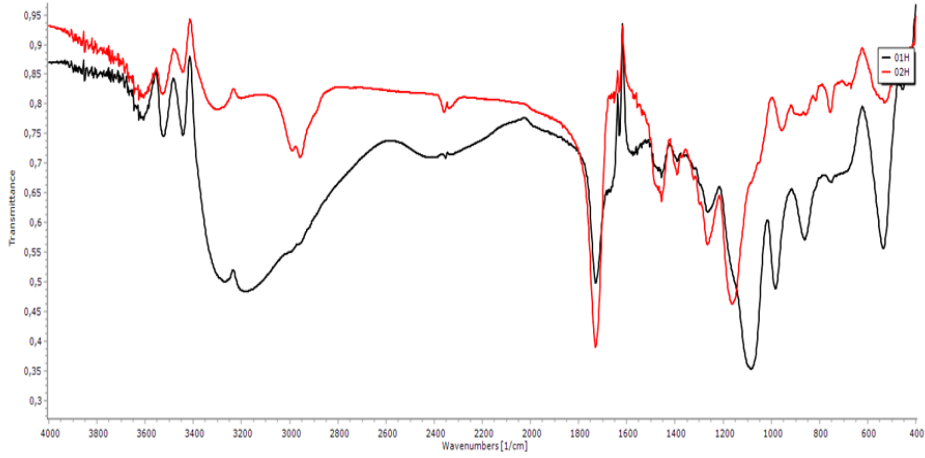


b)



Şekil 4.1. Manyetik nanopartikül [poli(HEMA-GMA)] (a) ve L-asparajinaz bağlı manyetik nanopartikülün [poli(HEMA-GMA)]'nın kimyasal yapıları (b)

Nanopolimerik yapıya asparajinaz enziminin kovalent olarak bağlandığı FTIR ve SEM-EDX ölçümleri ile gösterilmiştir. Şekil 4.2’de enzim taşımayan ve enzim taşıyan nanopolimerlerin FTIR spektrumları ve Çizelge 4.1’de protein ve peptitlerin karakteristik IR bantlarının bir listesi görülmektedir (Kong ve Yu, 2007).



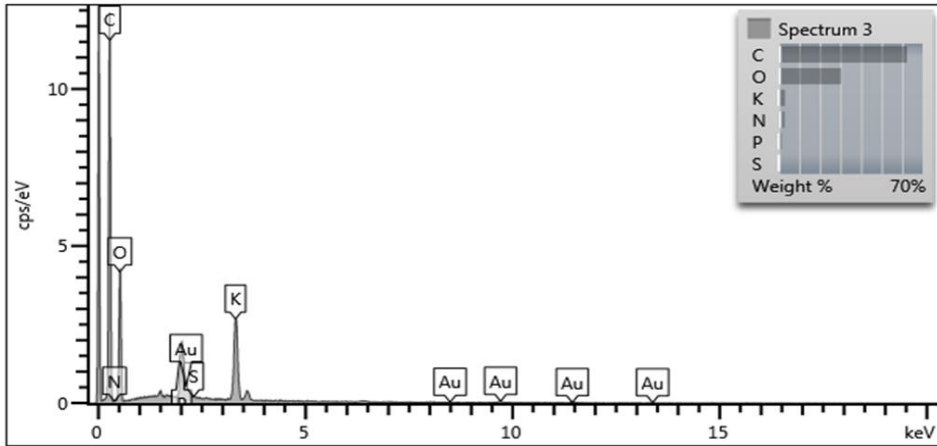
Şekil 4.2. Enzim taşıyan ve enzim taşımayan nanopolimerlerin FTIR spektrumları

Şekilde görüldüğü üzere  $3500\text{ cm}^{-1}$  civarında  $-\text{OH}$  gerilme titreşimleri bulunmaktadır.  $3300\text{ cm}^{-1}$  civarında C-H gerilmeleri,  $1750\text{ cm}^{-1}$  civarında C=O gerilmeleri,  $1260\text{ cm}^{-1}$  civarında C-O bantları görülmektedir. Özellikle  $1570\text{ cm}^{-1}$  civarında gözlenen Amid II bandı protein yapısındaki asparajinaz enziminin içeriğinden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.1. Proteinlerin ve peptitlerin karakteristik IR bantlarının değerleri (Kong ve Yu, 2007)

| Adlandırma | Yaklaşık frekans (cm <sup>-1</sup> ) | Açıklama                |
|------------|--------------------------------------|-------------------------|
| Amid A     | 3300                                 | NH gerilme              |
| Amid B     | 3100                                 | NH gerilme              |
| Amid I     | 1600-1690                            | C=O gerilme             |
| Amid II    | 1480-1575                            | CN gerilme, NH bükülme  |
| Amid III   | 1229-1301                            | CN gerilme, NH bükülme  |
| Amid IV    | 625-767                              | OCN bükülme             |
| Amid V     | 640-800                              | Düzlem dışı NH bükülme  |
| Amid VI    | 537-606                              | Düzlem dışı C=O bükülme |
| Amid VII   | 200                                  | İskelet bükülmesi       |

Şekil 4.3'de manyetik nanopartiküllere ilişkin EDX analizi grafiği ve Çizelge 4.2'de ise bu analizden elde edilen veriler görülmektedir. Nanopolimerik yapıya asparajinaz enziminin katıldığı N ve S varlığı ile gösterilmiştir. Bu asparajinaz enziminin içerdiği sistein ve methionin amino asitlerin miktarından nanopolimerlere bağlanan enzim miktarı 66.43 mg asparajinaz/g nanopartikül olarak hesaplandı.

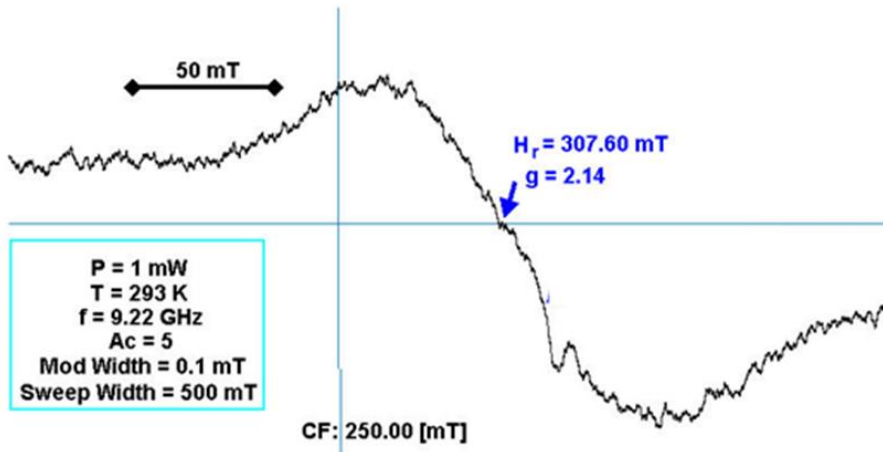


Şekil 4.3. Asparajinaz bağlı manyetik nanopartiküllerin EDX spektrumu

Çizelge 4.2. Asparajnaz bağlı manyetik nanopartiküllerin EDX analizine ilişkin veriler

| Element | Wt%    | Atomic % |
|---------|--------|----------|
| C       | 62.39  | 70.04    |
| N       | 2.86   | 2.76     |
| O       | 30.32  | 25.55    |
| P       | 1.35   | 0.59     |
| S       | 0.05   | 0.02     |
| K       | 3.03   | 1.04     |
| Total:  | 100.00 | 100.00   |

