



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**TERAPÖTİK BİR ENZİM OLAN L-ASPARAJİNAZIN
DENİZ KAYNAKLI FİLAMANTÖZ FUNGUS
SUŞLARINDAN ÜRETİMİ VE KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

Zeycan NURÇE

Biyomühendislik Anabilim Dalı

İzmir
2022

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**TERAPÖTİK BİR ENZİM OLAN L-ASPARAJİNAZIN
DENİZ KAYNAKLI FİLAMANTÖZ FUNGUS
SUŞLARINDAN ÜRETİMİ VE KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**

Zeycan NURÇE

Danışman: Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Yüksek Lisans Programı

İzmir
2022

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Terapötik bir enzim olan L-asparajinazın deniz kaynaklı filamentöz fungus suşlarından üretimi ve kısmi karakterizasyonu” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

15/02/2022

Zeycan NURÇE

ÖZET**TERAPÖTİK BİR ENZİM OLAN L-ASPARAJİNAZIN DENİZ KAYNAKLI
FİLAMENTÖZ FUNGUS SUŞLARINDAN ÜRETİMİ VE KİSMİ
KARAKTERİZASYONU**

NURÇE, Zeycan

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA

Şubat 2022, 97 sayfa

Çeşitli kanser hastalıklarında yüksek terapötik etkiye sahip olan L-asparajinaz, L-asparajini aspartat ve amonyağa hidroliz ederek anti-tümör etki gösterir ve özellikle lösemi tedavisinde kullanılmaktadır. Sağlıklı hücreler ortamda asparajin olmadığında L-asparajini sentezleyebilirken tümör hücreleri bu işlemi gerçekleştiremez dolayısıyla besin yetersizliği ve protein sentezinin inhibisyonu nedeniyle ölürler. Günümüzde klinik uygulamalarda kullanılan bakteriyel kökenli L-asparajinaz başta anaflaksi olmak üzere çeşitli yan etkilere sahiptir. Aynı zamanda enzimin, glutaminaz ve üreaz aktivitelerinin olması da başka yan etkilere neden olmaktadır. Glutaminaz, sağlıklı hücreler için gerekli olan glutamini parçalarken, üreaz ise kanda bulunan ürenin hidrolizine dolayısıyla amonyak artışına neden olmaktadır. Günümüzde yan etkileri daha az, glutaminaz ve üreaz negatif bir L-asparajinaza ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışmasında, deniz kaynaklı filamentöz fungusların glutaminaz ve üreaz negatif özellikte L-asparajinaz üretme potansiyellerinin değerlendirilmesi, aday üreticiye ait enzimin kısmi saflaştırma ve karakterizasyonu amaçlanmaktadır. Bu kapsamda, 94 adet deniz kaynaklı filamentöz fungus L-asparajinaz aktivitesinin belirlenmesi için hızlı plaka tarama yöntemiyle taranmıştır. Ardından L-asparajinaz üreticisi olduğu belirlenen 89 adet fungus glutaminaz ve üreaz aktivitesi için taranmış ve 4 aday üretici (*Penicillium crustosum* MF5, *Aspergillus flavus* MF10, *Penicillium canescens* MF20, *Cladosporium cladosporioides* MF75) seçilmiştir. Küçük ölçek fermantasyon çalışması ile asparajinaz aktivitesi 2,82 U/mL ile en yüksek *A. flavus* MF10 ile elde edilmiştir. L-asparajinazı hücre dışı ürettiği de belirlenen *A. flavus* MF10'un fermantasyon sıvısı ultrafiltrasyon ile konsantre edilmiş ardından aseton çöktürmesi gerçekleştirilmiştir. Kısmi saflaştırma ile

4,8 kat saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesinin 259 U/mg, molekül ağırlığının yaklaşık 100 kDa olduğu belirlenmiştir. Fermantasyon sıvısında üreaz ve glutaminaz aktiviteleri belirlenmezken konsantre edilen preparatta düşük glutaminaz aktivitesi (1,27 U/mL) belirlenmiş ancak üreaz aktivitesi tespit edilmemiştir. Kısmi karakterizasyon çalışmaları ile enzimin optimum sıcaklığı 40°C, optimum pH'ı ise 8,0 olarak belirlenmiştir. Enzimin bir saat sonunda 40°C'de aktivitesini %70 koruyabildiği ve sıcaklık arttıkça kademeli olarak aktivitesini kaybettiği belirlenmiştir. Enzimin pH stabilitesi çalışması ile pH 7 ve 8'de aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Kısmi olarak saflaştırılan L-asparajinazın (100 µg protein/mL) sağlıklı ve kanser hücre hatlarında sitotoksitesi değerlendirilmiş ve 24 saat sonunda SH-SY5Y (insan nöroblastom hücre hattı) hücrelerinin canlılığını %43'e, LNCap (insan prostat kanser hücre hattı) hücrelerinin canlılığını ise %61'e düşürürken sağlıklı hücre hattı olan L929 (fibroblast hücre hattı) hücrelerinde sitotoksik etki göstermemiş ve HaCaT (keratinosit hücre hattı) hücrelerinde ise düşük sitotoksite gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: L-asparajinaz, glutaminaz, üreaz, terapötik enzim, deniz kaynaklı filamentöz fungus, *Aspergillus flavus*

ABSTRACT**PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF A
THERAPEUTIC ENZYME, L-ASPARAGINASE, FROM MARINE
FILAMENTOUS FUNGUS STRAINS**

NURÇE, Zeycan

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA

February 2022, 97 pages

L-asparaginase, which has a high therapeutic effect in various cancer diseases, hydrolyzes L-asparagine to aspartate and ammonia, has an anti-tumor effect and is especially used in the treatment of leukemia. While healthy cells can synthesize asparagine when there is no asparagine in the environment, tumor cells cannot perform this process, so they die due to nutrient deficiency and inhibition of protein synthesis. Bacterial L-asparaginase, which is used in clinical applications today, has various side effects, especially anaphylaxis. In addition, the presence of glutaminase and urease activities of the enzyme also causes other side effects. Glutaminase breaks down glutamine, which is necessary for healthy cells, while urease causes hydrolysis of urea in the blood, thus increasing ammonia. Today, there is a need for a glutaminase and urease negative L-asparaginase with less side effects.

In this thesis, it is aimed to evaluate the glutaminase and urease negative L-asparaginase production potential of marine filamentous fungi and to partial purification and characterization of the enzyme of the selected strain. In this context, 94 marine filamentous fungi were screened by rapid plate screening method to determine L-asparaginase activity. Then, 89 fungi determined to be L-asparaginase producers were screened for glutaminase and urease activity and 4 candidate producers (*Penicillium crustosum* MF5, *Aspergillus flavus* MF10, *Penicillium canescens* MF20, *Cladosporium cladosporioides* MF7) were selected. In a small scale fermentation study, the highest asparaginase activity was obtained with *A. flavus* MF10 with 2.82 U/mL. Extracellular L-asparaginase produced by *A. flavus* MF10 was concentrated by ultrafiltration followed by acetone precipitation. It was determined that the specific activity of the enzyme, which

was purified 4,8 times by partial purification, was 259 U/mg and its molecular weight was approximately 100 kDa. While urease and glutaminase activities were not determined in the fermentation broth, low glutaminase activity (1.27 U/mL) was determined in the concentrated preparation, but urease activity was not detected. With partial characterization studies, the optimum temperature of the enzyme was determined as 40°C and the optimum pH was determined as 8.0. It was determined that the enzyme could maintain its activity 70% at 40°C after one hour and gradually lost its activity as the temperature increased. It has been determined that the enzyme maintains its activity at pH 7 and 8 by pH stability study. The cytotoxicity of partially purified L-asparaginase in healthy and cancer cell lines was evaluated and their viability was determined after 24 hours compared to the control. While the enzyme preparation decreased the viability of SH-SY5Y (human neuroblastoma) cells to 43% and the viability of LNCap (human prostate cancer) cells to 61%, it did not show cytotoxic effects in healthy cell line L929 (fibroblast) cells. It was determined that it showed low cytotoxicity in HaCaT (keratinocyte) cells.

Key words: L-asparaginase, glutaminase, urease, therapeutic enzyme, marine filamentous fungus, *Aspergillus flavus*.

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında “Terapötik bir enzim olan L-asparajinazın deniz kaynaklı filamentöz fungus suşlarından üretimi ve kısmi karakterizasyonu” başlıklı bilimsel araştırma projesinde elde ettiğim bilgileri aktarmaktayım. Tezin amacı deniz kaynaklı funguslardan L-asparajinaz üreten suşların tespiti, glutaminaz ve/veya üreaz negatif özellikte olanların belirlenmesi, seçilen aday suş ile enzim üretimi ve kısmi saflaştırma ile karakterizasyonunun gerçekleştirilmesidir.

Tez konusunun belirlenmesinden, çalışmaların tasarlanması ardından uygulama ve yorumlamasına kadar her aşamada bilgi ve desteği ile yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. E.Esin HAMEŞ TUNA’ya teşekkür ederim. Ayrıca FYL-2020-22265 nolu “Terapötik bir enzim olan L-asparajinazın deniz kaynaklı filamentöz fungus suşlarından üretimi ve kısmi karakterizasyonu” başlıklı bilimsel araştırma projemi destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü’ne teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

15/02/2022

Zeycan NURÇE



İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK.....	ii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
TABLolar DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Enzimler	3
2.2. L-asparajinaz	5
2.3. Tarihçesi	5
2.4. Mikrobiyal L-Asparajinazın Tipleri ve Yapısı.....	7

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5. Mikrobiyal L-Asparajinaz Üreticileri.....	8
2.5.1. Bakteriler	8
2.5.2. Funguslar	10
2.5.3. Alglar.....	13
2.5.4. Mayalar.....	13
2.6. L-Asparajinaz ve İlaç Taşıma Sistemleri	13
2.7. Sağlık Sektöründe L-Asparajinazın Kullanımı	15
2.7.1. Kanser tedavisinde L-asparajinaz.....	15
2.7.2. Enfeksiyon hastalıklarında L-asparajinaz uygulamaları	18
2.7.3. Otoimmün hastalıklarda L-asparajinaz	19
2.8. Diğer Uygulama Alanları	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Gereç	22
3.1.1. Mikroorganizmalar	22
3.1.2. Besiyerleri	23
3.1.3. Çözeltiler ve tamponlar	24
3.1.4. Cihazlar	29

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Deniz kaynaklı fungus izolatlarının aktivasyonu ve çalışma stokları	30
3.2.2. Hızlı plaka tarama yöntemi (yarı kantitatif analiz).....	31
3.2.3. Küçük ölçek fermantasyon çalışmaları	31
3.2.4. L-asparajinaz aktivite tayini	33
3.2.5. Glutaminaz aktivite tayini	34
3.2.6. Üreaz aktivite tayini	34
3.2.7. Toplam protein tayini ve spesifik enzim aktivitesi.....	34
3.2.8. Enzimin kısmi saflaştırılması	35
3.2.9. L-Asparajinaz kısmi karakterizasyonu	36
3.2.10. Sitotoksisite analizi (MTT Testi).....	39
4. BULGULAR.....	42
4.1. Mikroorganizma Aktivasyonları ve Stoklama	42
4.2. Hızlı Plaka Tarama Çalışmaları	43
4.3. Küçük Ölçek Fermantasyon Çalışmaları.....	51
4.4. Kısmi Saflaştırma İşlemleri.....	54
4.5. Karakterizasyon İşlemleri	56

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.6. Sitotoksisite Analizi	58
5. GENEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	61
6. ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR DİZİNİ	72
TEŞEKKÜR.....	94
ÖZGEÇMİŞ	95

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. L-asparajinazın hidroliz reaksiyonu	5
2.2. L-asparajinazın vücuttaki etki mekanizması	15
2.3. L-asparajinaz ile GAS proliferasyonunun inhibe edilme aşamaları	18
2.4. L-asparajinaz enzimi ile akrilamid oluşumunun engellenmesi	20
2.5. Bazı aminoasitlerin aspartattan biyosentezi	21
3.1. a) Aşılama için besiyeri yüzeyinden alınan parçalar, b) Beş mm çapındaki parçaların alınmasında kullanılan aparat	32
3.2. Sonikasyon işleminden bir görüntü	33
3.3. Ultrafiltrasyon işleminden bir görüntü	35
3.4. SDS-PAGE uygulaması (Wangler and Bellen, 2017)	38
4.1. Bazı deniz kaynaklı fungus izolatlarının MEA bulunan besiyerinde görünüşleri (Soldan sağa MF90, MF14, MF75, MF91)	42
4.2. Yatık agar içerisinde stoklanan bazı deniz kaynaklı fungus izolatlarının görünümü (soldan sağa MF5, MF10, MF12, MF13, MF13-B, MF14, MF15, MF16, MF17, MF19, MF20)	42
4.3. Fungus izolatlarının L-asparajinaz aktivitesine ait hızlı plaka tarama yönteminden bir görünüm	43
4.4. Fungus izolatlarının glutaminaz aktivitesine ait hızlı plaka tarama yönteminden bir görünüm	44
4.5. Fungus izolatlarının üreaz aktivitesine ait hızlı plaka tarama yönteminden bir görünüm	44
4.6. Bazı izolatlara ait farklı günlerdeki koloni ve zon çaplarının görünümü	47
4.7. Bazı izolatların destile ve deniz suyu içeren besiyerindeki 2. gün görüntüleri	50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.8. <i>A. flavus</i> MF10 'un LAF besiyerinde çalkalamalı kültürün 3. gün görüntüsü.....	51
4.9. Amonyum sülfat standart eğrisi	52
4.10. BSA standart eğrisi	53
4.11. SDS-PAGE görüntüsü (M:marker, FS: fermentasyon sıvısı, K: Konsantre enzim, AÇ: asetonla çöktürme)	55
4.12. L-asparajinazın a) optimum sıcaklık, b) optimum pH, c)termal stabilite ve d)pH stabilitesi	57
4.13. L-asparajinazın sağlıklı hücre hatlarında konsantrasyona bağlı 24 saat sonrası % canlılık.....	59
4.14.L-asparajinazın kanser hücre hatlarında konsantrasyona bağlı 24 saat sonrası % canlılık.....	60

TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sağlık alanında kullanılan bazı enzimler ve mikrobiyal kaynakları	4
2.2.L-asparajinaz üreten bazı bakteri türleri	9
2.3. L-asparajinaz üreticisi bazı funguslar	11
3.1 Kullanılan fungus izolatlarına ait kodlar.....	22
3.2. Hızlı plaka tarama yöntemi katı besiyeri içeriği	23
3.3. L-asparajinaz fermantasyon ortam içeriği.....	24
3.4. Örnek yükleme tamponunun içeriği.....	27
3.5. Ayırma jelinin içeriği	27
3.6.Yükleme jelinin içerik ve miktar listesi	28
4.1. L- Asparajinaz pozitif fungus izolatlarının glutaminaz ve üreaz üretimi	45
4.2.Fungus izolatlarının (66 adet) 1-4 gün arasındaki zon indeksleri (gri gölgeler seçilen aralık içinde bulunan değerleri göstermektedir)	49
4.3. Seçilen suşların farklı fermantasyon sürelerine ait enzim aktiviteleri	52
4.4. <i>A. flavus</i> MF10'un hücre içi ve hücre dışı enzim aktivite ve protein değerleri	53
4.5. <i>A. flavus</i> MF10'a ait glutaminaz ve üreaz aktiviteleri	54
4.6. Kısmi saflaştırma işlemleri	55

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
g	Gram (kütle birimi)
mg	Miligram (kütle birimi)
µg	Mikrogram (kütle birimi)
L	Litre (hacim birimi)
mL	Mililitre (hacim birimi)
µL	Mikrolitre (hacim birimi)
°C	Santigrat derece (sıcaklık birimi)
M	Molar
mM	Milimolar
µmol	Mikromol
kDa	Kilodalton
rpm	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
pH	Power of Hydrogen
%	Yüzde

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
U	Unit
R^2	Korelasyon katsayısı
w/v	Hacimde ağırlıkça yüzde
h	Saat (zaman birimi)
dk	Dakika (zaman birimi)
nm	Nanometre
NaOH	Sodyum hidroksit
HCl	Hidrojen klorür
KCl	Potasyum klorür
NaCl	Sodyum klorür
KH_2PO_4	Potasyum fosfat
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Magnezyum sülfat heptahidrat
$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	Bakır (II) nitrat trihidrat
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Çinko sülfat heptahidrat
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Demir sülfat heptahidrat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar **Açıklama**

ALL Akut Lenfoblastik Lösemi

yy Yüzyıl

vb ve benzeri

Bkz bakınız

et al ve diğerleri

sp Tür

Thr Treonin

Tyr Tirozin

Ser Serin

Glu Glutamin

Asp Asparajin

Ala Alanin

Lys Lizin

BSL Biyogüvenlik Seviyesi

PEG Polietilen glikol

FDA Gıda ve İlaç İdaresi (Food and Drug Administration)

MEA Malt Ekstrakt Agar

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
PDA	Patates Dekstroz Agar
ABS	Absorbans
UV	Ultraviyole
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
PEG	Polietilen glikol (Polyethylene glycol)
MDR	Çoklu İlaç Direnci (Multiple Drug Resistance)
DMSO	Dimetil sülfoksit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik reaksiyonları, metabolik yolları, hücre büyümesi ve bölünmesi dâhil olmak üzere hücresel süreçleri kontrol eden önemli katalizörlerdir (Sharma et. al., 2021). Hayvan, bitki ve mikrobiyal kaynaklar dâhil tüm canlı organizmalarda bulunan enzimlerin, endüstriyel olarak talepleri karşılama noktasında hayvansal ve bitkisel kökenli olanları yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle mikrobiyal enzimler endüstriyel açıdan önemli birer kaynaktır (Gurung et al., 2013). Mikrobiyal enzim üretim prosesi daha hızlı, daha uygun maliyetli, daha kolay ölçeklenebilir ve aynı zamanda genetik manipülasyonlara daha uygundur (El-Gendi et al., 2022).