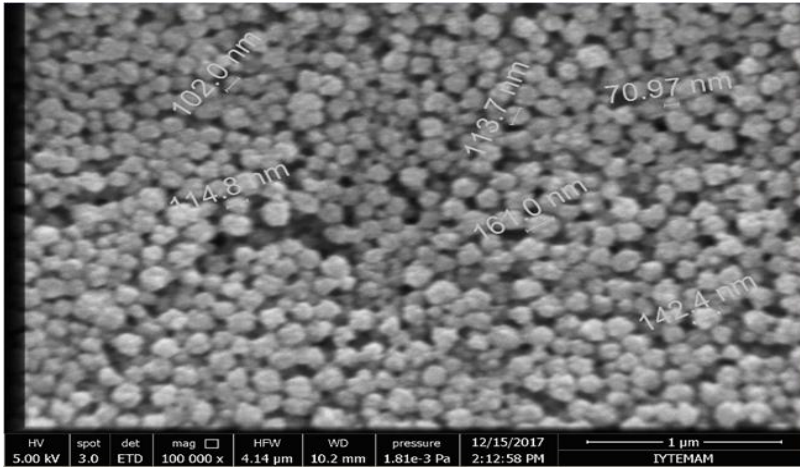
Nanopolimerlerin yapısına magnetit bileşiğinin katıldığının bir kanıtı olarak alınan ESR spektrumları Şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu grafikten elde edilen veriler ve  $g = (h \cdot \nu) / (\beta \cdot H_r)$  eşitliği kullanılarak g faktörü 2.14 olarak hesaplandı. Burada h, Plank sabiti ( $6,626 \cdot 10^{-27}$  erg/s);  $\beta$  evrensel sabiti ( $9,274 \cdot 10^{-21}$  erg/G) ;  $\nu$ , frekans (Hz) ve  $H_r$ , manyetik alanın rezonansını (G) ifade etmektedir.  $Fe^{3+}$  için rapor edilen g faktörü değerleri 1.4-3.1 (düşük spin kompleksleri) ve 2.0-9.7 (yüksek spin kompleksleri) şeklindedir. Bu tezde sentezlenen nanopolimerik materyalin g değeri 2.14 olarak hesaplanmıştır ve bu da nanopolimerin manyetik özellik kazandığını göstermektedir.



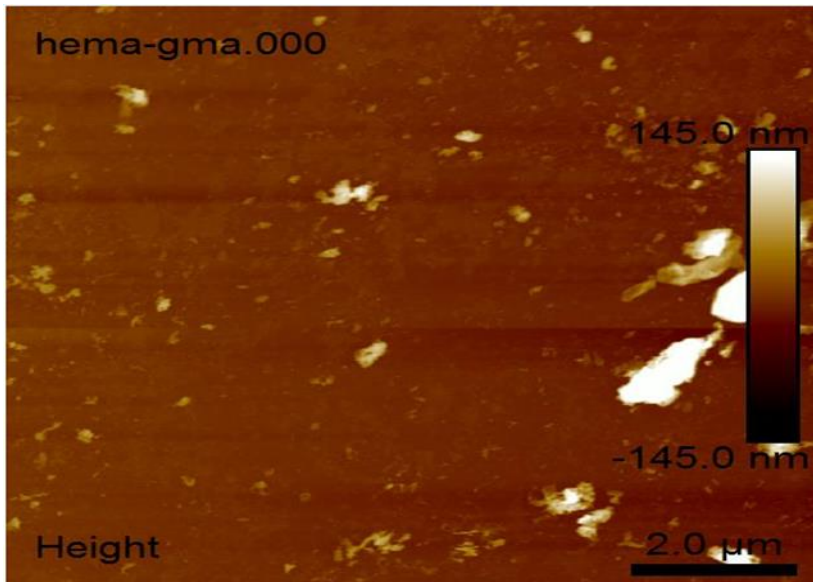
Şekil 4.4. Manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu

Sentezlenen polimerin yapısının yüzey morfolojisi ve boyutu SEM ve AFM analizleri ile belirlenmiş ve Şekil 4.5 a ve b'de gösterilmiştir. Elde edilen fotoğraflardan sentezlenen polimerlerin küresel, benzer boyutlu ve ortalama 117.5 nm boyutunda olduğu görülmektedir.

a)



b)



Şekil 4.5. Manyetik nanopartiküllerin SEM ve AFM fotoğrafı ( a ve b )

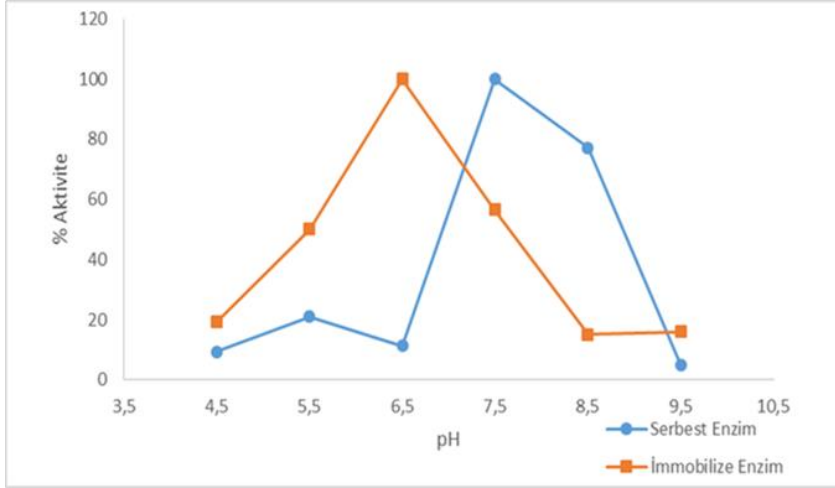
## 4.2. Manyetik Nanopartiküllere L-Asparajinaz İmmobilizasyonu

Bu tezde L-asparajinaz enzimi manyetik poli(HEMA-GMA) nanopartiküllere polimerik yapıdaki GMA monomerinin epoksi grubu vasıtasıyla kovalent olarak immobilize edilmiştir. İmmobilize edilen L-asparajinaz miktarı enzim bağlı nanopartiküllerin SEM-EDX analizi ile yapıdaki S atomu dikkate alınarak hesaplanmış ve 66.43 mg asparajinaz/g nanopartikül olarak bulunmuştur.

Mu vd. (2014) yaptıkları bir çalışmada manyetik nanopartikülleri poli(2-vinil-4,4-dimetilazlaktan) ile fonksiyonelleştirmişler ve bu manyetik nanopartiküllere kovalent olarak bağladıkları asparajinaz miktarını 38.0 mg/mg nanopartikül olarak bulmuşlardır. Bu çalışma ile karşılaştırıldığında sentezlediğimiz poli(HEMA-GMA) nanopartiküllerinin kovalent olarak asparajinaz bağlama kapasitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

### 4.2.1. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine pH'ın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize asparajinaz aktivitesine pH'ın etkisi pH 4.5 ve pH 9.5 arasında farklı tampon çözeltiler kullanılarak incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Buradan serbest enzimin optimum pH'ının pH 7.5 ve immobilize enzimin optimum pH'ının 6.5 olduğu görülmektedir. Literatürde *E. coli* L-asparajinaz enziminin optimum pH'ı 7.0; 8.0 ve 8.5 olarak rapor edilmiştir (Zhang vd. 2004; Zhang vd. 2005 ve Ulu vd. 2016b). Bu tezde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde serbest enzimin optimum pH'ı literatürde rapor edilen değerlere yakın olduğu, immobilize enzimin optimum pH'ının asidik bölgeye kaydığı görülmektedir.

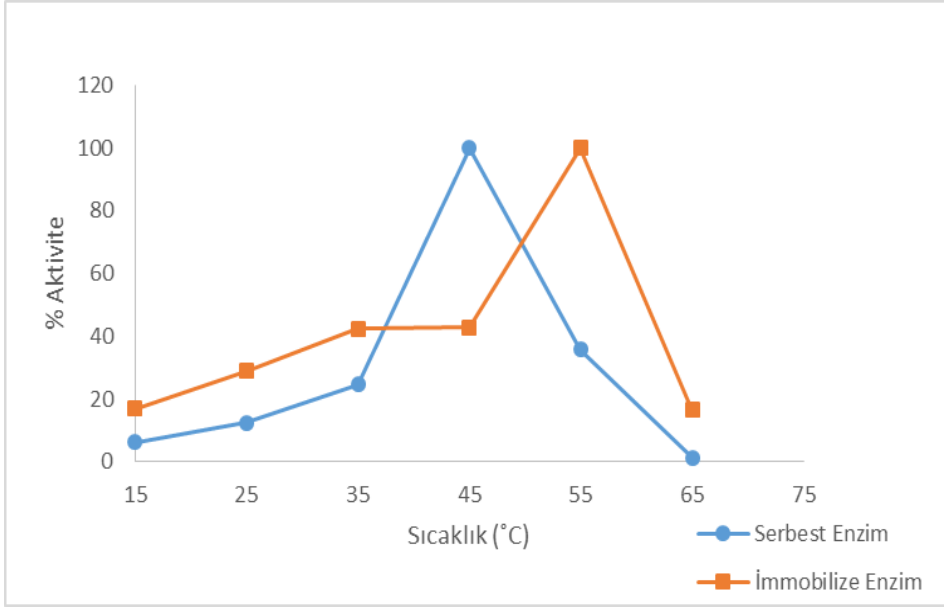


Şekil 4.6. Serbest ve İmmobilize asparajinaz aktivitesine pH'ın etkisi

#### 4.2.2. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine Sıcaklığın Etkisinin İncelenmesi

Serbest ve immobilize asparajinaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 15-65°C arasındaki sıcaklıklarda incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Elde edilen grafikten serbest asparajinazın optimum sıcaklığı 45°C ve immobilize asparajinazın optimum sıcaklığı 55°C olarak bulunmuştur. Zhang vd. (2004) yaptıkları bir çalışmada serbest asparajinaz için optimum sıcaklığı 50°C ve immobilize asparajinaz için optimum sıcaklığı 60°C olarak bulmuşlardır. İmmobilizasyon ile enzimin sıcaklık stabilitesinin artması genellikle gözlenen bir durumdur.





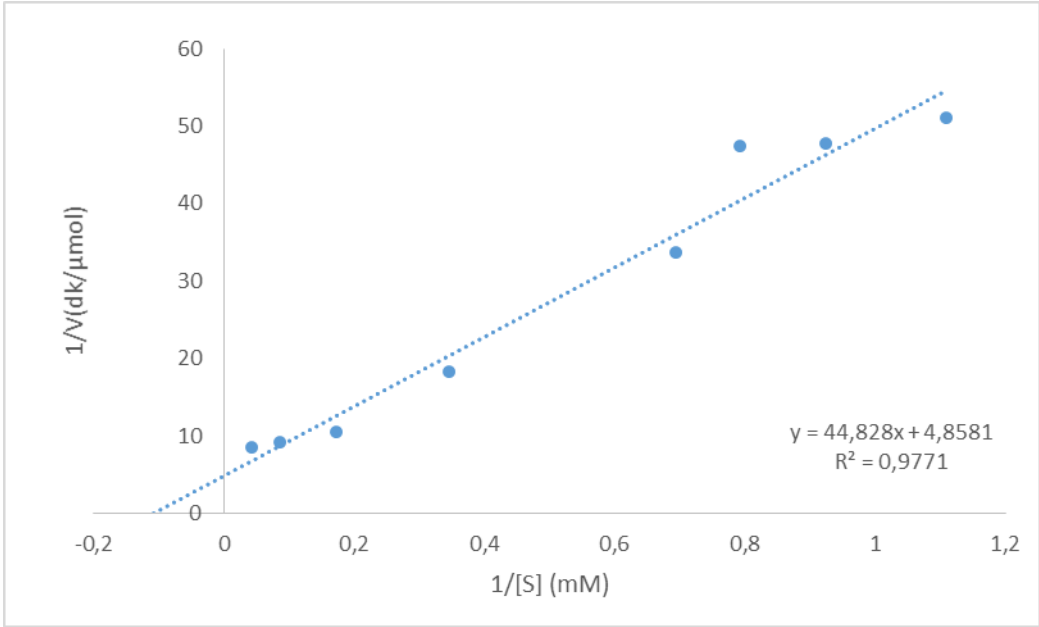
Şekil 4.7. Serbest ve immobilize asparajinaz aktivitesine sıcaklığın etkisi

#### 4.2.3. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Aktivitesine Substrat Değişiminin Etkisinin İncelenmesi

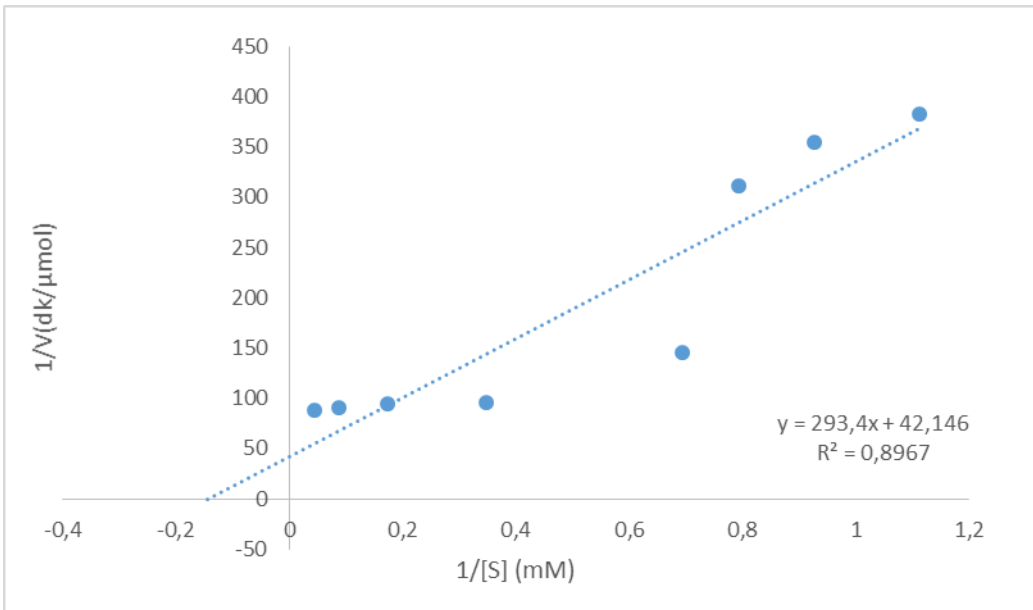
Bu çalışmada serbest ve immobilize asparajinazın kinetik sabitleri L-asparajin substratı kullanılarak belirlenmiştir. Serbest ve immobilize asparajinaz için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 ve bu grafiklerden elde edilen kinetik değerler ise Çizelge 4.3’de verilmiştir.  $V_{max}$ , substratına doymun olduğu koşullarda enzimin sergilediği en yüksek hızdır ve difüzyonel sınırlamalardan etkilenmektedir. Bu çalışmada immobilize asparajinazın maksimum hızı, serbest asparajinazdan yaklaşık 10 kat daha küçük bulunmuştur.