Enzimler sağlık açısından değerlendirilirse, vücutta herhangi bir enzimin eksikliği veya bir enzimin aktivitesinde azalma olması tıbbi açıdan bazı sorunlara yol açar. Bu sorunların ve bunlara bağlı oluşan hastalıkların tedavisi amacıyla terapötik enzimler uzun yıllardır kullanılmaktadır (Tandon et al., 2021).

L-asparajinaz enzimi (EC3.5.1.1; L-asparajin amidohidrolaz; ASNase), L-asparajin aminoasitini parçalayarak aspartik asit ve amonyak oluşumunu sağlayan, lösemi tedavilerinde kullanılan terapötik bir enzimdir. Bu enzim çocukluk çağında görülen lösemilerin %75'ini oluşturan Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) başta olmak üzere lenfatik sistemin çeşitli hastalıklarının tedavisinde ön plana çıkmaktadır (Dias et al., 2016; Orabi et al., 2019; Atay vd., 2005). Günümüzde *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilen bakteriyel L-asparajinazlar lösemi tedavisinde kullanılmaktadır (Narta et al., 2007; El-Naggar et al., 2014; Muneer et al., 2020).

Klinikte kullanılan L-asparajinaz bakteriyel kökenli olduğundan hastalarda pankreatit, anafilaksi, diyabet, kafa içi tromboz gibi yan etkilere neden olmaktadır (Duval et al., 2002; Yadav et al., 2014; El-Shafei and El-Ghonemy, 2015; Ali et al., 2018; Fonseca et al., 2021). Aynı zamanda L-asparajinaz enziminin glutaminaz aktivitesi normal hücrelerin proliferasyonu için gerekli olan glutamini parçalayarak ekstrasvasküler sistemde ciddi strese neden olur (Prakash et al., 2020a; Prakash et al., 2020b; Freire et al., 2021). L-asparajinazın üreaz aktivitesi ise kanda bulunan ve toksik olan ürenin hidrolizine ve dolayısıyla amonyak artışına neden olur (Ashok et al., 2019; Chakraborty and Shivakumar, 2021).

Bakteriyel kökenli L-asparajinazın çeşitli yan etkilerinin olması yeni kaynak arayışlarına neden olmakta ve bu durumda ökaryot olan funguslar ön plana çıkmaktadır.

Ayrıca funguslar yüksek miktarda hücre dışı enzim üretme kabiliyetlerine sahiptirler. Bunun yanı sıra tez kapsamında kullanılan fungusların deniz kaynaklı olması dolayısıyla deniz ortamlarındaki farklı koşullara (tuzluluk, pH, düşük sıcaklık vb.) adapte olabilmeleri nedeniyle bu funguslardan üretilen enzimler farklı nitelikler taşıma potansiyelindedir.

Bu tez kapsamında deniz kaynaklı funguslardan medikal öneme sahip, terapötik bir enzim olan L-asparajinazı üreten suşların tespiti, glutaminaz ve/veya üreaz negatif olanlarının belirlenmesi, seçilen aday üretici ile üretim, kısmi saflaştırma, karakterizasyonun ve enzim preparatının kanser ve sağlıklı hücre hatlarında etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

“Enzim” terimi ilk olarak 1878’de Alman fizyolog Wilhelm Kühne tarafından kullanılmıştır (Robinson, 2015). Enzimler yaşamı devam ettiren sayısız kimyasal reaksiyonu hızlandırmada rol oynayan protein yapılı bileşiklerdir (Sabu et al., 2005; El-Gendi et al., 2022). Reaksiyon hızlarını normal bir kimyasal reaksiyondan 100 milyon ila 10 milyar kat daha arttırabilirler (Robinson, 2015).

Enzimler son derece güçlü katalizörlerdir. Genellikle bir tip substrat molekülünün ürüne dönüşümünü katalize etmelerinden dolayı özgülüdürler. Bazı enzimler ise grup özgüllüğü gösterir. Örneğin alkalın fosfataz çeşitli substratlardan bir fosfat grubu çıkarır. Glukoz oksidaz gibi enzimler ise substratı olan β -D-glukoz için tam özgülük göstererek diğer monosakkaritlerle neredeyse hiç aktivite göstermez (Robinson, 2015).

19. yüzyılın sonlarında ve 20. yüzyılın başlarında birçok enzimin ekstraksiyon ve karakterizasyon işlemlerinde ve ayrıca ticari olarak kullanımında ilerlemeler kaydedilmiştir (Robinson, 2015). Protein mühendisliğindeki gelişmeler ile enzimler, farklı endüstriyel alanlarda ve terapötik amaçlarla kullanılabilmektedir (Gurung et al., 2013). Yiyecek ve içecek endüstrisinde, kağıt hamuru endüstrisinde, tekstil endüstrisinde, biyoremediasyon gibi çevresel uygulamalarda ve kozmetik sektöründe çeşitli uygulamaları bulunmaktadır (El-Gendi et al., 2022). Bu uygulamaların yanı sıra enzimlerin antimikrobiyal, antikanser ve antioksidan olarak sağlık alanında önemli kullanım alanları mevcuttur (Tablo 2.1).

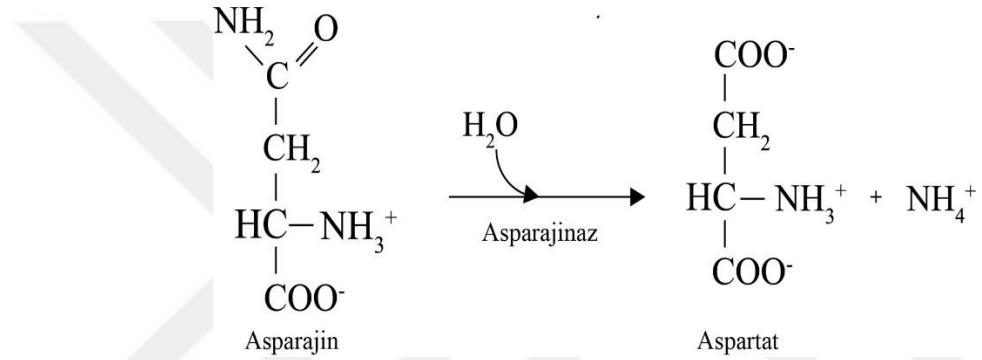
Enzimlerin isimlendirilmesindeki karışıklıklardan dolayı Uluslararası Biyokimya Birliği, bu konuyu ele almak için Enzim Komisyonunu kurmuştur. İlk baskısı 1961’de yayınlanan raporda sistematik bir isimlendirme kullanılmıştır. Ardından 1992’de yayınlanan altıncı baskıda yaklaşık 3200 farklı enzimin ayrıntıları yer almaktadır. Bu sistem içerisinde enzimler katalizlenen reaksiyon tipine göre sınıflandırılmaktadır ve 6 ana gruba ayrılmıştır. Bunlar; oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır (Robinson, 2015; El-Gendi et al., 2022).

Tablo 2.1. Sağlık alanında kullanılan bazı enzimler ve mikrobiyal kaynakları

Enzim	Kullanım amacı	Mikrobiyal kaynak	Referans
Katalaz	Antioksidan	<i>Aspergillus flavus</i>	El-Gendi et al., 2022
Kollajenaz	Glokom hastalığı, Kıkırdak onarımı, Dupuytren hastalığı, selülit tedavisi, deri ülseri	<i>Clostridium perfringens</i>	Mane and Tale, 2015
L-asparajinaz	Lenfosarkoma, Akut lenfoblastik lösemi, Hodgkin hastalığı	<i>E.coli</i> <i>Pseudomonas acidovorans</i> , <i>Acinetobactor sp.</i> ,	El- Naggat et al., 2014; El-Gendi et al., 2022
Streptokinaz	Kan pıhtılaşması	<i>Streptococci sp.</i>	Gurung et al., 2013
Sakrosidaz	Konjenital sükras izomaltaz eksikliği	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kaur and Sekhon, 2012
Ürikaz	Gut	<i>Aspergillus flavus</i>	Gurung et al., 2013
Maltaz	Pompe hastalığı	<i>Aspergillus oryzae</i>	Kaur and Sekhon, 2012
β -laktamaz	Antibiyotik direnç Penisilin alerjisi	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i>	Sabu, 2003; Gurung et al., 2013
Kitinaz	Antikanser, antimikrobiyal	<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride</i> AUMC 13021	El-Gendi et al., 2022
Serratiopeptidaz	Anti-inflamatuar	<i>Serratia marcescens</i>	Sabu, 2003
β -galaktosidaz	Laktoz intoleransı	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Kluyveromyces sp.</i>	Husain et al., 2010
Ribonükleaz	Antiviral	<i>Sacchromyces sp.</i>	Lin et al., 2013
Ürokinaz	Kan pıhtılaşması	<i>Bacillus subtilis</i>	Mane and Tale, 2015
Glikosidaz	Antitümör	<i>Aspergillus niger</i>	Mane and Tale, 2015
Lipaz	Pankreas bozuklukları tedavisi, antimikrobiyal	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida rugosa</i>	Kaur and Sekhon, 2012; El-Gendi et al., 2022
Prolil endoproteaz	Glüten	<i>Aspergillus niger</i>	Edens et al., 2005
Superoksit dismutaz	Anti-oksidan Anti-inflamatuar	<i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Nocardia sp.</i>	Sabu, 2003
L-glutaminaz	Antitümör	<i>E. coli</i>	Imada et al., 1973; Sabu et al., 2005

2.2. L-asparajinaz

L-asparajinaz (EC 3.5.1.1; L-Asparajin amidohidrolaz; ASNase), L-asparajin amino asitindeki amid bağlarını hidroliz ederek aspartik asit (aspartat) ve amonyak oluşumunu sağlayan bir enzimdir (Şekil 2.1) (El- Naggar et al., 2014). L-asparajinaz, lenfatik sistemin çeşitli hastalıklarında, Hodgkin hastalığı, akut miyelositik lösemi, melanosarkom, lenfosarkom, retikulosarkom tedavilerinde ve özellikle de akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde kullanılan önemli bir kemoterapötik ajandır (Dias et al., 2016; Orabi et al., 2019). L-asparajinaz enzimi sağlık sektörünün yanı sıra gıda endüstrisinde de kullanılmaktadır (Muneer et al., 2020).



Şekil 2.1. L-asparajinazın hidroliz reaksiyonu

2.3. Tarihçesi

L-asparajinazın gelişimi için öncü gözlem 1922 yılında Clementi'nin *Guinea pig* (kobay) serumunun L-asparajinazın zengin bir kaynağı olduğunu ortaya koymasıyla başlamıştır (Clementi, 1922; Narta et al., 2007; El- Naggar et al., 2014). Ardından 1953 yılında Kidd tarafından yapılan çalışma ile kobay serumunun farelerde ve sıçanlarda transplante lenfoid tümörlerinin büyümesini engellediğini fakat bu sitotoksik etkinin at ve tavşan serumunda olmadığı gözlemlenmiştir (Kidd, 1953; Müller and Boos, 1998; Narta et al., 2007; El- Naggar et al., 2014). Bu gelişmeleri takiben 1956 yılında Neuman ve McCoy, Walker karsinosarkoma 256'nın büyümesi için L-asparajin gerektirdiğini göstermişlerdir (Neuman and McCoy, 1956; Müller and Boos, 1998; Narta et al., 2007). Benzer bir çalışmada 1961 yılında fare lösemi L5178Y hücre hattı kullanılarak L-asparajinin lösemi hücrelerinin büyümesi ve çoğalması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Haley et al., 1961). 1963 yılında Broome kobay serumunda bulunan anti-lösemik özelliğe sahip ajanın L-asparajinaz olduğunu bildirmiştir. L-asparajinazın lenfoma 6C3HED hücrelerini inhibe

etmekte etkili olduğunu bildirilmiştir (Broome, 1963). 1964 yılında ise *E. coli*'den izole edilen L-asparajinaz başarılı bir şekilde saflaştırılarak tümörler üzerinde kobay serumuna benzer aktiviteler göstermiştir (Mashburn and Wriston, 1964; Müller and Boos, 1998; El-Naggar et al., 2014). 1966-1969 yılları arasında L-asparajinazın tümörler üzerinde yukarıdaki çalışmaya benzer etkileri çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Schwartz et al., 1966; Boyse et al., 1967; Campbell and Mashburn, 1969). Elde edilen bu bulgular yardımıyla büyük ölçekli L-asparajinaz enzimi üretimi, saflaştırılması ve klinik öncesi ve klinik uygulamalar için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Roberts et al., 1966; Campbell et al., 1967; Whelan and Wriston, 1969; Ho et al., 1969).

1967 yılında 3 ileri lenfosarkomalı köpek, *E. coli*'den izole edilen L-asparajinaz ile tedavi edilmiştir. Tümörün gerilemesinde ve iyileşmesinde önemli sonuçlar alınmıştır (Old et al., 1967). *E.coli*'den L-asparajinaz izolasyon işlemleri yapılırken çeşitli potansiyel L-asparajinaz kaynakları da araştırılmıştır. Wade ve arkadaşları 1968 yılında antilösemik etkisi olan yeni L-asparajinazı *Erwinia carotovora*'dan izole etmiştir (Wade et al., 1968). *E. carotovora* yüksek L-asparajinaz aktivitesi göstererek enzim üretiminde kullanılmıştır (Wade et al., 1971; Ohnuma et al., 1972). 1970'li yıllardan itibaren L-asparajinaz enzimi çocuklarda lenfoblastik malignitelerin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Tallal et al., 1970; Clavell et al., 1986; Asselin et al., 1989; Asselin et al., 1999). 1978 yılında doğal *E. coli*'den izole edilen L-asparajinaz ALL tedavisinde kullanılmak üzere Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Batoöl et al., 2016).