$K_m$  enzimin substratına olan ilgisini gösterir ve genellikle immobilizasyonla oluşan difüzyonel engeller ve sterik etkiler nedeniyle  $K_m$ ’de bir artış gözlenir. Ancak bu çalışmada  $K_m$  immobilizasyonla azalmış yani enzimin substratına olan ilgisi artmıştır. Bu durum, enzimin bir desteğe immobilizasyonu ile üç boyutlu yapısında gerçekleşen değişiklikler sonucu substratına artan ilgisinden kaynaklanabilir. Asparajinazın immobilizasyonu sonucu  $K_m$ ’in azalması Ulu vd. (2016) tarafından yapılan çalışmada da görülmüştür.  $k_{cat}$ , turnover sayısı olarak bilinir ve bu enzimin immobilizasyon sonucu gösterdiği davranışı yorumlamada önemlidir. Bu tezde

immobilize asparajınazın  $k_{cat}$  değeri  $497 \text{ dk}^{-1}$  bulunurken, serbest asparajınaz  $k_{cat}$  değeri  $47356 \text{ dk}^{-1}$  bulunmuştur.



Şekil 4.8. Serbest asparajınaz için Lineweaver-Burk grafiği



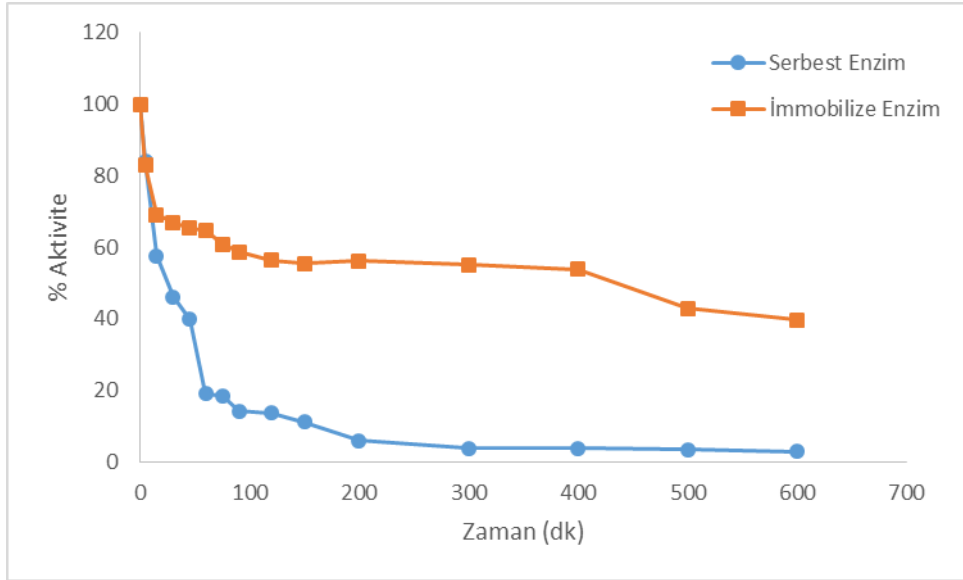
Şekil 4.9. İmmobilize asparajınaz için Lineweaver-Burk grafiği

Çizelge 4.3. Serbest ve İmmobilize asparajınazın kinetik parametreleri

|                  | $K_m$ (mM) | $V_{max}$ ( $\mu$ mol/dk) | $k_{cat}$ ( $dk^{-1}$ ) |
|------------------|------------|---------------------------|-------------------------|
| Serbest Enzim    | 9.23       | 0.206                     | 47356                   |
| İmmobilize Enzim | 6.94       | 0.0237                    | 497                     |

#### 4.2.4. Serbest ve İmmobilize Asparajınazın Isıl Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilizasyonla genellikle yüksek sıcaklıklarda enzimin kararlılığı artar ve bu immobilize enzime endüstriyel uygulamalarda bir takım avantajlar ve ekonomi sağlar. Bu tezde immobilize asparajınazın aktivitesi 55°C’de 600 dk boyunca incelenmiş ve serbest asparajınazın aktivitesi neredeyse tamamen kaybolurken immobilize asparajınazın %50 civarında aktivitesini koruduğu görülmüştür (Şekil 4.10).

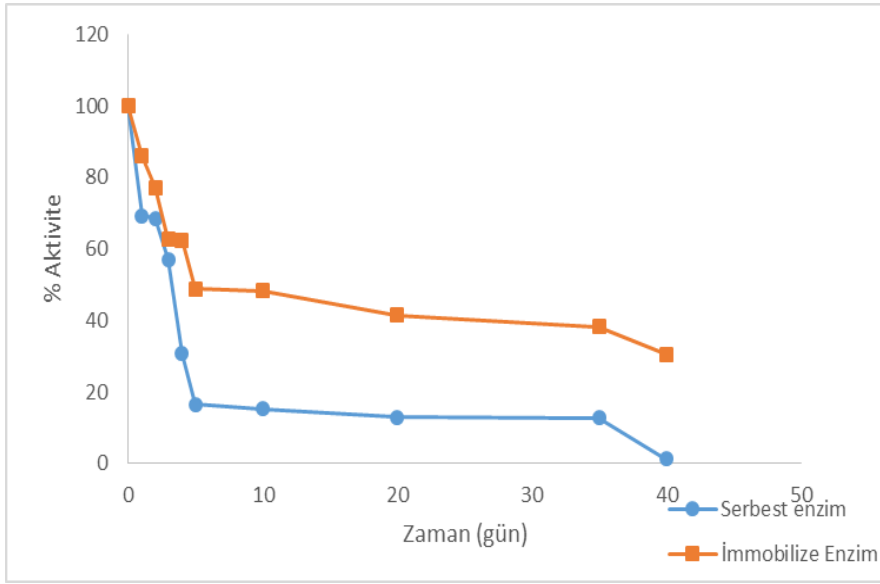


Şekil 4.10. Serbest ve immobilize asparajınaz aktivitesinin 55°C’de zamana bağlı değişimi

Youssef vd. (2008), kalsiyum aljinat-jelatin kompozitlere immobilize ettikleri L-asparajınaz enziminin 60°C’de 30 dk boyunca termal stabilitesini incelemişler ve immobilize asparajınazın başlangıç aktivitesinin %66’sını koruduğunu bulmuşlardır. Bu tezdeki immobilize asparajınaz 55°C’de 30. dakikada başlangıç aktivitesinin %66.9’unu göstermiştir.

#### 4.2.5. Serbest ve İmmobilize Asparajinaz Enziminin Depo Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilizasyon işlemlerindeki bir diğer önemli faktör immobilize enzimin depo kararlılığıdır. Bu çalışmada serbest ve immobilize asparajinazın depo kararlılığı 40 gün boyunca izlenmiş ve bu süre sonunda serbest enzim yaklaşık %1 aktivite gösterirken, immobilize enzimin %30 aktivite gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.11).



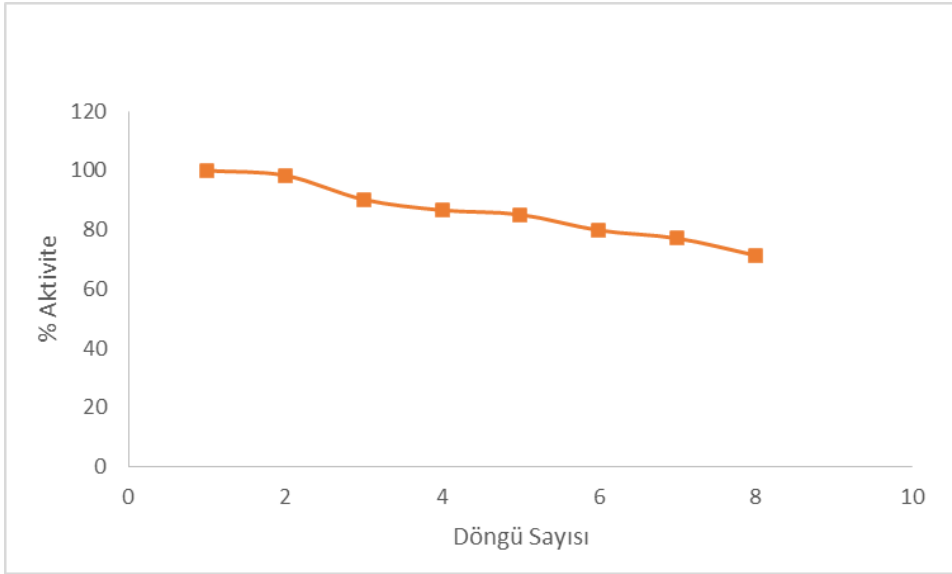
Şekil 4.11. Serbest ve immobilize asparajinazın depo kararlılığının incelenmesi

Ulu vd. (2016) yaptıkları bir çalışmada asparajinaz enzimini pHEMA-nişasta kompozitlerine immobilize etmişler ve immobilize asparajinazın depo kararlılığını 4°C'de 15 gün boyunca izlemişlerdir. Onbeşinci gün sonunda immobilize asparajinazın başlangıç aktivitesinin %60'ını koruduğunu rapor etmişlerdir. Bu tezde yapılan immobilizasyon işlemi immobilize asparajinaz 10 gün sonunda başlangıç aktivitesinin %48.28'ini göstermiştir.

#### 4.2.6. İmmobilize Asparajinazın İşlemsel Kararlılığının İncelenmesi

İmmobilize enzimlerin önemli bir avantajı defalarca kullanılabilmeleridir ve kullanımları sırasında aktivitenin korunması da şarttır. Bu çalışmada immobilize

asparajinaz sekiz kez ard arda kullanılmış ve bu kullanımlar sonunda aktivitenin %60'ından fazlası korunmuştur. Bu endüstriyel açıdan oldukça önemlidir.



Şekil 4.12. İmmobilize asparajinazın işlemsel kararlılığının incelenmesi

Zhang vd. (2004) ipek özü proteini olan serisin mikropartiküllerine asparajinaz enzimini immobilize etmişler ve immobilize enzimi beş kez ard arda kullanarak işlemsel kararlılığını incelemişlerdir. Beş kullanımdan sonra immobilize enzimin yaklaşık %80 aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yapılan bu tezde immobilize asparajinaz beş kullanımdan sonra başlangıç aktivitesinin %85.14'ünü göstermiştir.

#### 4.2.7. İmmobilize Asparajinazın Yapay İnsan Serumunda L-Asparajin Hidrolizinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması

Bu tezde hazırlanan immobilize asparajinazın biyolojik ortamlarda özellikle serum gibi bir ortamda kullanılabilirliğini göstermek için 25 mM asparajin eklenmiş yapay insan serum örneğinde aktivite ölçülmüş ve serbest enzimin bu ortamda gösterdiği aktivite ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre immobilize asparajinazın serbest asparajinaza göre %74.74 aktivite gösterdiği görülmüştür ve bu değer oldukça iyi bir değerdir.



## 5. SONUÇ

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

Nanopolimerik yapıya asparajinaz enziminin kovalent olarak bağlandığı FTIR ve SEM-EDX ölçümleri ile görülmüştür.

Nanopolimerlerin yapısına magnetit bileşiğinin katıldığı ESR spektrumları ile gösterilmiştir.

Sentezlenen polimerin yüzey morfolojisi ve boyutu SEM ve AFM fotoğrafları ile görülmüştür. Elde edilen fotoğraflarda polimerlerin küresel, benzer boyutlu ve ortalama 117.5 nm boyutunda olduğu görülmüştür.

Manyetik nanopartiküllere kovalent olarak bağlanan L-asparajinaz enziminin miktarı SEM-EDX analizi ile yapıdaki S atomu dikkate alınarak hesaplanmış ve 66.43 mg asparajinaz/g nanopartikül olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize asparajinaz aktivitesine pH'ın etkisi pH 4.5 ve pH 9.5 arasında farklı tampon çözeltiler kullanılarak incelenmiş ve serbest enzimin optimum pH'ı pH 7.5; immobilize enzimin optimum pH'ı pH 6.5 olarak gözlenmiştir.

Serbest ve immobilize asparajinaz aktivitesine sıcaklığın etkisi 15-65°C arasındaki sıcaklıklarda incelenmiş ve serbest asparajinazın optimum sıcaklığı 45°C iken immobilize asparajinazın 55°C olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize asparajinaz için  $k_{cat}$  değerleri sırasıyla 47356 dk<sup>-1</sup> ve 497 dk<sup>-1</sup> olarak bulunmuştur.

Serbest ve immobilize asparajinaz aktivitesi 55°C'de 600 dk boyunca incelenmiş ve serbest asparajinazın aktivitesi neredeyse tamamen kaybolurken immobilize asparajinazın %50 civarında aktivitesini koruduğu görülmüştür.

Serbest ve immobilize asparajinazın depo kararlılığı 40 gün boyunca izlenmiş ve serbest enzim yaklaşık %1 aktivite gösterirken immobilize enzimin %30 aktivite gösterdiği bulunmuştur.

İmmobilize asparajinaz sekiz kez ard arda kullanılmış ve bu kullanımlar sonunda aktivitesinin %60'ından fazlasını koruduğu görülmüştür.

İmmobilize asparajinazın serum ortamında kullanılabilirliğini göstermek için 25 mM asparajin eklenmiş yapay insan serum örneğinde aktivite ölçülmüştür. Serbest

ve immobilize asparajınazın etkinlikleri kıyaslandığında immobilize asparajınazın serbest asparajınaza göre % 74.74 aktivite gösterdiği görülmüştür.