Bakterilerden elde edilen L-asparajinazın anafilaksiden diyabete kadar değişen çok çeşitli yan etkilere neden olduğu belirlenmiştir (Duval et al., 2002; Yadav et al., 2014; El-Shafei ve El-Ghonemy, 2015; Bedaiwy et al., 2016; Ali et al., 2018). Literatür araştırmaları sonucunda enzimin biyokimyasal özelliklerinin kullanılan mikrobiyal suş ile değişebileceğini gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde *Erwinia* kökenli L-asparajinazın *E. coli* kökenli L-asparajinaz enzimine kıyasla daha az alerjik reaksiyon gösterdiği kaydedilmiş ancak enzim yarı-ömürünün daha kısa olduğu bildirilmiştir (Asselin et al., 1993). Bununla birlikte her iki kaynaktan da elde edilen enzim yüksek immunojenite sergilemiştir. Bu nedenle enzim aktivitesi korunarak immunojenitesinin azaltılması ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Kamisaki ve arkadaşları (1981) polietilen glikol ile *E. coli* türevli L-asparajinazı modifiye etmiştir (Kamisaki, 1981). Enzimin polietilen glikol (PEG) ile birleştirilmesi (pegilasyon) ilacın immunojenik reaksiyonlarını azaltmış dolayısıyla

potansiyel olarak aşırı duyarlılık etkisini düşürmüştür (Keating et al., 1993; Müller and Boss, 1998). Bununla birlikte yapılan bir çalışmada pegilasyon uygulanmış L-asparajinazın (Pegaspargaz) aşırı duyarlı olan hastalarda anafilaktik şoku tamamen yok edemediği de gösterilmiştir (El-Naggar et al., 2014). 1985 yılında İngiltere de *Erwinia* kökenli L-asparajinazın ALL tedavisinde kullanımına izin verilmiştir (Batool et al., 2016). 1994 yılında doğal L-asparajinaz formlarına aşırı duyarlı ALL hastalarında pegilasyon uygulanmış *E. coli* türevli L-asparajinazı için FDA kullanım onayı vermiştir (Dinndorf et al., 2007; Batool et al., 2016). 2006 yılına gelindiğinde FDA, tüm ALL hastalarında ilk basamak tedavisi için pegilasyon uygulanmış *E. coli* türevli L-asparajinaz kullanımını onaylamıştır (Dinndorf et al., 2007; Batool et al., 2016). 2011 yılının Kasım ayında ise FDA, *Erwinia* kökenli L-asparajinazının, *E. coli* türevli L-asparajinaza karşı aşırı duyarlılık gösteren hastalarda kullanımını onaylamıştır (Batool et al., 2016).

2.4. Mikrobiyal L-Asparajinazın Tipleri ve Yapısı

L-asparajinazın yapısını moleküler düzeyde belirlemek için birçok çalışma yapılmıştır. L-asparajinaz genelde tetramer yapıda bulunmakla birlikte farklı kaynaklardan elde edildiğinde heksamik, dimerik veya monomerik formlarda bulunabilmektedir (Batool et al., 2016). Bakteriyel kökenli çoğu L-asparajinaz tersiyer ve kuaterner yapılar sergilemektedir. Aynı zamanda ortak biyokimyasal özelliklere de sahiptirler (Ramya et al., 2012).

E. coli'den üretilen iki tip L-asparajinaz enzimi vardır. L-asparajinaz I (Tip I) sitoplazmada bulunur ve genellikle L-asparajin için düşük afiniteye sahiptir. L-asparajinaz II (Tip II) ise periplazmik boşlukta bulunur ve L-asparajin için Km değeri çok daha düşüktür bu nedenle yüksek afiniteye sahiptir. Bu durum Tip II enzimin anti-tümör özelliklerini açıklamaktadır (El-Naggar et al., 2014; Jiao et al., 2020). Tip II L-asparajinazın moleküler kütlesi 140-150 kDa arasında değişmektedir. Enzim bir homotetramer olarak aktiftir. Her monomer daha büyük bir N-terminal alanı ve daha küçük C terminal alanı şeklinde düzenlenmiş; 14 beta-iplik ve 8 alfa-heliksten oluşan yaklaşık 330 aminoasitlik polipeptit zincirinden oluşmaktadır (Aghaiypour et al., 2001). *E. coli* ve *E. chrysanthemi*'den elde edilen enzimlerin %46 oranında yüksek homoloji gösterdiği belirlenmiştir (Jaskolski et al., 2001). Aktif bölge iki bitişik monomerdeki aminoasitlerin düzenlenmesi ile şekillenir. Aktif bölge, Thr15, Tyr29, Ser62, Glu63, Thr95, Asp96, Ala120, Lys168 aminoasitlerini içerir.

Buradaki Thr15 ve Thr95 enzimin katalitik aktivitesinden sorumludur. Bitişik olan monomer de ise sadece Ser254 yer alır (Qeshmi et al., 2018).

2.5. Mikrobiyal L-Asparajinaz Üreticileri

L-asparajinaz enzimi, balıklar, memeliler, kuşlar gibi çeşitli hayvanların dokularında (karaciğer, pankreas, beyin, yumurtalık/testis, böbrekler, dalak, akciğer) ve bazı bitkilerde bulunur (Lopes et al., 2017). Bazı kemirgenler kan serumlarında bu enzime sahiptir, ancak insanlar bu önemli anti-kanserojen maddeden yoksundur (Muneer et al., 2020).

Mikroorganizmalar, hayvan ve bitki enzimlerine alternatif önemli enzim kaynaklarıdır. Mikrobiyal enzim üreticileri olarak bakteriler, funguslar, algler ve mayalar sıralanabilir. Mikroorganizmalar;

- Basit büyüme yetenekleri,
- Biyokimyasal çeşitlilikleri,
- Optimizasyon kolaylığı,
- Ölçek büyütme işlemine uygunluğu,
- Görece ekonomik ekstraksiyon ve saflaştırma işlemleri,
- İyi stabilite özellikleri,
- Gen manipülasyonuna yatkınlığı,
- Bitkilerden farklı olarak mevsimsel dalgalanmaların olmaması

gibi nedenlerden ötürü avantajlı konumdadır (Gurung et al., 2013; El-Naggar et al., 2014; Cachumba et al., 2016; Shrivastava et al., 2016; Lopes et al., 2017). Enzimin biyokimyasal ve kinetik özelliklerinin kullanılan mikrobiyal suş ile değiştiği bilinmektedir (El-Naggar et al., 2014).

2.5.1. Bakteriler

Bakteriyel kökenli L-asparajinazlar tıbbi açıdan ilgi çekicidirler. Günümüzde klinik olarak kullanılan L-asparajinazlar 2 bakteri kaynağından elde edilir; *E. coli* ve *E. chrysanthemi*. Bu bakterilerden elde edilen L-asparajinazlar uzun yıllardır lösemi tedavisinde kullanılmaktadır (Narta et al., 2007; El-Naggar et al., 2014; Muneer et al., 2020).

Her iki bakteriden yüksek konsantrasyonlarda elde edilen L-asparajinaz, benzer antineoplastik aktivite ve toksisite mekanizmasına sahip olmasına rağmen serolojik ve biyokimyasal açıdan birbirinden farklıdır (Narta et al., 2007; Lopes et al., 2017). Ancak bakterilerden elde edilen L-asparajinazların anaflaksi, karaciğer fonksiyonlarında bozulma, pankreatit, immun fonksiyon bozukluğu, diyabet, kafa içi tromboz gibi yan etkilere neden olduğu bilinmektedir (Duval et al., 2002; Yadav et al., 2014; El-Shafei and El-Ghonemy, 2015; Ali et al., 2018).

Yerkürede denizel ve karasal habitatlarda yaygın olarak bulunan *Actinobacteria* üyeleri içerisinde gelişmiş misel yapısı gösteren ve aktinomiset olarak adlandırılan bakteriler, sekonder metabolit ve enzim üretimi açısından değerli bir gruptur (Tablo 2.2). Aktinomisetler arasında özellikle *Streptomyces* türleri denizel ve karasal habitatlarda yaygın olarak bulunmaları nedeniyle ve yeni metabolit üretme kapasiteleri nedeniyle dikkat çekmektedir. L-asparajinaz üretimi açısından *Streptomyces* türleri ile gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir (El-Naggar et al., 2014; Batool et al., 2016).

Tablo 2.2.L-asparajinaz üreten bazı bakteri türleri

Bakteri	Referans
<i>Erwinia caratovora</i>	Deokar et al., 2010
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Muneer et al., 2020
<i>Escgherichia coli</i> (MTCC 739)	Vidya et al., 2011
<i>Thermus thermophilus</i>	Pritsa and Kyriakidis, 2001
<i>Bacillus licheniformis</i> ,	Gulati et al., 1997
<i>Bacillus circulans</i>	
<i>Thermococcus gammatolerans</i>	Xue et. al. 2014
<i>Streptomyces ginsengisoli</i>	Deshpande et al., 2014
<i>Streptomyces iranensis</i>	Dharmaraj, 2011
<i>Streptomyces alkaliphilus</i>	Jha et al., 2012
<i>Bacillus firmus</i> (AVP 18)	Rudrapati and Andipudi, 2017
<i>Thermococcus kodakaraensis</i>	Chohan and Rashid, 2013
<i>Acinetobacter glutaminasifican</i>	Cachumba et al., 2016

2.5.2. Funguslar

Funguslar da bakteriler gibi potansiyel bir L-asparajinaz kaynağıdır. Ökaryot yapıları nedeniyle fungal enzimler, evrimsel olarak insanlara daha yakın olduğundan insan enzimleriyle karşılaştırılabilir özelliklere sahiptir. Dolayısıyla kanser tedavisinde diğer mikroorganizma enzimlerinden daha başarılı şekilde kullanılabilirler (Ashok et al., 2019; Chand et al., 2020; Hatamzadeh et al., 2020).

Fungal kaynaklardan elde edilen enzimlerin kullanımı ile tedavi sırasında açığa çıkan yan etkilerin azaltılacağı düşünülmektedir. Funguslar, yüksek miktarda hücre dışı enzim üretme kabiliyetine sahip olduğundan enzim kolayca ekstrakte edilip saflaştırılabilir (Batoool et al., 2016; Hatamzadeh et al., 2020).

Fungusların L-asparajinaz üretiminde en yaygın kullanılan cinslerinin *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* olduğu görülmektedir (Cachumba et al., 2016)(Tablo 2.3).

Tayland tıbbi bitkilerinden izole edilen endofitik funguslar içerisinde *Colletotrichum*, *Eupenicillium*, *Talaromyces* ve *Fusarium*'un bu enzimin ana üreticileri olduğu rapor edilmiştir (Theantana et al., 2007; Theantana et al., 2009).

Denizel olarak alglerden izole edilen endofitik funguslara bakıldığında *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Phaeotrichoconis*, *Phoma* ve *Pithomyces*'in L-asparajinaz ürettiği rapor edilmiştir (Thirunavukkarasu et al., 2011).

Aspergillus türleri içerisinde; *A. niger*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. sydowii* ve *A. tamarii*'nin L-asparajinaz ürettiği bilinmektedir (Sarquis et al., 2004; Mishra, 2006; Dange and Peshwe, 2015; Zia et al, 2013; Farag et al., 2015; Bedaiwy et al., 2016; Ali et al., 2018; Hassan et al., 2018; Da Cunha et al., 2021).

Tablo 2.3. L-asparajinaz üreticisi bazı funguslar

Fungus	Üretim	Referans
<i>Aspergillus</i> sp.	Hücre dışı	Ahmed et al., 2015
<i>Aspergillus oryzae</i> (CCT 3940) <i>Aspergillus niger</i> (LBA 02)	Hücre dışı	Dias et al., 2019
<i>Aspergillus oryzae</i>	Hücre dışı	Da Cunha et al., 2021
<i>Aspergillus terreus</i>	Hücre dışı	Farag et al., 2015; Hassan et al., 2018
<i>Aspergillus tamarii</i>	Hücre dışı	Bedaiwy et al., 2016
<i>Fusarium</i> sp. <i>Phoma</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.	Hücre dışı	Chow and Ting, 2015
<i>Aspergillus</i> sp.	Hücre dışı	Kalyanasundaram et al., 2015
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hücre dışı	Benchamin et al., 2019
<i>Aspergillus sydowii</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Hücre dışı	Ali et al., 2018
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Hücre dışı	Kondapalli and Teege, 2021
<i>Penicillium</i> sp.	Hücre dışı	Patro and Gupta, 2012
<i>Penicillium</i> sp. <i>Helminthosporium RF3</i>	Hücre içi	Gupta et al., 2009
<i>Paecilomyces</i> RF21 <i>Penicillium</i> RF 22 <i>Aspergillus</i> AF 7	Hücre dışı	Gupta et al., 2009
<i>Fusarium culmorum</i> ASP-87	Hücre dışı	Meghavarnam and Janakiraman, 2015
<i>Aspergillus niger</i>	Hücre dışı	Dange and Peshwe, 2015
<i>Fusarium equiseti</i> AHMF4	Hücre dışı	El-Gendy et al., 2021
<i>Trichoderma viride</i>	Hücre dışı	Lincoln et al., 2015
<i>Colletotrichum</i> sp.	Hücre dışı	Chow and Ting, 2015; Theantana et al., 2009

2.5.2.1. *Aspergillus flavus*

Adını 1729 yılında mikolog P.A. Micheli'den alan, funguslar içerisinde bilinen en eski cinslerden olan *Aspergillus* 200'den fazla tür içermektedir (Bennett, 2007). Bu türlerin içerisinde yer alan *Aspergillus flavus* ise 1809'da tanımlanmıştır. Hava ve böcekler sayesinde dünya çapında dağılıma sahiptir (Hedayati et al., 2007).

Genel olarak kadifemsi sarıdan yeşile dönük spor renklerine sahiptir. Sklerotiasının boyutuna göre 2 gruba ayrılan karmaşık bir türdür: Grup I, sklerotia > 400 mm olan L suşları ve Grup II, sklerotia < 400 mm olan S suşları. İki grupta B1 ve B2 aflatoksinler üretir ayrıca S suşları aflatoksin G1 ve G2'yi üretebilmektedir. Sklerotia misel olarak büyür ve daha sonra konidioforları oluşturur (Amaiike and Keller, 2011). Konidioforlar kalın duvarlı, renksiz, pürüzlü ve 1 mm'den kısa uzunluktadır. Veziküllerin çapı 10-65 µm arasında değişir, alt küresel (subglobose) ya da küresel halde bulunur. Konidyumları da tipik olarak küresel veya alt küreseldir, belirgin bir şekilde ekinülat olup, çapları 3,5 ila 4,5 µm arasında değişmektedir. Optimum büyüme sıcaklığı 37°C'dir. Ancak 12-48°C arasında değişen sıcaklıklarda büyüebilmektedir (Hedayati et al., 2007). *A. flavus* 8 kromozoma sahiptir ve genom boyutunun yaklaşık 36,8 Mb olduğu, 12.000 fazla fonksiyonel geni kodladığı belirlenmiştir. Diğer *Aspergillus* türlerine göre genomu biraz daha büyüktür ve *A. oryzae* ile yakından ilişkili olduğu belirlenmiştir (Amaiike and Keller, 2011)

A. flavus, güçlü mikotoksinler üreten, insan invaziv aspergilloz hastalığına neden olan *Aspergillus* türleri içinde ikinci sıradadır. Bununla beraber *A. flavus* ile yapılan çeşitli enzim çalışmaları mevcuttur. Shrivasta ve arkadaşları 2010 ve Patro ve arkadaşları tarafından 2014 yılında *A. flavus* 'tan L-asparajinaz izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Shrivastava et al., 2010; Patro et al., 2014) Rhodes ve arkadaşları proteaz enzimini *A. flavus* 'tan izole etmişlerdir (Rhodes et al., 1990). Gomes ve arkadaşları ise bu türden 2005 yılında termostabil glukozamilaz izole etmişlerdir (Gomes et al., 2005). Bununla birlikte *A. flavus* ile amilaz, proteinaz, selülaz, ksilanaz gibi çeşitli enzimlerin üretimi rapor edilmiştir (Abou-Zeid et al., 1997; Oyeleke et al., 2010; Guimaraes et al., 2013).