Bu tezde manyetik nanopartiküller sentezlenmiş ve bu manyetik nanopartiküllere L-asparajınaz enzimi kovalent olarak immobilize edilmiştir. Immobilize enzimin optimum pH, optimum sıcaklık değerleri ve kinetik sabitleri belirlenerek, serbest enzim ile karşılaştırılmıştır. Immobilize enzimin ısıl ve depo kararlılığının serbest enzimden daha yüksek olduğu görülmüş ve immobilize enzim defalarca kullanılabilmiştir. Ayrıca immobilize asparajınaz yapay serum ortamında %74.74 aktivite verim ile asparajini parçalayabilmiştir. Tezin giriş kısmında da bahsedildiği gibi L-asparajınazın antikanser ilacı olarak tıpta kullanımı söz konusudur. Bu tezde hazırlanan manyetik nanopartiküllere immobilize edilmiş asparajınazın özellikle lösemi kanserindeki etkinliğinin *in vitro* ve *in vivo* olarak belirlenmesi bu tezin eksik kısımlarını oluşturmaktadır ve gelecekte yapılması planlanan çalışmalar arasındadır. L-Asparajınazın bir diğer uygulama alanı biyosensörlerdir ve hazırlanan asparajınaz immobilize edilmiş manyetik nanopartiküllerin, biyosensör alanındaki etkinliği de gelecek çalışmalarda ortaya konmalıdır. İlaveten gıda katkı maddesi olarak kullanım alanı bulan L-asparajınaz enziminin yerine immobilize asparajınazın kullanılması ve aktivitesinin değerlendirilmesi de yapılabilecek diğer çalışmalardan biridir.



## KAYNAKLAR

- Aghaiypour, K., Wlodawer, A., Lubkowski, J. 2001. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, 40: 5655–5664.
- Agrawal, N.R., Bukowski, R.M., Rybicki, L.A., Kurtzberg, J., Cohen, L.J., Hussein, M.A. 2003. A Phase I-II trial of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with multiple myeloma. **Cancer**, 98: 94-99.
- Alpay, P., Uygun, D. A. 2015. Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 111: 56-63.
- Altenbern, R. A., Housewright, R. D. 1954. Stereospecific asparaginases in smooth *Brucella abortus* strain 19. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 49: 130–137.
- Asselin, B. L., Kreissman, S., Coppola, D. J., Bernal, S. D., Leavitt, P. R., Gelber, R. D., Sallan, S. E., Cohen, H. J. 1999. Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, 21: 6–12.
- Atacan, K., Çakiroğlu, B., Özacar, M. 2016. Improvement of the stability and activity of immobilized trypsin on modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for hydrolysis of bovine serum albumin and its application in the bovine milk. **Food Chemistry**, 212: 460-468.
- Bae, D. R., Han, W. S., Lim, J. M., Kang, S., Lee, J. Y., Kang, D., Jung, J. H. 2010. Lysine-functionalized silver nanoparticles for visual detection and separation of histidine and histidine-tagged proteins. **Langmuir**, 26(3): 2181-2185.
- 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), 340.
- 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.
- Bao, J., Chen, W., Liu, T., Zhu, Y., Jin, P., Wang, L., Li, Y. 2007. Bifunctional Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for protein separation. **ACS Nano**, 1(4): 293-298.
- 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(5): 900-923.
- Bayindirli, A., 1995. Immobilization of enzymes and potential applications in food industry. **GIDA J. Food** 20 (2): 113–116.
- Betancor, L., Fuentes, M., Dellamora-Ortiz, G., López-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Fernández-Lafuente, R. 2005. Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 32(3): 97-101.
- Bickerstaff, G.F., 2009. Immobilisation of enzymes and cells. In: Walker, J.M., Rapley, R. (Eds.), *Molecular Biology and Biotechnology*, fifth ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 454–491.
- Brena, B.M., Batista-Viera, F., 2006. Immobilization of enzymes: a literature review. In: Guisán, J.M. (Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press, Totowa, NJ, 420 p.
- Broome, J. D. 1961. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its anti-lymphoma effects. **Nature**, 191: 1114–1115.

- Broome, J. D. 1965. Antilymphoma activity of L-asparaginase in vivo: clearance rates of enzyme preparations from guinea pig serum and yeast in relation to their effect on tumor growth. **Journal of the National Cancer Institute**, 35: 967–974.
- Broome, J. D. 1968. Factors which may influence the effectiveness of L-asparaginases as tumor inhibitors. **British Journal of Cancer**, 22: 595–602.
- Cabral, J. M. S., Novais, J. M., Kennedy, J. F. 1986. Immobilization studies of whole microbial cells on transition metal activated inorganic supports. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 23(3-4): 157-162.
- Capizzi, R. L, Peterson, R. Cooney, D. A. Creasey, W. A. Handschu, R. E. 1969. L-asparaginase therapy of acute leukemia-biochemical and clinical observations. **Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.** 10,12.
- Chae, H. J., In, M. J., Kim, E. Y. 1998. Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutaraldehyde. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 73(2-3): 195-204.
- Chen, D. H., Liao, M. H. 2002. Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 16(5-6): 283-291.
- Clementi, A. 1922. La desamidation enzymatique de L-asparaginase chez les differentes especes animales et la signification physiologique de sa presence dans l'organiasma. **Archives Internationales de Physiologie**, 19: 369–376.
- Clubb, J. S., Neale, F. C., Posen, S. 1965. The behavior of infused human placental alkaline phosphatase in human subjects. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 66: 493–507.
- Costa, S. A., Azevedo, H. S., Reis, R. L. 2005. Enzyme immobilization in biodegradable polymers for biomedical applications. **Biodegradable Systems In Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 301-323.

- das Neves, J., Nunes, R., Machado, A., Sarmento, B. 2015. Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 92: 53-70.
- Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S. 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **Biotechnology**, 3: 1-9.
- Dhanam, J. G., Kannan, S. 2013. L-asparaginase: types perspectives and applications. **Advance Biology Technology**, 13: 1–5.
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A. J., Bohlmann, G. 2013. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, 42(15): 6437-6474.
- D'souza, S. F. 1999. Immobilized enzymes in bioprocess. **Current Science**, 69-79.
- Du, Z., Yu, Y. L., Chen, X. W., Wang, J. H. 2007. The Isolation of Basic Proteins by Solid-Phase Extraction with Multiwalled Carbon Nanotubes. **Chemistry-A European Journal**, 13(34): 9679-9685.
- Eden, O. B., Shaw, M. P., Lilleyman, J. S., Richards, S. 1990. Nonrandomized study comparing the toxicity of *Escherichia coli* and *Erwinia* asparaginase in children with leukemia. **Medical and Pediatric Oncology**, 18: 497–502.
- Fréchet, J. M. 2003. Dendrimers and other dendritic macromolecules: From building blocks to functional assemblies in nanoscience and nanotechnology. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, 41(23): 3713-3725.
- 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.
- 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.