2.5.3. Algler

1982 yılında yapılan çalışmada *Chlamydomonas*'tan L-asparajinaz üretilmiştir. Bu L-asparajinaz C3H farelerindeki Gardner sendromunu inhibe edememiştir. Bunun nedeni enzimin Km'sinin kemoterapide kullanılan asparajinaza göre daha yüksek olmasıdır (Paul, 1982).

Chlorella vulgaris'in L-asparajinaz üretimi için güvenli, yeni ve ekonomik bir kaynak olabileceği belirtilmiştir (Ebrahiminezhad et al., 2014). Bununla birlikte *Chlamydomonas* sp., *Spirulina maxima*, *Vaucheria uncinata* türlerinin de L-asparajinaz ürettiği bildirilmiştir (Paul, 1982; Abd El Baky and El Baroty, 2016; Batool et al., 2016).

2.5.4. Mayalar

Saccharomyces cerevisiae'nin L-asparajinaz üreticisi olduğu bildirilmiştir. Bu enzim aktivitesi amonyak, glutamin ve glutamatta büyütülen hücrelerde görülmezken, azot açlığına maruz kalmış veya prolin gibi zayıf azot kaynağı bulunan ortamda görülmektedir (Asthana and Azmi, 2003).

Candida utilis'in hücre kültürü sıvısından indirgeyici ajan ile muamele edilerek elde edilen L-asparajinaz ALL tedavisinde kullanılabilir (Asthana and Azmi, 2003). Aynı zamanda *Pichia polymorpha*, *Rhodospiridium toruloides*, *Candida guilliermondii* maya türlerinin de L-asparajinaz ürettikleri belirlenmiştir (Foda et al, 1980; Stepanyan and Davtyan, 1998; Ramakrishnan and Joseph, 1996).

2.6. L-Asparajinaz ve İlaç Taşıma Sistemleri

Son yıllarda nanopartiküller, kanser, HIV (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü), bulaşıcı hastalıkların tedavisinde ilaç taşıyıcı ajanlar olarak kullanılmaktadır (Vimal and Kumar, 2017). Nanotaşıyıcıların ilaç salım sistemlerinde kullanılması ilaçların toksisitesini azaltmak, biyoyararlanımını artırmak, yarılanma ömrünü iyileştirmek ve çoklu ilaç dirençliliğinin önüne geçmek en önemli avantajlarıdır. Günümüzde farklı nanotaşıyıcı sistemler üretilmektedir: polimerik nanopartiküller, polimerik konjugatlar, polimerik miseller, dendrimerler, lipozomlar, altın nanopartiküller ve karbon nanotüpleri en yaygın

kullanılan nanopartikül tipleridir (Tüylek, 2019). PEG-L-asparajinaz ALL tedavisinde FDA onaylı ilk polimerik terapötik ajandır. L-asparajinazın ilaç taşıyıcı ajan olarak ipek fibroin nanoparçacık, manyetik nanoparçacık ve karbon nanopartiküller ile taşınımlara denenmiştir (Vimal and Kumar, 2017). PEG-L-asparajinaz (polietilen glikol-L-asparajinaz), doğal *E. coli* türevli L-asparajinazın polietilen glikol ile kovalent olarak bağlanması sonucunda oluşturulan modifiye versiyonudur (El-Naggar et al., 2014). Doğal *E. coli* türevli L-asparajinaz gibi PEG-asparajinazda pH 7.0'da aktivite, pH 5.0'da izoelektrik nokta ve 50°C reaksiyon sıcaklığında optimal koşullar ile benzer kimyasal özelliklere sahiptir (Fu and Sakamoto, 2007).

E. coli türevli L-asparajinaz ile tedavi edilen yetişkin ve çocuk hastaların %20-30'unda aşırı duyarlılık reaksiyonları oluşabilmektedir. Pegilasyon işlemi, immünojenik epitopları bloke eder böylece *E. coli* türevli L-asparajinaz kökenli aşırı duyarlılık reaksiyonlarını azaltır. İlaç stabilitesini artırarak, ilacın yarı ömrünü uzatır ve fagositoz yeteneğine sahip Retiküloendotel Sistem (RES) hücrelerinin enzimi ortadan kaldırma süresini geciktirir. İlacın farmokinetiğini iyileştirerek daha düşük dozlama sıklığına izin verir (Fu and Sakamoto, 2007; El-Naggar et al., 2014). Örneğin ALL'li hastalarda yapılan bir çalışmada bir doz PEG-asparajinazın, 6 - 9 doz doğal *E. coli* türevli L-asparajinazın yerini alabileceği gösterilmiştir. Bu durum hastalarda ağırlı enjeksiyon sayısını azaltır (Fu and Sakamoto, 2007).

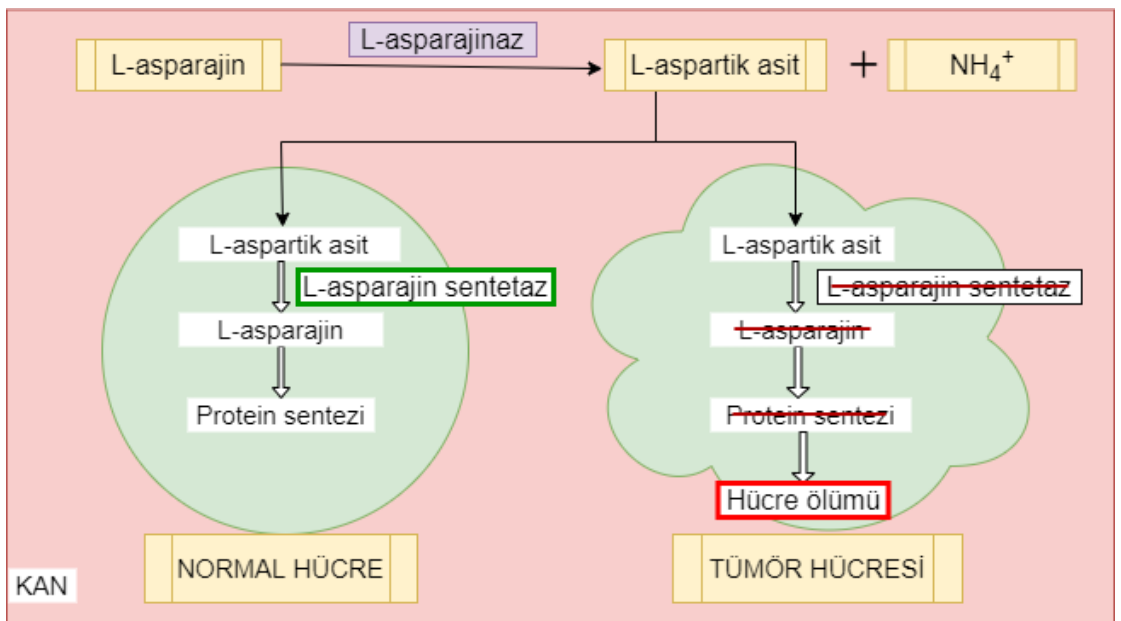
Bununla birlikte, pegilasyon işleminin dezavantajları da vardır: PEG-asparajinazına karşı anti-PEG-asparajinaz antikoru oluşabilmektedir. Anti-PEG-asparajinaz antikoru, asparajinaz aktivitesini nötralize ederek, ilacın etki süresini azaltır. Üretilen antikorumun alerjik reaksiyonlarla ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle aşırı duyarlılık reaksiyonları PEG-asparajinazın ana toksisitesi olmaya devam etmektedir. Aynı zamanda PEG moleküllerinin bir proteine bağlanması, proteinin etkileşim yeteneklerini veya aktif bölgelerini (L-asparajinaz) değiştirebilir. Tüm bunların yanında pegilasyon oldukça zaman ve maliyet gerektiren karmaşık bir işlemdir. Özellikle terapötik bir enzimle çalışılacaksa, ciddi bir enzim aktivite kaybı riski vardır. Bu sebeplerden dolayı PEG-asparajinazın diğer L-asparajinazlardan daha üstün olduğu kanıtlanmamıştır (El-Naggar et al., 2014). Ancak ALL tedavisinde çeşitli asparajinaz formlarının kullanılması (PEG-asparajinaz, doğal *E. coli* asparajinaz, *Erwinia* asparajinaz) anti-asparajinaz antikorumun nötralize edilmesine yardımcı olabilir (Fu and Sakamoto, 2007).

2.7. Sağlık Sektöründe L-Asparajinazın Kullanımı

2.7.1. Kanser tedavisinde L-asparajinaz

L-asparajinaz, anti-lösemik özellikleri nedeniyle, terapötik ilaç olarak kabul edilmiştir (Batool et al., 2016). Sağlık ve farmasötik araştırma alanlarında yaygın olarak araştırılan ve kullanılan bir antikanser ilacıdır (Muneer et al., 2020). L-asparajinaz, ALL, Hodgkin hastalığı, akut miyelositik lösemi, lenfosarkom tedavisi, kronik lenfositik lösemi, akut miyelomonositik lösemi gibi hastalıkların tedavisinde diğer ilaçlar ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır (El- Naggat et al., 2014).

L-asparajinazın anti-lösemik etkisi, tümör hücrelerinin büyümesi ve hayatta kalması için gerekli olan L-asparajini, aspartik asit ve amonyağa hidrolize etme kabiliyetine bağlıdır (Verma et al., 2007; Souza et al., 2017; Ali et al., 2018; Muneer et al., 2020). Tümör hücreleri, hızlı malign büyümelerine ayak uydurabilmek için fazla miktarda asparajine ihtiyaç duyar. Normal hücrelerin büyümesi için gerekli L-asparajin, bu hücrelerin ürettikleri L-asparajin sentetaz enzimi yardımıyla metabolik ihtiyaçlarını karşılayabilmek için yeterli miktarlarda sentezlenir. Ancak tümör hücreleri, L-asparajin sentetaz enzimi eksikliği nedeniyle L-asparajini sentezleyemez. Bu durum besin yetersizliği, protein sentezi inhibisyonu ve sonuçta apoptoz yoluyla lenfoblastik hücrelerin ölümüne yol açar (Şekil 2.2) (Souza et al., 2017; Ali et al., 2018).



Şekil 2.2. L-asparajinazın vücuttaki etki mekanizması

Günümüzde FDA onaylı akut lenfoblastik ve lenfosarkoma tedavisinde kullanılan ilaçlar 3 tiptir (Avramis and Panosyan, 2005; Asselin and Rizzari, 2015). Bunlardan ilki doğal *E. coli* türevli L- asparajinaz olarak Elspar®, Kidrolase®, ikincisi *E. coli* türevli L- asparajinazın polietilen glikol (PEG) ile kovalent bağlanması sonucunda oluşturulan Oncaspar® (Pegaspargase) üçüncüsü ise *E. chrysanthemi* türevli L-asparajinaz olarak kullanılan Crisantaspase® ve Erwinase®'dır (Avramis and Panosyan, 2005; Qeshmi et al., 2018; Chand et al., 2020; Muneer et al., 2020). *E. coli* türevli L-asparajinazın klinik olarak uzun süreli kullanımda aşırı duyarlılık, pankreatit, hiperglisemi, kan pıhtılaşma faktörlerinde bozulmalara neden olması sebebiyle her zaman istenilen sonuçlar elde edilememektedir (Muneer et al., 2020). Bu nedenle *E. coli* türevli L-asparajinaza aşırı duyarlılık gösteren hastalar için farklı immünojenikliğe sahip *E. chrysanthemi* türevli L-asparajinaz kullanılabilmektedir (Asselin and Rizzari, 2015). *E. coli* türevli L-asparajinazın polietilen glikol (PEG) ile kovalent bağlanması sonucunda oluşturulan ilaç olan Oncaspar® ise *E. coli* türevli L-asparajinaz olan Elspar®'a kıyasla daha yüksek plazma yarılanma ömrüne ve daha düşük immünojeniteye sahiptir (Avramis and Panosyan, 2005; Qeshmi et al., 2018). *E. chrysanthemi* türevli L-asparajinaz olan Crisantaspase® ve Erwinase® antikanser ilaçlarla kombinasyon şeklinde kullanılmaktadır. Bu L-asparajinazlar ALL tedavi protokollerinin bir parçası olarak radyoterapi veya kemoterapi ile birlikte kullanılır. *E. coli* türevli L-asparajinaz olan diğer ilaç Kidrolase® ise ALL, nonhodgkin lenfoma ve lösemik menenjitte kullanılmaktadır (Qeshmi et al., 2018; Chand et al., 2020).

Klinikte kullanılan L-asparajinaz bakteriyel kökenli ve nispeten büyük boyutlu olduğundan hastalarda yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Başlıca yan etkiler; anafaksi, karaciğer fonksiyonlarında bozulma, pankreatit, immun fonksiyon bozukluğu, diyabet, kafa içi tromboz ve ödem olarak sıralanabilir (Duval et al., 2002; Yadav et al., 2014; El-Shafei and El-Ghonemy, 2015; Ali et al., 2018; Fonseca et al., 2021). Aynı zamanda L-asparajinazın, glutaminaz ve üreaz aktivitelerinin olması da yan etkilere neden olmaktadır.

L-asparajinaz, asparajin hidrolizinin yanı sıra glutamin hidrolizine de neden olur (Shrivastava et al., 2016). L-asparajinaz tedavisi ile ortaya çıkan rahatsızlıkların çoğu L-asparajinazın glutaminaz aktivitesine dayandırılmaktadır (Nguyen et al., 2018; Ardalan et al., 2020). Ancak mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bazı çalışmalarda araştırmacılar glutaminaz aktivitesinin L-asparajinaz aktivitesini arttırdığı ancak yüksek glutaminaz aktivitesinin klinikte değerlendirilmesi sonucunda önemli ölçüde toksisite

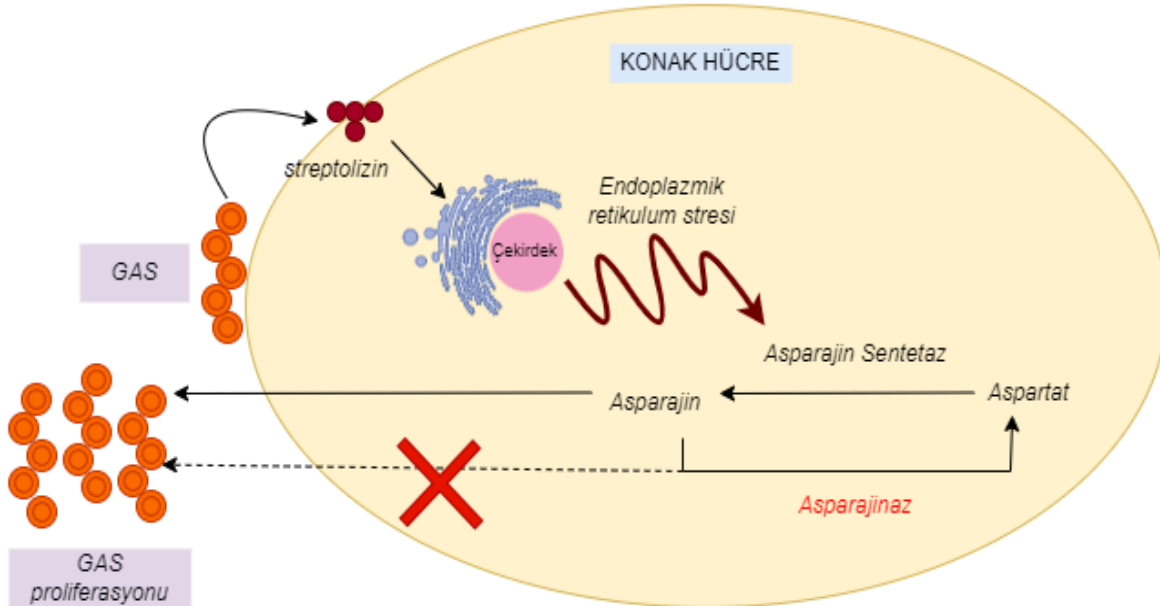
verdiği, glutaminin azalmasının aktiviteyi arttırmaktan çok toksisiteyi arttırdığı bunun da düşük terapötik tedaviye yol açtığını belirtmişlerdir (Reinert et al., 2006). L-glutaminin parçalanması ile ortaya çıkan ürün olan glutamat miktarının artması ekstrasvasküler sistemde ciddi strese neden olan yüksek glutamin akışına sebep olur (Prakash et al., 2020a; Prakash et al., 2020b; Freire et al., 2021). Ayrıca hem asparajin hem glutamin hidrolizi sonrası reaksiyonun yan ürünü amonyak üretilmektedir. Glutamin insan vücudunda en çok bulunan aminoasitlerden biridir. Glutaminin kandaki konsantrasyonu daha yüksek olduğundan amonyak konsantrasyonu üzerinde daha derin bir etkisi vardır. Klinikte L-asparajinaz tedavisi gören kişilerde hiperamonyemi gözlenmiştir (Nguyen et al. 2018). Enzimin üreaz aktivitesi, kanda bulunan ve toksik olan ürenin hidrolizine dolayısıyla kanda amonyak artışına yol açar. Bu durum hastalar üzerinde yan etkilere neden olur: hafif yan etkiler olarak sinirlilik, kusma ve baş ağrısı, şiddetli yan etkiler olarak ise nöbet, koma, ensefalopati ve ataksi gösterilebilir (Ashok et al., 2019; Chakraborty and Shivakumar, 2021). Üreazın birleşmesi ile meydana gelen bu yan etkilerin ortadan kaldırılması için ilave saflaştırma basamakları gerekmektedir (Ashok et al., 2019).

Yakın geçmişte (2018) meme kanseri üzerinde yapılan bir çalışmada; bir hastanın primer tümöründeki asparajin sentetaz ekspresyonunun daha sonra ortaya çıkan metastatik nüks ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. L- asparajinaz veya diyet asparajin kısıtlaması ile yapılan tedavi asparajin sentetazın etkisini inhibe ederek asparajin üretimini sınırlandırmıştır. Bu durum sonucunda primer tümörün büyümesi etkilenmemiş ancak metastazın azaldığı gözlemlenmiştir (Knott et al., 2018). Aynı zamanda yapılan bir diğer çalışmada L-asparajinazın yumurtalık kanser tedavisi için de kullanılabileceği önerilmiştir (Lorenzi et al., 2006).

İnsan tümörlerinin yanı sıra köpek ve kedi lenfomalarında da L- asparajinaz enzimi kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır. Köpek tümörleri sıklıkla yeniden nüksedebilmektedir. Bunun nedeni çoklu ilaç direncinin (MDR) gelişmesidir. Kombinasyon tedaviler ile MDR geciktirilebilir. L-asparajinaz tümörün remisyon (aktif kanser görülmediği durumlarda, hastalık var ama etkin değil) sürecini uzatmak için uygulanabilir (Vimal and Kumar, 2018).

2.7.2. Enfeksiyon hastalıklarında L-asparajinaz uygulamaları

Yapılan bir çalışma ile L-asparajinazın insan kanında Grup A *Streptococcus* (GAS) büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Başarılı bir enfeksiyon, patojenin konakçıdan besin kazanma yeteneğine bağlıdır. Hücre dışı patojen olan Grup A *Streptococcus* çok çeşitli insan hastalıklarına neden olmaktadır. Tipik olarak konağın boğazını ve cildini enfekte ederek, bakteriyemi, toksik şok sendromu, menenjit, romatizmal ateş, kızıl ateş, farenjit gibi hastalıklara neden olmaktadır (Baruch et al., 2014; Vimal and Kumar, 2017). Aynı zamanda tekrarlanan GAS enfeksiyonları, otoimmün benzeri hastalıklara neden olur. GAS konakçı hücreye yapıştığı zaman endoplazmik retikulumun strese girmesine neden olan streptolizin toksinlerini serbest bırakır. Bu durum asparajin sentetaz üretimiyle sonuçlanır böylelikle L-asparajin miktarında artış meydana gelir. Artan L-asparajin nedeniyle GAS'ın gen ekspresyonu yukarı regüle edilerek konakçıda ölümcül bir etkiye neden olan GAS proliferasyonu meydana gelir (Şekil 2.3). Bu nokta da patojenin çoğalmasını kontrol etmek için L-asparajinaz, serbest bırakılan L-asparajini parçalayarak durumu hafifletebilmektedir. Fare modelinde asparajinazın GAS proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Baruch et al., 2014).



Şekil 2.3. L-asparajinaz ile GAS proliferasyonunun inhibe edilme aşamaları

Başka bir çalışmada tıbbi olarak kullanılan şifalı ot olan *Amaranthus polygonoid* yapraklarından üretilen L-asparajinaz, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *A. niger*, ve *A. fumigatus* patojenleri üzerinde antioksidan ve antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Naveena et al., 2012).

2.7.3. Otoimmün hastalıklarda L-asparajinaz

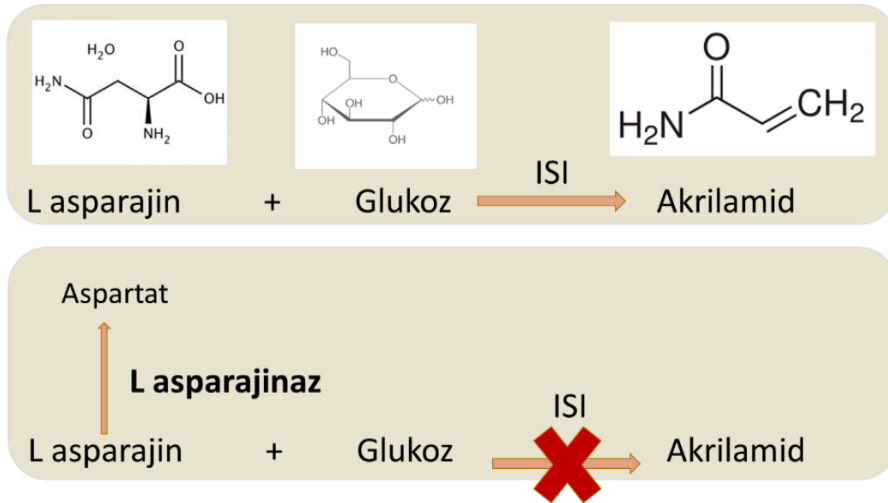
L-asparajinazın lenfatik sistem üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. T hücresi aracılı B hücre yanıtlarını baskılayabilmektedir. Dolayısıyla anormal T hücresi tepkileriyle ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanılabilir (Vimal and Kumar, 2017).

Romatoid artrit, vücut hücresi tarafından üretilen ve eklemlerde meydana gelen iltihaptır. İltihaplı dokuda makrofajlar, T hücreleri, B hücreleri, plazma hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücreler bulunmaktadır. Romatoid artritte T hücre aktivasyonu antijene özgül immün yanıtta oldukça önemlidir (Güvenç vd., 2018). Yapılan bir çalışmada L-asparajinazın artrit üzerinde etkisine bakılmak üzere farelerde kollajen ile indüklenen artrit modeli üzerinde çalışılmıştır. Bu farelerin *E. coli*'den doğal ve pegile L- asparajinaz ile muamele edilmesi sağlanmıştır ve enzimlerin farelerde artrit şiddetini etkili bir şekilde azalttığı gözlenmiştir (Reiff et al., 2001).

2.8. Diğer Uygulama Alanları

Gıda endüstrisinde uygulamaları: Beslenme, insan hayatının en temel ihtiyaçlardan birisidir. Dolayısıyla insanın beslenme ihtiyacının meydana getirdiği talep nedeniyle gıda sanayi dünyanın en büyük sanayilerinden birisi olmuştur. Nüfusun artmasıyla piyasadaki artan talep gıda sektöründe köklü değişiklikler meydana getirmiştir. Farklı formlarda ve ambalajlarda iyi işlenmiş ve korunmuş gıda maddelerinin sağlanması büyük bir çaba gerektirmektedir. Gıda maddelerinde kaliteyi etkileyen temel kimyasal reaksiyonlar gıdaların işlenmesi ve saklanması aşamalarında gerçekleştirilmektedir (Muneer et al., 2020). Gıdaların işlenmesi aşamasında bazı gıdalara 120°C'nin üzerinde sıcaklık uygulanır. Bu sıcaklık uygulaması indirgen şekerlerin ve nişasta esaslı gıdalarda bulunan serbest L-asparajinin reaksiyona girmesine neden olur. Maillard reaksiyonu olarak adlandırılan bu reaksiyon ile akrilamid oluşumu meydana gelir (Şekil 2.4) (El Naggar et al., 2014; Chand et

al., 2020). Akrilamid organizmaya alındığında hemoglobine bağlanarak anemi meydana getirmektedir (Yıldız vd., 2010). Aynı zamanda akrilamid, nörotoksindir ve insanlar için kanserojen madde olarak sınıflandırılmaktadır (Chand et al., 2020). Bu nedenle günlük olarak tüketilen bu ürünlerden alınacak akrilamid miktarı konusunda ciddi risk ve endişeler mevcuttur. Kızarmış patates cipsi, kek, çikolata, bebek tahılları (hazır), ekmek, kavrulmuş kahve, süt ürünleri ve bisküviler akrilamid içeren bazı gıda ürünlerindendir (Adebo et al., 2017; Muneer et al., 2020). Özellikle patates kızartması ve patates cipsi gibi gıdalarda yüksek miktarda akrilamid oluşumunun meydana geldiği bilinmektedir (Becalski et al., 2003). L-asparajinazın, L-asparajini hidroliz etme yeteneği sayesinde; L-asparajinaz uygulaması, nişastalı gıda maddelerinde bulunan L-asparajin miktarını azaltmanın potansiyel bir yoludur. Bu durum kanserojen ve toksik olan akrilamid oluşumunun önemli derecede azaltılmasına yardımcı olur (Friedman, 2003; Batool et al., 2016). Yapılan çalışmalarda gıdalar pişirilmeden ve kızartılmadan önce L-asparajinaz ile ön muamele edilerek akrilamid oluşumunda azalmalar meydana geldiği gösterilmiştir. Mikrobiyal L-asparajinaz kaynağı olarak *A. oryzae*, *A. niger*, *A. terreus*, *Fusarium culmarum*, *Bacillus likeniformus*, *Cladosporium* sp., *B. subtilis*, *Penicillium crustosum* kullanılarak akrilamid azaltma işlemleri gerçekleştirilmiştir (Hendriksen et al., 2009; Ravi and Gurunathan, 2018; Onishi et al., 2015; Meghavarman and Jankiraman, 2018; Mahajan et al., 2012; Chand et al., 2020; Khalil et al., 2021).

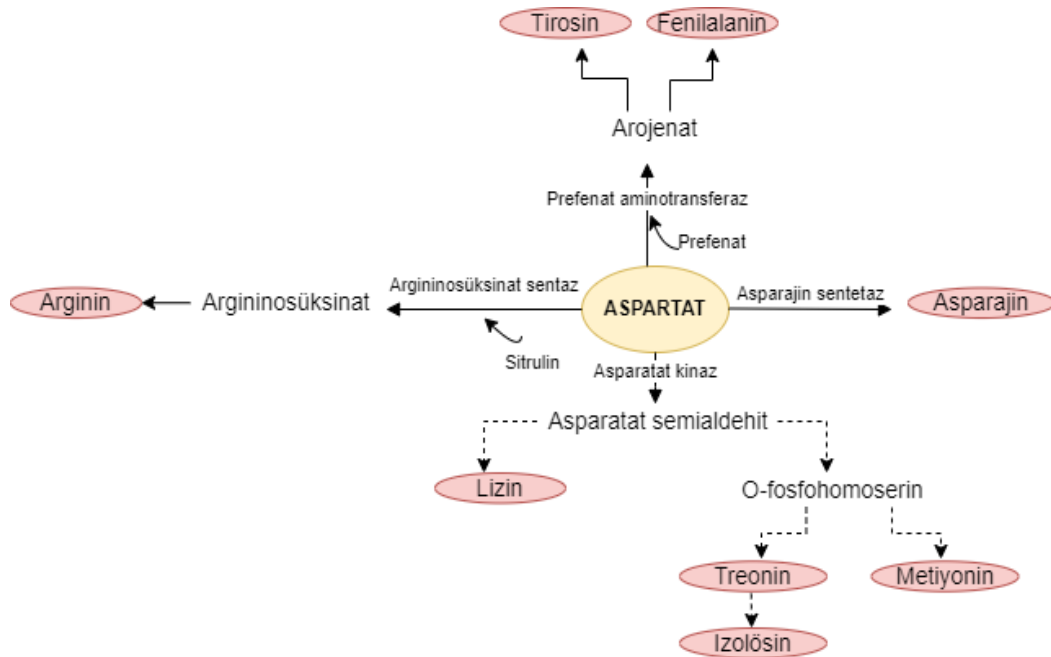


Şekil 2.4. L-asparajinaz enzimi ile akrilamid oluşumunun engellenmesi

Biyosensörlerin geliştirilmesi: L-asparajinaz biyosensörleri, lösemi tanısını koymak için geliştirilmektedir (Muneer et al., 2020). L-asparajinaz sadece sağlık endüstrisinde değil gıda endüstrisinde de asparajin seviyelerini analiz etmek için biyosensörlerin geliştirilmesinde

kullanılabilmektedir. L-asparajin için çeşitli analiz yöntemleri (X-ışınları kırınımı, Taramalı elektron mikroskobu, Geçirimli elektron mikroskobu) olsa da bu yöntemlerin maliyetlerinin ve iş yükünün fazla olması yöntemleri elverişsiz kılar. Bu nedenle biyosensör teknolojisinin kullanımı daha ucuz, güvenilir ve iş yükünün hafiflemesine yardımcı olabilir (Batool et al., 2016). Kumar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada lösemi tespiti için bitkisel L-asparajinazı tespit eden biyosensör geliştirilmiştir. L-asparajinaz stabilitesini arttırmak için jelatin, agaroz, agar ve kalsiyum aljinat gibi farklı immobilizasyon teknikleri kullanılmıştır. Bu tekniklerle normal ve lösemi serum örneklerinde asparajin tespiti gerçekleştirilmiştir (Kumar et al., 2013). Başka bir çalışmada L-asparajinaz biyosensörü gıdalarda oluşan akrilamid oluşumuna neden olan asparajin miktarının tespiti için meyve sularında kullanılmıştır (Kataria et al., 2015). Biyosensörlerin etki mekanizması immobilize L-asparajinaz aktivitesine bağlıdır. Asparajin hidrolizi ile oluşan amonyum iyonları ya floresan yoğunluğunda bir değişikliğe ya da renk ve absorpsiyonda değişime yol açan pH değişikliğine neden olur (Batool et al., 2016).

Aminoasitlerin biyosentezi/mekanizması: L-asparajinin L-asparajinaz ile parçalanması sonucunda amonyak ve aspartik asit (aspartat) oluşur. Aspartik asit lizin, treonin, metiyonin ve izolösin gibi aminoasitlerin biyosentezinde önemli bir rol oynar (Şekil 2.5). Dolayısıyla bu aminoasitlerin öncüsü olan aspartik asit, Krebs veya asparajinin hidrolizi sonucunda oluştuğu için L-asparajinaz bu amino asitlerin biyosentezinde büyük önem taşır (Batool et al., 2016; Qeshmi et al., 2018; Muneer et al., 2020).