- Harold, E. S. 1991. Immobilized enzymes: applications to bioprocessing of food enzymology. **Food Enzymology**, 322.
- Hartmeier, W., 1988. Immobilized Biocatalysts: An introduction. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, p. 212.
- Hettiarachchy, N. S., Feliz, D. J., Edwards, J. S., Horax, R. 2018. The use of immobilized enzymes to improve functionality. **In Proteins in Food Processing (Second Edition)** (pp. 569-597).
- Holmquist, N. D. 1963. Effect of normal sera of several related rodents on 6C3HED lymphoma in vivo. **Experimental Biology and Medicine**, 113: 444–445.
- <http://reader.roodo.com/miss9ch/archives/11973895.html> Erişim tarihi: 3.5.2018
- [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Comparison\\_of\\_nanomaterials\\_sizes.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Comparison_of_nanomaterials_sizes.jpg)
- <https://graphene.nus.edu.sg/what-exactly-is-graphene/> Erişim tarihi 21.05.2018
- <https://today.anl.gov/2016/01/silver-nanoparticle-synthesis/#prettyPhoto/0/> Erişim tarihi 21.05.2018
- [https://www.brendaenzymes.org/enzyme.php?ecno=3.5.1.1&Suchword=asparaginase&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=&show\\_tm=0#PDB](https://www.brendaenzymes.org/enzyme.php?ecno=3.5.1.1&Suchword=asparaginase&reference=&UniProtAcc=&organism%5B%5D=&show_tm=0#PDB)
- <https://www.nanoshel.com/magnetic-nanoparticles/> Erişim tarihi 21.05.2018
- [https://www.researchgate.net/figure/Virtual-sample-set-of-relaxed-gold-nanoparticles-of-different-sizes-and-shapes-The\\_fig6\\_230912444](https://www.researchgate.net/figure/Virtual-sample-set-of-relaxed-gold-nanoparticles-of-different-sizes-and-shapes-The_fig6_230912444) Erişim tarihi 21.05.2018
- Huang, J., Zhao, R., Wang, H., Zhao, W., Ding, L. 2010. Immobilization of glucose oxidase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> magnetic nanoparticles. **Biotechnology Letters**, 32(6): 817-821.
- Huang, S. H., Juang, R. S. 2011. Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review. **Journal of Nanoparticle Research**, 13(10): 4411.

- Izadpanah, Qeshmi, F., Javadpour, S., Malekzadeh, K., Tamadoni, Jahromi, S., Rahimzadeh, M. 2014. Persian Gulf is a bioresource of potent L-asparaginase producing bacteria: identification and molecular differentiating. **International Journal of Environmental Research**, 8: 813–818.
- Janin, J., Rodier, F., Chakrabarti, P., Bahadur, R. 2007. Macromolecular recognition in the Protein Data Bank. **Acta Crystallographica D**, 63: 1–8.
- 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 D**, 57: 369–377.
- Jean-Francois, J., Fortier, G. 1996. Immobilization of L-asparaginase into a biocompatible poly (ethylene glycol)-albumin hydrogel: I: Preparation and in vitro characterization. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 23(3): 221-226.
- 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. **Journal of Experimental Medicine**, 98: 565–582.
- Kong, J., Yu, S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 39: 549-559.
- Kotzia, G. A., Labrou, N. E. 2007. L-Asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* 3937: cloning expression and characterization. **Journal Biotechnology**, 127: 657–669.
- Kumar, K., Kataria, M., Verma, N. 2013. Plant asparaginase-based asparagine biosensor for leukemia. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, 41: 184–188.
- Lang, S., Uber. 1904. Desamidierung im Tierkorper. **Beitraege zur Chemischen Physiologie und Pathologie**, 190: 5321–345.

- Liao, M. H., Chen, D. H. 2001. Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability. **Biotechnology Letters**, 23(20): 1723-1727.
- Ljubimova, J. Y., Holler, E. 2012. Biocompatible nanopolymers: the next generation of breast cancer treatment?. **Nanomedicine**, 7(10): 1467-1470.
- Lubkowski, J., Dauter, M., Aghaiypour, K., Wlodawer, A., Dauter, Z. 2002. Atomic resolution structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Acta Crystallographica D**, 59: 84–92.
- Ma, Z., Ramakrishna, S. 2008. Electrospun regenerated cellulose nanofiber affinity membrane functionalized with protein A/G for IgG purification. **Journal of Membrane Science**, 319(1-2): 23-28.
- Mashburn, L. T., & Wriston Jr, J. C. 1963. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase. **Biochemical and biophysical research communications**, 12(1): 50-55.
- McCoy, T. A., Maxwell, M., Neuman, R. E. 1956. The amino acid requirements of the Walker carcinosarcoma 256 in vitro. **Cancer Research**, 16: 979–984.
- 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
- 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.
- 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: 208–221.

- Nisha, S., Arum, K.S., Gobi, N. 2012. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. **Chemical Science Review and Letters**. 1 (3): 148–155.
- Pan, C., Hu, B., Li, W., Sun, Y. I., Ye, H., Zeng, X. 2009. Novel and efficient method for immobilization and stabilization of  $\beta$ -d-galactosidase by covalent attachment onto magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -chitosan nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 61(3-4): 208-215.
- Park, Y. K., Abuchowski, A., Davis, S., Davis, F. 1981. Pharmacology of E. coli L-asparaginase polyethylene glycols adducts. **Anticancer Research**, 1: 373–376.
- 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.
- 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.
- Quirk, R. A., Chan, W. C., Davies, M. C., Tendler, S. J., Shakesheff, K. M. 2001. Poly (1-lysine)–GRGDS as a biomimetic surface modifier for poly (lactic acid). **Biomaterials**, 22(8): 865-872.
- Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W. E., Yong, T., Ma, Z., Ramaseshan, R. 2006. Electrospun nanofibers: solving global issues. **Materials Today**, 9(3), 40-50.
- Ramya, L. N., Doble, M., Rekha, V. P. B., Pulicherla, K. K. 2011. In silico engineering of Lasparaginase to have reduced glutaminase side activity for the effective treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, 33: 617–621.
- Rodrigues, N. F. M., Neto, S. Y., Luz, R. D. C. S., Damos, F. S., Yamanaka, H. 2018. Ultrasensitive Determination of Malathion Using



- Acetylcholinesterase Immobilized on Chitosan-Functionalized Magnetic Iron Nanoparticles. **Biosensors**, 8(1): 16.
- Romanskevic, T., Budriene, S., Pielichowski, K. and Pielichowski, J. 2006. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. **Chemija**, 17(4): 74-89.
- Rosevear, A., Kennedy, J.F., Cabral, J. 1987. Immobilized Enzymes and Cells. CRC Press/ Adam Hilger, Philadelphia, PA. p. 248.
- Saiyed, Z. M., Sharma, S., Godawat, R., Telang, S. D., Ramchand, C. N. 2007. Activity and stability of alkaline phosphatase (ALP) immobilized onto magnetic nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). **Journal of Biotechnology**, 131(3): 240-244.
- Salata, O. V. 2004. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Journal of Nanobiotechnology**, 2(1): 3.
- 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: 81–92.
- Sanches, M., Krauchenco, K., Polikarpov, I. 2001. Structure substrate complexation and reaction mechanism of bacterial asparaginases. **Current Chemical Biology**, 1: 175–186.
- Savitri, N. A., Azmi, W. 2003. Microbial L-asparaginase: a potent antitumor enzyme. **Indian Journal of Biotechnology**, 2: 184–194.
- Shaw, S. Y., Chen, Y. J., Ou, J. J., Ho, L. 2006. Preparation and characterization of *Pseudomonas putida* esterase immobilized on magnetic nanoparticles. **Enzyme and Microbial Technology**, 39(5): 1089-1095.
- Sinha, R., Singh, H. R., Jha, S. K. 2013. L-Asparaginase: present and future prospective. **IJIRSET**, 2: 7031–7051.