Şekil 2.5.Bazı aminoasitlerin aspartattan biyosentezi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Mikroorganizmalar

Çalışmada Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Fungus Kültür Koleksiyonunda yer alan denizden izole edilmiş 94 adet filamentöz fungus izolatu kullanılmıştır. İzolatlara ait kodlar Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan fungus izolatlarına ait kodlar

MF5	MF36	MF64	MF95
MF10	MF37	MF65	MF96
MF12	MF38	MF66	MF97
MF13	MF39	MF67	MF98
MF13-B	MF40	MF68	MF99
MF14	MF42a	MF69	MF100
MF15	MF42b	MF70	MF101
MF16	MF43	MF71	MF104
MF17	MF43a	MF73	MF105
MF19	MF47	MF74	MF106
MF20	MF49	MF75	MF107
MF21	MF50	MF77	MF108
MF23	MF51	MF79	MF109
MF24	MF52	MF80	MF110
MF25	MF53	MF81	MF111
MF26	MF54	MF86	MF112
MF27	MF55	MF87	MF113
MF29	MF56	MF88	MF113-K
MF30	MF58	MF89	MF114a
MF31	MF59	MF90	MF115
MF32	MF60	MF91	MF116
MF33	MF61	MF92	MF117
MF34	MF62	MF93	
MF35	MF63	MF94	

3.1.2. Besiyerleri

Hazırlanan tüm besiyerleri aksi belirtilmedikçe 121°C’de (15 psi basınçta) 15 dakika süre ile otoklavlanarak steril edilmiştir.

- **Malt Ekstrakt Agar (MEA)**

Deniz kaynaklı fungus izolatlarının aktivasyonu ve aktifleştirilen izolatların stoklanması için litreye 48 g MEA (Merck, Almanya) besiyeri tartılarak tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış ve otoklavlanarak steril edilmiştir.

- **Patates Dekstroz Agar (PDA)**

Deniz kaynaklı fungus izolatlarının aktivasyonu ve aktifleştirilen izolatların stoklanması için litreye 37 g MEA (Merck, Almanya) besiyeri tartılarak tamamen çözülünceye kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmış otoklavlanarak steril edilmiştir.

- **Hızlı Plaka Tarama Yöntemi Besiyeri (L-asparajinaz, glutaminaz ve üreaz için)**

Deniz kaynaklı fungus izolatlarının L-asparajinaz, glutaminaz ve üreaz üretme potansiyelleri katı besiyerinde taranmıştır. Bunun için Tablo 3.2’de reçetesi verilen besiyeri kullanılmıştır (Ghasemi et al., 2008). L-asparajinaz hızlı taraması yapılırken substrat olarak L-asparajin (%1 w/v), L-glutaminaz hızlı taraması yapılırken substrat olarak L-glutamin (Himedia, TC243, Hindistan) (%1 w/v), üreaz için ise filtre edilmiş üre (Merck, 108487, Almanya) (%1 w/v) besiyerine aktarılarak besiyeri pH’ı 6,5 ayarlanmıştır.

Tablo 3.2. Hızlı plaka tarama yöntemi katı besiyeri içeriği

Kimyasal	Miktar
L-asparajin (Sigma, A0884, Almanya)	10 g/L
NaCl (Merck, 1.06404.1000, Almanya)	0,525 g/L
Glukoz (Sigma, 16301, Almanya)	1 g/L
KH ₂ PO ₄ (Merck, 1.04873, Almanya)	0,75 g/L
Agar (Sigma, 05039, Almanya)	15 g/L
Fenol red boyası (Carlo Erba, 476838, İspanya)	%0,001 (v/v)

- **L-Asparajinaz Fermantasyon Ortamı (LAF)**

Deniz kaynaklı fungus izolatlarının enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Tablo 3.3’de verilen besiyeri kullanılmıştır (Da Cunha et al., 2021). pH 7’ye ayarlanmıştır.

Tablo 3.3. L-asparajinaz fermantasyon ortam içeriği

Kimyasal	Miktar (g/L)
Laktoz (Sigma, 1.07657, Almanya)	29
L-asparajin (Sigma, A0884, Almanya)	29
Kazein hidrolizat (Fluka, 22090, İsviçre)	7
KH ₂ PO ₄ (Merck, 1.04873, Almanya)	1,52
KCl (Merck, 1.04936, Almanya)	0,52
MgSO ₄ (Merck, 1.05886, Almanya)	0,52
CuSO ₄ .3H ₂ O (Merck, 1.02790, Almanya)	0,01
ZnSO ₄ .7H ₂ O (Merck, 1.08883, Almanya)	0,01
FeSO ₄ .7H ₂ O (Merck, 1.03965, Almanya)	0,01

3.1.3. Çözeltiler ve tamponlar

- **10 M NaOH çözeltisi**

10 M’lık NaOH çözeltisi hazırlamak için 100 g NaOH (Merck, 106498, Almanya) 250 mL destile su içerisinde çözdürülmüştür.

- **1 M HCl çözeltisi**

250 mL 1 M’lık HCl (Isolab, 932.103.2500, Almanya) çözeltisi hazırlamak için 20 mL destile su schott şişesine alınarak üzerine 20,7 mL HCl eklenmiştir. Daha sonra 250 mL' ye destile su ile tamamlanmıştır.

- **Fenol kırmızısı**

40 ml fenol red hazırlamak için 0,8 g fenol red tartılıp 40 mL destile suda çözdürülmüştür.

- **1,5 M Trikloroasetik asit (TCA) çözeltisi**

1,5 M TCA (Carlo Erba, CE.411525, İspanya) çözeltisinden 50 mL hazırlamak için, 12.254 g TCA tartılarak 50 mL destile su ile çözündürülmüştür. Solüsyon +4°C'de saklanmıştır. Bu çözelti enzim aktivite tayininde kullanılmıştır.

- **0,05 M Fosfat tamponu (pH 6)**

0.05 M (pH 6) 1000 mL fosfat tamponu hazırlamak için 1,835 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, 1.06580, Almanya) ve 5,955g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Horasan Kimya, Türkiye) tartılarak 800 mL destile su içerisinde çözülerek pH'ı NaOH çözeltisi ile 6'ya ayarlanmıştır. Ardından hacim 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Bu tampon enzim aktivite tayininde kullanılmıştır.

- **0,04 M L-asparajin çözeltisi**

0,04 M 10 mL L-asparajin çözeltisi hazırlamak için 53 mg L-asparajin tartılmış ve 10 mL 0,05 M (pH 6) fosfat tamponu içinde çözündürülmüştür. Taze hazırlanarak kullanılmıştır. Bu çözelti L-asparajinaz enziminin aktivite tayininde substrat olarak kullanılmıştır.

- **0,04 M glutamin çözeltisi**

0,04 M 10 mL glutamin çözeltisi hazırlamak için 58,5 g glutamin (Himedia, TC243, Hindistan) tartılmış ve 10 mL 0,05 M (pH 6) fosfat tamponu içinde çözündürülmüştür. Taze hazırlanarak kullanılmıştır. Bu çözelti glutaminaz enziminin aktivite tayininde substrat olarak kullanılmıştır.

- **0,04 M üre çözeltisi**

0,04 M 10 mL üre çözeltisi hazırlamak için, 24 mg üre (Merck, 108487, Almanya) tartılmış ve 10 mL 0,05 M (pH 6) fosfat tamponu içinde çözündürülmüştür. Taze hazırlanarak kullanılmıştır. Bu çözelti üreaz enziminin aktivite tayininde substrat olarak kullanılmıştır.

- **Amonyum sülfat çözeltisi**

10 mM stok amonyum sülfat (Merck, 1.01217, Almanya) çözeltisi hazırlanmıştır. 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,2 mM ve 0,1 mM konsantrasyonlarında seyreltmeler yapılarak standart eğri oluşturulmuştur.

- **%30 Akrilamid Çözeltisi**

30 gram akrilamid (Merck, A8887, Almanya) ve 0.8 gram N’N’-bis-metilen-akrilamid (Sigma, 146072, Almanya) 100 mL destile su ile çözündürülmüştür. +4°C’de karanlıkta saklanmıştır. Bu çözelti sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) kullanılmıştır.

- **%10 (w/v) SDS**

50 g SDS (Bio-Rad, 1610327, Amerika) 450 mL destile su içinde çözündürülmüştür. Ardından 500 mL’ye tamamlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Bu çözelti SDS-PAGE’de kullanılmıştır.

- **%10 (w/v) Amonyum persülfat çözeltisi (APS)**

0.1 g APS (Bio-Rad, 1610700, Amerika) 1 mL ultra saf su içinde çözündürülmüştür. Taze olarak hazırlanmış ve SDS-PAGE’de kullanılmıştır.

- **N,N,N’,N’ Tetramethylethylenediamine (TEMED)**

TEMED (Sigma, Almanya) 6.63 M stok çözeltisi, SDS-PAGE’ de kullanılmıştır.

- **Ayırma Tamponu**

1.5 M Tris- HCl için 18.17 g Tris base (Merk, 1.08382, Almanya) 100 mL’de çözündürülerek pH 8.8’e ayarlanmış ve +4°C’de saklanmıştır. Bu çözelti SDS-PAGE’de kullanılmıştır.

- **Yükleme Tamponu**

0.5 M Tris-HCl için 6,09 g Tris base (Merk, 1.08382, Almanya) 100 mL’de çözündürülerek pH 6.8’ e ayarlanmış ve +4°C’de saklanmıştır. Bu çözelti SDS-PAGE’de kullanılmıştır.

- **Yürütme Tamponu**

6,04 g Tris base (Merk, 1.08382, Almanya), 28,8 g glisin (AppliChem, A1067, Almanya) 2 g SDS 2000 mL destile suda çözündürülmüştür ve +4°C’de saklanmıştır. Bu çözelti SDS-PAGE’de kullanılmıştır.

- **Örnek Yükleme Tamponu**

Örnek yükleme tamponu içeriği Tablo 3.4'te verilmiştir. Hazırlanan tampon SDS-PAGE'de kullanılmış ve +4°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.4. Örnek yükleme tamponunun içeriği

Kimyasal	Miktar (mL)
Destile su	3,55
1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25
Gliserol (Sigma, Almanya)	2
% 10 SDS	2,0
% 0,1 bromofenol blue	2
2-merkaptoetanol	2

- **Ayırma jeli (Alt)**

SDS-PAGE için farklı yüzdelerde ayırma ve düzenleyici jellerin hazırlanmasında Tablo 3.5'de verilen değerler kullanılmıştır. Ayırma jeli hazırlanırken APS ve TEMED en son eklenmiştir. TEMED ekleme işlemi çeker ocakta yapılmıştır.

Tablo 3.5. Ayırma jelinin içeriği

Kimyasallar	Miktar
Ultra saf su (mL)	3,353
Ayırma Tamponu (mL)	2,5
% 30 akrilamid solüsyonu (mL)	4
% 10 SDS (mL)	0,1
% 10 APS (µL)	50
TEMED (µL)	5

- **Yükleme jeli (Üst)**

SDS-PAGE için farklı yüzdelerde ayırma ve düzenleyici jellerin hazırlanmasında Tablo 3.6' de verilen değerler kullanılmıştır. Yükleme jeli hazırlanırken APS ve TEMED en son eklenmiştir. TEMED çeker ocak içerisinde eklenmiştir.

Tablo 3.6.Yükleme jelinin içerik ve miktar listesi

Kimyasallar	Miktar
Ultrasaf su (mL)	3
Yükleme Tamponu (mL)	1,26
% 30 akrilamid solüsyonu (mL)	0,66
% 10 SDS (mL)	50
% 10 APS (μ L)	25
TEMED (μ L)	5

- **Jel Boyası (Stain)**

0,25 g Coomassie Brilliant Blue (Fluka, Almanya), 100 mL glasiyel asetik asit (Riedel, Almanya), 450 mL metanol (Sigma, Almanya) ve 450 mL destile su ile hazırlanmıştır. Bu çözelti SDS-PAGE’de kullanılmıştır.

- **Destain Çözeltisi**

%10 (v/v)’luk metanol (Merck), %10 (v/v)’luk asetik asit (Riedel, Almanya) karışımından oluşmuştur. Bu çözelti SDS-PAGE’de kullanılmıştır.

- **0,05 M Glisin-HCl tamponu (pH 3)**

0.05 M (pH 3) 100 mL glisin-HCl tamponu hazırlamak için 0,38 g glisin (AppliChem, A1067, Almanya) tartılarak 80 mL destile su içinde çözülmüştür. pH HCl yardımıyla 3’e ayarlanmıştır. Ardından hacim 100 mL’ye tamamlanmıştır. Bu tampon optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

- **0,05 M Sodyum asetat tamponu (pH 4)**

0.05 M (pH 4) 100 mL sodyum asetat tamponu hazırlamak için 93 mg sodyum asetat (Merck, 106267, Almanya) tartılarak 80 mL destile su içinde çözülmüştür. Üzerine 93 μ L asetik asit (Merck, 100063, Almanya) eklenerek hacim 100 mL’ye tamamlanmıştır. Bu tampon optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

- **0,05 M Sodyum asetat tamponu (pH 5)**

0.05 M (pH 5) 100 mL sodyum asetat tamponu hazırlamak için 276 mg sodyum asetat (Merck, 106267, Almanya) tartılarak 80 mL destile su içinde çözülmüştür. Üzerine 220 μ L

asetik asit (Merck, 100063, Almanya) eklenerek hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu tampon optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

- **0,05 M Sodyum fosfat tamponu (pH 7)**

0.05 M (pH 7) 50 mL fosfat tamponu hazırlamak için 0,257 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, 1.06580, Almanya) ve 0,165 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Horasan Kimya, Türkiye) tartılarak 40 mL destile su içerisinde çözülerek pH NaOH çözeltisi ile 7'ye ayarlanmıştır. Ardından hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır. Bu tampon optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

- **0,05 M Tris-HCl tamponu (pH 8)**

0,05 M (pH 8) 100 mL Tris HCl (Sigma, S.T5941, Almanya) çözeltisi hazırlamak için, 80 mL destile su içerisinde 0,432 g Tris HCl ve 0,273 g Tris base (Merk, 1.08382, Almanya) çözündürülerek hacim destile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu tampon optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

- **0,05 M Tris-HCl tamponu (pH 9)**

0,05 M Tris-HCl tamponu hazırlamak için 0,51g Tris HCl (Sigma, S.T5941, Almanya) ve 0,567 g Tris base (Merk, 1.08382, Almanya) tartılarak 80 mL destile suda çözündürülmüştür. Ardından hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu tampon optimum pH ve pH stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.1.4. Cihazlar

Cihaz	Marka
Buzdolabı +4 °C	Vestel, S-6450B
Derin dondurucu -20°C	Vestel, FT-280
Mikroplate okuyucu	BioTek, Winooski, ELx800UV
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng ZHWY-2112B
Hassas Terazi	Shimadzu, ATX224
Hot Plate ve Manyetik Karıştırıcı	Dahian Scientific MSH-20A
İnkübatör Cihazı	Memmert IN450
Laminar Akışlı Kabin (BSL-2)	Nuaire, NU-425-400E

Mikrodalga Fırın	Arçelik, MD 574s
Mikropipet	Brand Transferpette
Mikro Santrifüj	Hettich, D59302
Mikroskop	Olympus
Otoklav	Hirayama, HG-80,85,1 L
Peristaltik Pompa	Masterflex, 77200-62
pH Metre	Hanna HI 2211
Santrifüj	Hettich, Universal 32R
Su Banyosu	GFL 10988504J
SDS-PAGE jel elektroforezi	VMR
Vortex Cihazı	VMR International 041026366
Ultrafiltrasyon cihazı	Sartorius, 17525-01
Ultrafiltrasyon membranı	Sartorius, Sartocon Slice 200
Sonikatör	Bandelin, Sonopuls
Etüv	Memmert
Güç kaynağı	VMR 300V
İnkübatör (Hayvan Hücre Kültürü)	Esco, CCL-170B-8-2017-117325
Floresan Mikroskobu	Zeiss Axio Vert A1

3.2. Yöntem

3.2.1. Deniz kaynaklı fungus izolatlarının aktivasyonu ve çalışma stokları

Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Fungus Kültür Koleksiyonunda yer alan denizden izole edilmiş 94 adet fungus izolatı, içerisinde MEA ve PDA besiyeri bulunan petrilere öze yardımı ile üç nokta şeklinde inoküle edilmiştir. Ardından petrilere 28±2°C’de 7-10 gün inkübe edilmiştir. Aktifleştirilen izolatlar, içerisinde MEA ve PDA besiyeri bulunan yatık agarlara öze yardımı ile aseptik koşullar altında inoküle edilmiş ve 28±2°C’de 7-10 gün inkübasyonun ardından +4°C’de çalışma stokları olarak saklanmıştır.

3.2.2. Hızlı plaka tarama yöntemi (yarı kantitatif analiz)

Fungus izolatlarının L-asparajinaz, glutaminaz ve üreaz enzimlerini üretip üretmediğini belirlemek amacıyla hızlı plaka yöntemi 24 kuyulu plakalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Besiyerinde kullanılan pH indikatörü (fenol kırmızısı) nedeniyle enzim aktivitesi sonrası oluşan amonyağa bağlı olarak besiyeri renginin sarıdan pembeye dönüşmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

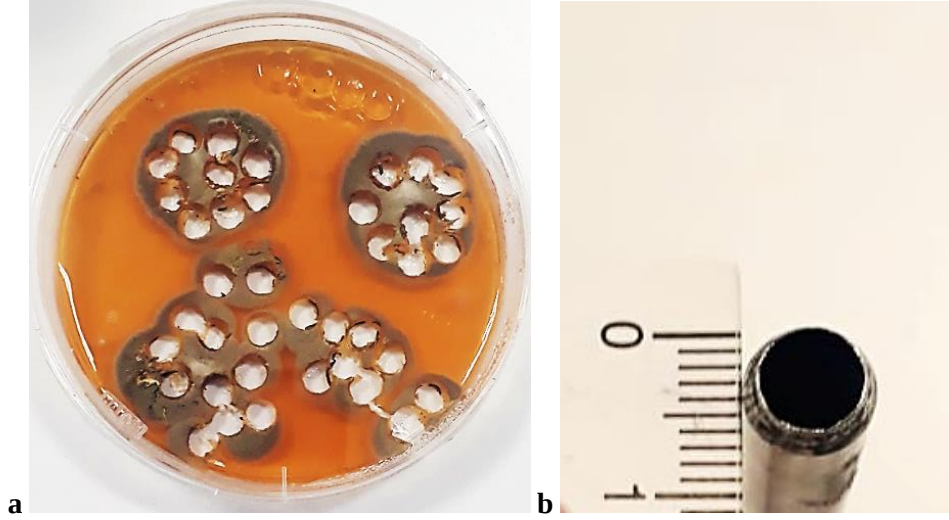
L-asparajinazın hızlı taranması amacıyla deniz kaynaklı funguslar yatık agar içerisinden steril öze yardımıyla alınarak, Tablo 3.2’de içeriği yazılmış besiyerine nokta ekimi yapılmıştır. $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ’de 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. Ardından L-asparajinaz üretici türlerin glutaminaz ve üreaz aktiviteleri, her bir enzime ait ilgili substrat ile aynı yöntem kullanılarak 24 kuyulu plakalarda taranmıştır.

Tarama çalışmasının ikinci aşamasında L-asparajinaz güçlü pozitif ancak glutaminaz ve üreaz negatif veya zayıf izolatlar için yarı kantitatif bir sonuç elde edebilmek için aynı tarama yöntemi petrilere gerçekleştirilmiş, zon ve koloni çapları ölçülerek zon/koloni oranları aşağıda verildiği şekilde hesaplanarak zon indeksleri belirlenmiştir. İzolatlar deniz kaynaklı olduğundan seçilen aday izolatlar için bu işlem deniz suyu içeren besiyerleri kullanılarak tekrarlanmıştır.

$$\text{Zon İndeksi} = \frac{\text{Zon çapı (mm)}}{\text{Koloni çapı (mm)}}$$

3.2.3. Küçük ölçek fermantasyon çalışmaları

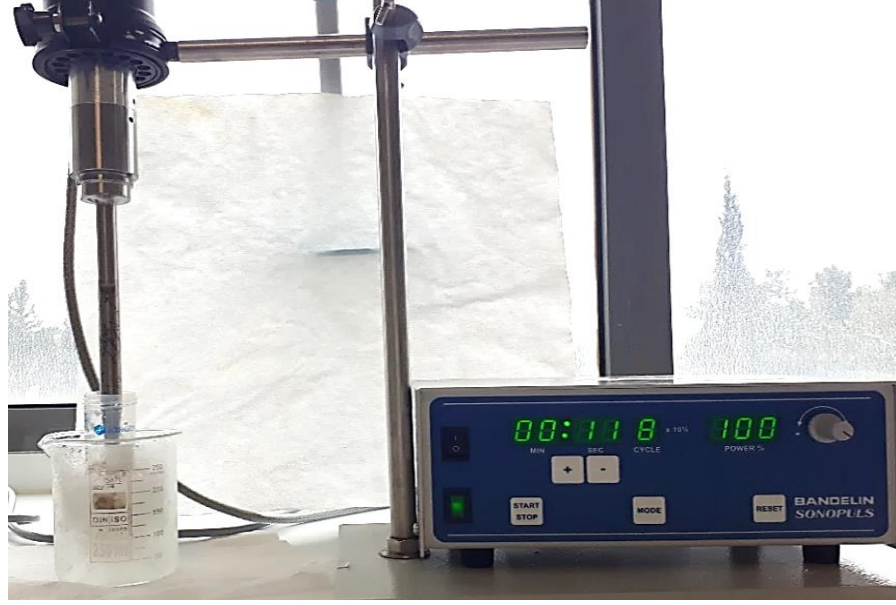
MEA besiyerinde aktifleştirilen deniz kaynaklı fungus izolatları, içerisinde 50 mL L-asparajinaz fermantasyon ortamı (Bölüm 3.1.2’te anlatılmış) bulunan 250 mL’lik erlenlerde büyütülmüştür. Fermantasyon ortamının aşılmasında petride büyütülen kültürden 5 mm çapında parçalar (Şekil 3.1) alınarak inokülasyon yapılmış ve 3 gün $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ’de, 100 rpm hızındaki çalkalayıcıda inkübe edilmiştir (Da Cunha et al.,2021). Enzim aktivitesi ölçümü için her gün fermantasyon ortamından aseptik koşullar altında 1 mL örnek alınmıştır.



Şekil 3.1. a) Aşılama için besiyeri yüzeyinden alınan parçalar, b) Beş mm çapındaki parçaların alınmasında kullanılan aparat

İnkübasyon sonrasında hem hücre içi hem de hücre dışı enzim aktivitesi varlığını belirlemek için miseller fermantasyon ortamından ayrılmıştır. Bu işlem steril Whatmann filtre kağıdı içeren huniler yardımıyla alev başında aseptik koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Ardından 10000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiş ve üstsıvı hücre dışı enzim aktivitesi ölçümünde kullanılmıştır.

Hücre içi enzim aktivitesi için toplanan miseller önce fermantasyon sıvısının uzaklaştırılması için iki kez steril destile sudan geçirilip yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra 10000 rpm de 4°C’ de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek üst kısım uzaklaştırılıp miseller toplanmıştır. Yıkanan miseller, fosfat tamponu içerisine alınmıştır. 6,5 g misele 15 mL tampon eklenecek şekilde tartım yapılmıştır. Ardından sonikatörde %40 titreşim genliğinde, 60 saniye 3-8 döngü, 70W koşullarında parçalama işlemi yapılmıştır (Şekil 3.2) (Costa-Silva et al., 2018). Yeniden 10000 rpm’de 4°C’de 20 dakika santrifüjlenerek, toplanan üstsıvı hücre içi enzim aktivite ölçümünde kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Sonikasyon işleminden bir görüntü

3.2.4. L-asparajinaz aktivite tayini

L-asparajinaz enziminin aktivitesi serbest kalan amonyak miktarının ölçülmesine dayanan yöntem olan Nesslerizasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem kullanılarak hem hücre içi hem hücre dışı enzim aktiviteleri ölçülmüştür.

Enzim aktivitesinde; 60 μ L L-asparajin (0,04 M), 96 μ L fosfat tamponu (0,05 M, pH 6) ve 24 μ L enzim çözeltisi 40°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından reaksiyonu durdurmak için 60 μ L TCA (1,5 M) eklenmiştir. 4000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra, 15 μ L üstsıvıdan alınarak üzerine 15 μ L Nessler’s reaktifi (Isolab, 951.02P, Almanya) ve 120 μ L destile su eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ölçüm için 150 μ L 96 kuyulu plakalara alınarak 450 nm dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Kör olarak enzim çözeltisi TCA ile durdurularak kullanılmıştır. Bir Unit L-asparajinaz aktivitesi 40°C’de 1 dakikada 1 μ mol amonyak hidrolize eden enzim miktarı olarak tanımlanır (Dias and Sato, 2016). Tüm ölçümler en az 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Enzim aktivite tayininde kullanılmak amacıyla amonyum sülfat ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Amonyum sülfat su ile reaksiyona girdiğinde 2 mol NH_3 iyonu oluşmaktadır. Hazırlanan 10 mM amonyum sülfat stok çözeltisinden sırasıyla 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4 ve 8 mM konsantrasyonlarında seyreltmeler yapılarak kalibrasyon eğrisi

oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi grafiği denklemi kullanılarak salınan NH_3 miktarı belirlenmiştir. Enzim aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Unit/mL enzim} = \frac{\text{salınan } \text{NH}_3 \text{ miktarı} \cdot V1}{V2 \cdot T \cdot V3}$$

V1= Aktivite tayininde kullanılan toplam hacim (ml)

V2= Final enzim hacmi (ml)

T= Aktivite tayini süresi (dakika)

V3= Kullanılan fermentasyon sıvısı hacmi (ml)

3.2.5. Glutaminaz aktivite tayini

Glutaminaz aktivitesi Bölüm 3.2.4'te anlatılan L-asparajinaz aktivite yöntemi ile belirlenmiştir. Substrat olarak 0.04 M asparajin yerine 0.04 M glutamin kullanılmıştır.

3.2.6. Üreaz aktivite tayini

Üreaz aktivitesi Bölüm 3.2.4'te anlatılan L-asparajinaz aktivite yöntemi ile belirlenmiştir. Substrat olarak 0.04 M asparajin yerine 0.04 M üre kullanılmıştır.

3.2.7. Toplam protein tayini ve spesifik enzim aktivitesi

Her aşamada toplam protein tayini Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. Standart grafik 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45 ve 0,5 mg/mL konsantrasyonlarda Bovine Serum Albumin (BSA) (Merck, 1.12018, Almanya) ile hazırlanmıştır. Protein tayin yönteminin adımları;

- Protein tayini için örneklerden 10 μL alınarak 96'lık mikro plaka kuyucuklarına pipetlenmiştir.
- Her örneğin üzerine 200 μL Bradford reaktifi (Merck, 1.10306, Almanya) eklenmiştir (Bradford, 1976).
- 10 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir.
- Reaksiyona ait renk değişimi 595 nm dalga boyunda okutulmuştur.

Kör olarak örnek yerine fermantasyon ortamı kullanılmıştır. Enzim aktivitesi ve protein tayini hesaplamalarının ardından spesifik enzim aktivitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{spesifik enzim aktivitesi} = \frac{\text{toplam enzim aktivitesi (U)}}{\text{toplam protein miktarı (mg)}}$$

3.2.8. Enzimin kısmi saflaştırılması

3.2.8.1. Ultrafiltrasyon

Bölüm 3.1.2’de reçetesi verilen L-asparajinaz fermantasyon ortamı kullanılarak 100 rpm, 28±2°C’de 3 gün boyunca gerçekleştirilen inkübasyon sonrası toplanan 150 mL fermantasyon ortamı 10 kDa membran (Sartorius, Sartoclon Slice 200) kullanılarak ultrafiltrasyon işlemiyle +4°C’de konsantre edilmiştir (Şekil 3.3). Konsantre edilen fermantasyon sıvısı ardından santrifugal filtre (Vivaspin 20 Sartorius, 10 kDa) kullanılarak 5000 rpm’de 45 dakika santrifüjlenmiş ve hacim daha da azaltılmıştır.



Şekil 3.3. Ultrafiltrasyon işleminden bir görüntü

3.2.8.2. Aseton ile çöktürme işlemi

Konsantre edilen fermentasyon sıvısının içerdiği proteinlerin ayrılması için aseton ile çöktürme işlemi yapılmıştır. Bunun için -20°C’de soğutulan aseton 1:1 oranında enzim çözeltisi ile karıştırılmıştır. Aseton enzim çözeltisi üzerine yavaş yavaş eklenmiş, işlem buz üzerinde gerçekleştirilmiş ve 30 dakika bekletilmiştir. Ardından numune 13000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiş ve dibe çöken protein pelletine dikkat ederek üstsıvı ayrı bir falkona alınmıştır. Bu üstsıvıya protein tayini yapılarak gerekliyse bu kısma yukarıdaki basamaklar yeniden uygulanmıştır. Pelletler üzerinde kalan asetonun buharlaşması için pelletler fazla kurutulmadan oda sıcaklığında bekletilmiş ve santrifüjde 1 dakika döndürülerek asetonun uçması sağlanmıştır. Son olarak pellet en az hacimle (1,5 mL) fosfat tamponu (pH 6) ile çözündürülmüştür.

3.2.9. L-Asparajinaz kısmi karakterizasyonu

3.2.9.1. Optimum sıcaklık

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi 20, 30, 37, 40, 50, 60 ve 70°C aralığındaki sıcaklıklarda enzim aktivite prosedürü uygulanarak test edilmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.2. Termal stabilite

Termal stabilitenin belirlenmesi amacıyla, enzim 20, 30, 37, 40, 50 ve 60 °C arasında değişen sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından standart koşullarda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Kontrole göre rezidüel aktivite (% bağıl aktivite) değeri belirlenmiştir. Ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.3. Optimum pH

pH'nın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi farklı tampon sistemleri kullanılarak test edilmiştir. Bunun için glisin-HCl tamponu (50 mM, pH 3) asetat tamponu (50 mM, pH 4-5) fosfat tamponu (50 mM, pH 6-7) ve Tris HCl tamponu (50 mM, pH 8-9) kullanılmıştır. Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.4. pH stabilitesi

Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi amacıyla, enzim pH 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 aralığında 1 saat +4°C’de inkübe edilmiştir. Ardından standart koşullarda enzim aktivitesi ölçülmüştür. Kontrole göre rezidüel aktivite (% bağıl aktivite) değeri belirlenmiştir. Tüm ölçümler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.9.5. SDS-PAGE

SDS-PAGE prosedürü Laemmli metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Laemmli, 1970). Bu yöntem proteinlerin molekül ağırlıklarının saptanmasında kullanılmaktadır (Şekil 3.4). Yöntem için gerekli olan kimyasallar Bölüm 3.1.3’te verilmiştir. Uygulanan adımlar aşağıdaki gibidir:

Jelin hazırlanması

- SDS-PAGE için kullanılan cam parçalar yıkanıp iyice kurulanmış ardından üzerlerinde leke kalmaması için izopropil alkol ile silinmiştir.
- Düzeneğin camları ve kasetleri uygun şekilde birleştirilerek SDS-PAGE düzeneği kurulmuştur.
- Ardından Bölüm 3.1.3’de anlatıldığı üzere hazırlanan ayırma jeli mikropipet yardımıyla tek noktadan yavaş yavaş doldurulmuştur. Jelin katılaşması için 20 dakika beklenmiştir.
- Ayırma jeli katılaştıktan sonra yükleme jeli Bölüm 3.1.3’de anlatıldığı üzere hazırlanmış ve dikkatli bir şekilde donan ayırma jeli üzerine doldurulmuştur.
- Elektrik bağlı sisteme yerleştirilen düzeneğin iki kasetinin arasındaki boşluktan başlanarak tampon doldurulmuştur. Ardından tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır.

Örneklerin hazırlanması ve jelde yürütülmesi

- Bradford yöntemiyle belirlenen protein konsantrasyonlarına göre örnekler Eppendorf tüplerine alınıp çeker ocak içerisinde üzerlerine örnek hacmi kadar β -merkaptöetanol boyası eklenmiştir. Ardından 5 dk kaynar suda bekletilmiştir.

- Daha sonra örnekler 9000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenmiş ve kuyucuklara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Bu aşamada protein markör de yüklenmiştir.