- Solas, M. T., Vicente, C., Xavier, L., Legaz, M. E. 1994. Ionic adsorption of catalase on bioskin: kinetic and ultrastructural studies. **Journal of Biotechnology**, 33(1): 63-70.
- Sundaramoorthi, C., Rajakumari, R., Dharamsi, A. B. H. A. Y., & Vengadeshprabhu, K. 2012. Production and immobilization of L-asparaginase from marine source. **International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 4: 229-232.
- 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 of the United States of America**, 90: 1474–1478.
- Talekar, S., Waingade, S., Gaikwad, V., Patil, S., Nagavekar, N. 2012. Preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of Bacillus amyloliquefaciens alpha amylase. **Journal of Biochemical Technology**, 3 (4): 349–353.
- 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(6): 1307-1314.
- Tischer, W., Wedekind, F. 1999. Immobilized enzymes: methods and applications. **Topics in Current Chemistry**. 200. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 95–126.
- Torres, R., Mateo, C., Fuentes, M., Palomo, J. M., Ortiz, C., Fernández-Lafuente, R., Guisan, J. M. 2002. Reversible immobilization of invertase on Sepabeads coated with polyethyleneimine: optimization of the biocatalyst's stability. **Biotechnology Progress**, 18(6): 1221-1226.
- Ulu, A., Koytepe, S., Ates, B. 2016a. Design of starch functionalized biodegradable P (MAA-co-MMA) as carrier matrix for l-asparaginase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, 153: 559-572.

- Ulu, A., Koytepe, S., Ates, B. 2016b. Synthesis and characterization of biodegradable pHEMA-starch composites for immobilization of L-asparaginase. **Polymer Bulletin**, 73(7): 1891-1907.
- Uygun, M., Jurado-Sánchez, B., Uygun, D. A., Singh, V. V., Zhang, L., Wang, J. 2017. Ultrasound-propelled nanowire motors enhance asparaginase enzymatic activity against cancer cells. **Nanoscale**, 9(46): 18423-18429.
- Verma, N., Kumar, K., Kaur, G., Anand, S. 2007. L-Asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. **Critical Reviews in Biotechnology**, 27: 45-62.
- Vieira Pinheiro, J. P., Wenner, K., Escherich, G., Lanvers-Kaminsky, C., Wurthwein, G., Janka-Schaub, G., Boos, J. 2006. Serum asparaginase activities and asparagine concentrations in the cerebrospinal fluid after a single infusion of 2500 IU/m<sup>2</sup> PEG-asparaginase in children with ALL treated according to protocol COALL-06-97. **Pediatric Blood & Cancer**, 46: 18–25.
- Vina, 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.
- Walling, M. A., Novak, J. A., & Shepard, J. R. 2009. Quantum dots for live cell and in vivo imaging. **International Journal of Molecular Sciences**, 10(2): 441-491.
- Wang, Y., Su, P., Wang, S., Wu, J., Huang, J., Yang, Y. 2013. Dendrimer modified magnetic nanoparticles for immobilized BSA: a novel chiral magnetic nano-selector for direct separation of racemates. **Journal of Materials Chemistry B**, 1(38): 5028-5035.
- Yang, Y., Porté, M. C., Marmey, P., El Haj, A. J., Amédée, J., Baquey, C. 2003. Covalent bonding of collagen on poly (L-lactic acid) by gamma irradiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, 207(2): 165-174

- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B. 2010. Moleküler Biyoloji Bölüm 16 Biyoteknoloji ve Biyoinformatik sayfa 625-632 Nobel yayını evi ISBN 978-9944-77-184-9.
- Yong, Y., Bai, Y., Li, Y., Lin, L., Cui, Y., Xia, C. 2008. Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 320(19): 2350-2355.
- Youssef, M. M., and Al-Omair, M. A. 2008. Cloning, purification, characterization and immobilization of L-asparaginase II from *E. coli* W3110. **Asian Journal of Biochemistry**, 3: 337–350.
- 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.
- Zhang, Y. Q., Zhou, W. L., Shen, W. D., Chen, Y. H., Zha, X. M., Shirai, K., Kiguchi, K. 2005. Synthesis, characterization and immunogenicity of silk fibroin-L-asparaginase bioconjugates. **Journal of Biotechnology**, 120(3): 315-326.
- Zhang, Y., Wu, C., Guo, S., & Zhang, J. 2013. Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides. **Nanotechnology Reviews**, 2(1): 27-45.
- Zhu, Y. T., Ren, X. Y., Liu, Y. M., Wei, Y., Qing, L. S., Liao, X. 2014. Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: characterization and application for enzymatic inhibition assays. **Materials Science and Engineering: C**, 38: 278-285.
- 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: 346–358.

## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Hande ORHAN

Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa, 1992

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Edebiyat  
Fakültesi, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri  
Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Yabancı Diller : İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

#### a) Bildiriler

1) Sinem EVLİ, Hande ORHAN, Pelin AKTAŞ, Murat UYGUN, Deniz Aktaş UYGUN. Amiloglukozidazın Geri dönüşümlü İmmobilizasyonu için Metal Şelat Afinite Kriyojellerinin Hazırlanması, Kromatografi 2017, Adnan Menderes Üniversitesi, 15-17 Haziran 2017 (Sözlü Bildiri).

2) Hande ORHAN, Sinem EVLİ, Mustafa Berk DABANCA, Gamze BAŞBÜLBÜL, Murat UYGUN, Deniz AKTAŞ UYGUN, Bakteri Öldürücü Enzim Bağlı Nanopartiküller, Kromatografi 2017, Adnan Menderes Üniversitesi, 15-17 Haziran 2017 (Poster).

3) Melis BAYRAKTAROĞLU, Hande ORHAN, Sinem EVLİ, Deniz AKTAŞ UYGUN, Sinan AKGÖL, Murat UYGUN, Amiloglukozidaz Adsorpsiyonu için Lektin Bağlı Afinite Kriyojelleri, Kromatografi 2017, Adnan Menderes Üniversitesi, 15-17 Haziran (Poster).

#### b) Yayınlar

1) Evli, S., Orhan, H., Aktaş., P.S., Uygun, M., Uygun, D.A. 2017. Metal chelated cryogels for amyloglucosidase adsorption: Application for continuous starch hydrolysis. Bulletin of Materials Science dergisinde kabul edildi.

2) Orhan, H., Evli, S., Dabanca, M.B., Başblbl, G., Uygun, M., Uygun, D.A. 2018. Bacteria Killer Enzyme Attached Magnetic Nanoparticles. Materials Science and Engineering C dergisinde değerlendirmede.

3) Bayraktaroğlu, M., Orhan, H., Evli, S., Akgl, S., Aktaş Uygun, D., Uygun M. 2018. Lectin Attached Affinity Cryogels for Amyloglucosidase Adsorption. Journal of Carbohydrate Chemistry dergisinde kabul edildi.

c) Projeler

1. "Kanser Tedavisinde Kullanılan L-Asparajinaz'ın Manyetik Nanopartiküllere İmmobilizasyonu". AD Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FEF-17001. Proje araştırıcısı.

2. "Ağır Metal Gideriminde Kriyojellerin Kullanımı" AD Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu. Proje No: FEF-17008. Proje araştırıcısı.

d) Toplantı Etkinlikleri

1. "Onbirinci Ulusal/Afinite Teknikleri" kongresi organizasyon komitesi yeliği.

## İLETİŐİM

E-Posta Adresi : handeorhan17@gmail.com

Tarih :.././.....