- Düzeneğin kapağı kapatılıp güç kaynağına bağlanarak 2.5 saat 80 V’luk sistemde yürütülmüştür.

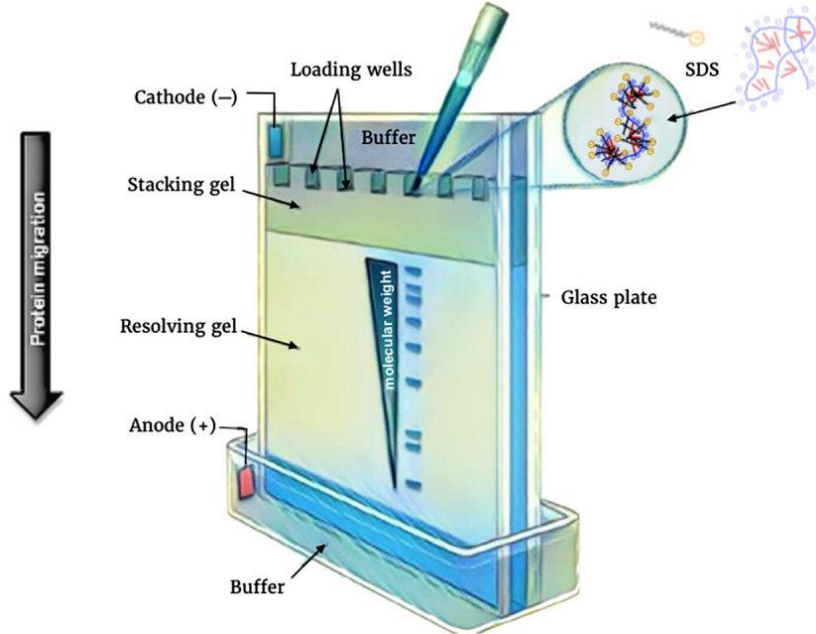
- Yürütmenin ardından tampon boşaltılarak kaset vidaları çıkarılmış ve jel dikkatlice camdan ayrılmıştır.

Jelin boyanması ve yıkanması

- Kasetten çıkarılan jel bir kaba alınmış çeker ocak içerisinde üzerine stain boyası eklenerek çalkalayıcıda 50 rpm’de 30 dk boyunca bekletilmiştir. Boya, jeldeki proteinlerin pozitif yükleri ile etkileşime girerek proteinleri mavi renge boyamıştır.

- Çalkalayıcıdan alınan boyalı jel birkaç kez destile su ile yıkanmış ve üzerine boyanın fazlasının uzaklaştırılması için destain eklenmiştir.

-Jel, çalkalayıcıda 50 rpm’de bir gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra jel floresan aydınlatmalı cam üzerinde görüntülenmiştir.



Şekil 3.4. SDS-PAGE uygulaması (Wangler and Bellen, 2017)

3.2.10.Sitotoksisite analizi (MTT Testi)

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid – metil thiazol tetrazolium) testi ile L-asparajinazın *in vitro* sitotoksitesi belirlenmiştir (Mosmann, 1983). Sarı renkli formazan tuzu olan MTT, çoğalan hücrelerin mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesi ile suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Kristaller dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözülerek hücre canlılığı spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. ISO 10993-12 standardına göre yapılan testte hücre canlılığının %30'dan fazla azalması sitotoksik etki olarak kabul edilmektedir. Uygulanan adımlar aşağıdaki gibidir:

Hücrelerin çözündürülmesi

SH-SY5Y (insan nöroblastom hücre hattı), HaCaT (Keratinosit hücre hattı) ve L929 (Fibroblast hücre hattı) hücre hatları, DMEM HG (Dulbecco's modified Eagle's medium, 4,5 g/L glikoz, Gibco, İngiltere) besi ortamı, %10 (v/v) inaktif fetal sıgır serumu (FBS; Biochrom, Almanya), %1 (v/v) L-glutamin (Biochrom, Almanya) ve %0,1 (v/v) penisilin/streptomisin ile kültive edilmiş ve çoğaltılmıştır. LNCaP (insan prostat kanser hücre hattı) ise RPMI 1640 (Gibco, İngiltere) besi ortamı, %10 (v/v) inaktif fetal sıgır serumu (FBS; Biochrom, Almanya), %1 (v/v) L-glutamin (Biochrom, Almanya) ve %0,1 (v/v) penisilin/streptomisin ile kültive edilmiş ve çoğaltılmıştır.

Ege Biyomalzemeler ve 3 Boyutlu Biyoarafazlar Laboratuvarı stoklarında bulunan hücreler sıvı azot tankından (-196°C) alınarak 37°C'deki su banyosu içerisinde çözünene kadar bekletilmiştir. Çözünmüş olan dondurma tüpü (kryovial) laminar kabin içerisine alkolle silinerek alınmıştır. Hücrelerin üzerine 2 mL besi ortamından eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. Ardından santrifüj tüpüne alınan hücreler 1000 rpm'de +4°C 5 dakika santrifüjlenmiştir. Tüpün içerisindeki üstsıvı pipetle çekilerek uzaklaştırılmış ve hücrelerin üzerine taze besi ortamı eklenerek nazikçe pipetaj yapılmıştır. Ardından etiketlenen flaska alınmış, 37°C'de, %5 CO₂ içeren %95 nemli ortamda inkübe edilen hücreler 24 saat sonra morfolojileri ve yüzeye tutunma oranları ters-faz mikroskop (Olympus, Japonya) ile değerlendirilmiştir. Hücreler *in vitro* deneyler öncesinde 2 günde bir ortam değiştirilerek, %70-80 konfluensiye ulaştığında pasajlanmıştır.

Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması

Hücrelerin üzerinde bulunan eski besi ortamı çekilerek hücrelerin yüzeyi Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından hücrelerin üzerine %0,05'lik tripsin-EDTA (HyClone, USA) eklenmiştir. Yüzeye yayılması sağlanan tripsin 3-4 dakika 37 °C'deki inkübatörde bekletilmiştir. Mikroskop ile gözlem yapılarak tüm hücrelerin yüzeyden kalkması takip edilmiştir. Yüzeyden kalkan hücreler santrifüj tüpüne toplanarak 1000 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üst sıvı uzaklaştırılarak santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırılmış ve besi ortamı ile süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonu 1:5 oranında yeni bir flaska alınmış, üzerine taze besi ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir.

Neubauer lamı ile hücre sayımı

Yeterince hücre elde edilene kadar pasajlanan hücreler, hücre yoğunluklarının anlaşılması için hücrelere mikroskopta bakılmış ve kaç kat seyreltileceğine karar verilmiştir. 10 kat seyreltme için; bir Eppendorf tüp içerisine alınan 50 µL hücre üzerine 50 µL tripan mavisi ve 400 µL PBS (Phosphate buffer saline) eklenmiştir. Sayımın yapılacağı Neubauer lamı alkol ile iyice silinerek temizlenmiş ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Ardından hazırlanan hücre süspansiyonu dikkatli bir şekilde lama yüklenmiştir. Lam mikroskoba yerleştirilerek hücre sayımı yapılmıştır. Aşağıdaki formül ile toplam hücre sayısı belirlenmiştir.

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = \frac{8 \text{ gözde sayılan hücre sayısı} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4}{8}$$

MTT Testi

Canlandırılan ve hücre sayımları yapılan LNCaP (insan prostat kanser hücre hattı), SH-SY5Y (insan nöroblastom hücre hattı), HaCaT (Keratinosit hücre hattı) ve L929 (Fibroblast hücre hattı) hücre hatları (her kuyuya 1×10^5 hücre) 6 enzim konsantrasyonu (3,75 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL) için dörder tekrar olacak şekilde 96 gözlü plakaya ekilmiştir.

Hücreler 37°C, %5 CO₂ içeren %95 nemli ortamda 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.

24 saat sonra kuyulardan eski besi ortamı pipet yardımıyla hücrelere temas etmeden dikkatli bir şekilde çekilmiştir.

İlk kuyucuk hariç tüm kuyulara 100 μ L besi ortamı eklenmiştir. Ardından ilk iki kuyuya besi ortamı ile seyreltilmiş, 100'er μ L L-asparajinazdan ekleme yapılmıştır. İkinci kuyucuktan itibaren seyreltmeler gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak madde eklenmemiş besi ortamı kullanılmıştır.

Hücreler, 37°C, %5 CO₂ içeren %95 nemli ortamda 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Bu sürenin sonunda eski besi ortamı uzaklaştırılmış ve hücrelere %10 MTT solüsyonu (5mg/mL) içeren serumsuz besi ortamından 100 μ L eklenmiştir.

Ardından 96 gözlü plaka alüminyum folyoya sarılarak 3 saat 37°C'de inkübe edilmiştir.

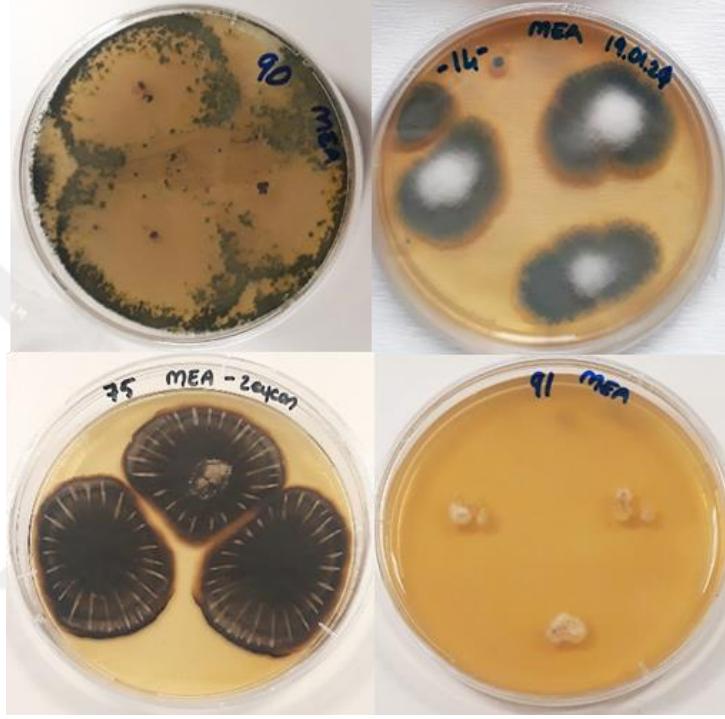
Üç saat sonunda 96 gözlü plakanın içeriği dökülerek DMSO'dan 100 μ L kuyulara pipetlenmiştir. Plaka karanlıkta 400 rpm'de 2 dakika çalkalanmıştır.

Mikroplate okuyucu yardımıyla 570 nm ve 690 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. Mikroorganizma Aktivasyonları ve Stoklama

Çalışmada kullanılan 94 adet deniz kaynaklı filamentöz fungus izolatu Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde aktive edilmiştir. Fungus izolatlarının bazılarının MEA besiyeri içeren petrilerdeki 3 nokta ekim görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Bazı deniz kaynaklı fungus izolatlarının MEA bulunan besiyerinde görünüşleri (Soldan sağa MF90, MF14, MF75, MF91)

Yatık agar içerisinde stokların görünüşleri ise Şekil 4.2’de verilmiştir.

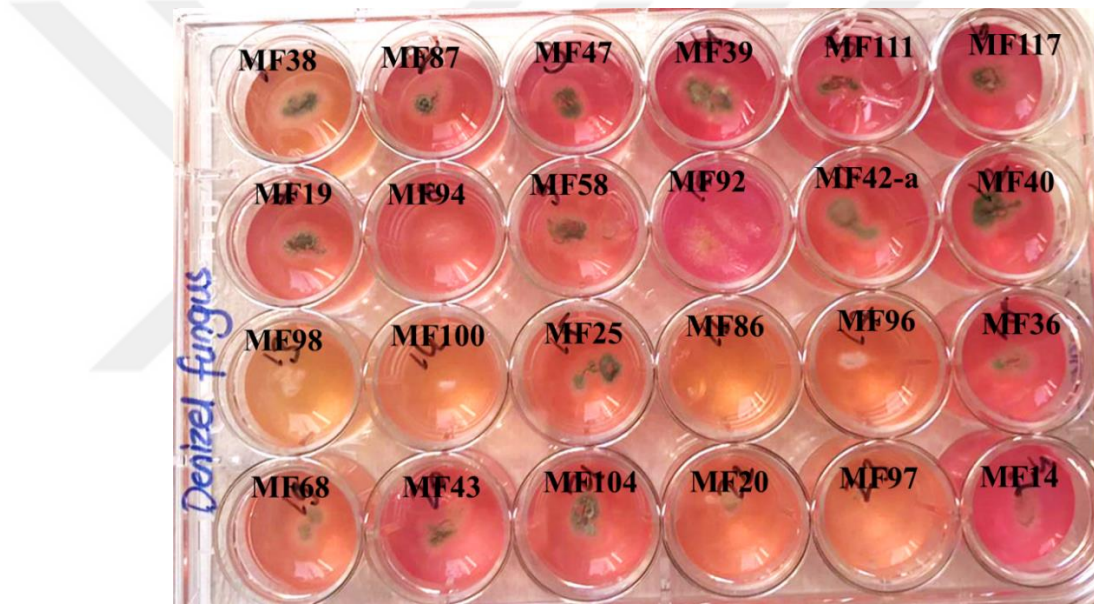


Şekil 4.2. Yatık agar içerisinde stoklanan bazı deniz kaynaklı fungus izolatlarının görünümü (soldan sağa MF5, MF10, MF12, MF13, MF13-B, MF14, MF15, MF16, MF17, MF19, MF20)

4.2. Hızlı Plaka Tarama Çalışmaları

L-asparajinaz hızlı plaka tarama çalışmaları

L-asparajinaz üretici deniz kaynaklı fungus izolatlarının hızlı bir şekilde belirlenmesi amacıyla ilk aşamada 94 adet deniz kaynaklı fungus izolatı, Tablo 3.2’de yer alan besiyerine ekilerek Bölüm 3.2.2’de anlatıldığı şekilde 24 kuyulu plakalar kullanılarak taranmıştır (Şekil 4.3). Bunun sonucunda **89 adet izolatın L-asparajinaz enzim üretimi açısından pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir**. L-asparajinaz üretimi pozitif izolatların bazılarında farklı tonlarda pembe renk oluşumu meydana geldiği için renk skalasına göre değerlendirilmiştir (Tablo 4.1).



Şekil 4.3. Fungus izolatlarının L-asparajinaz aktivitesine ait hızlı plaka tarama yönteminden bir görünüm

Glutaminaz- üreaz hızlı plaka tarama çalışmaları

L-asparajinaz pozitif olan 89 izolat bu aşamada değerlendirilmiştir. Benzer şekilde glutaminaz ve üreaz açısından tarama çalışmasında 24 kuyulu plaka kullanılmıştır. Glutaminaz ve üreaz tarama çalışmasına ait görünümeler Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’te verilmiştir.

Bu aşamada değerlendirilen 89 izolat içerisinde 10 izolatın glutaminaz negatif olduğu belirlenmiştir. Bunlar sırasıyla; MF17, MF20, MF27, MF35, MF36, MF37, MF39, MF52, MF75 ve MF91 kodlu izolatlardır.

Üreaz negatif olarak ise 8 izolat belirlenmiştir. Bunlar; MF12, MF20, MF36, MF58, MF70, MF71, MF75, MF91 kodlu izolatlardır. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde hem glutaminaz hem üreaz negatif 4 izolat belirlenmiştir. Bunlar MF20, MF36, MF75, MF91 kodlu izolatlardır (Tablo 4.1).



Şekil 4.4. Fungus izolatlarının glutaminaz aktivitesine ait hızlı plaka tarama yönteminden bir görünüm



Şekil 4.5. Fungus izolatlarının üreaz aktivitesine ait hızlı plaka tarama yönteminden bir görünüm

Tablo 4.1. L- Asparajinaz pozitif fungus izolatlarının glutaminaz ve üreaz üretimi

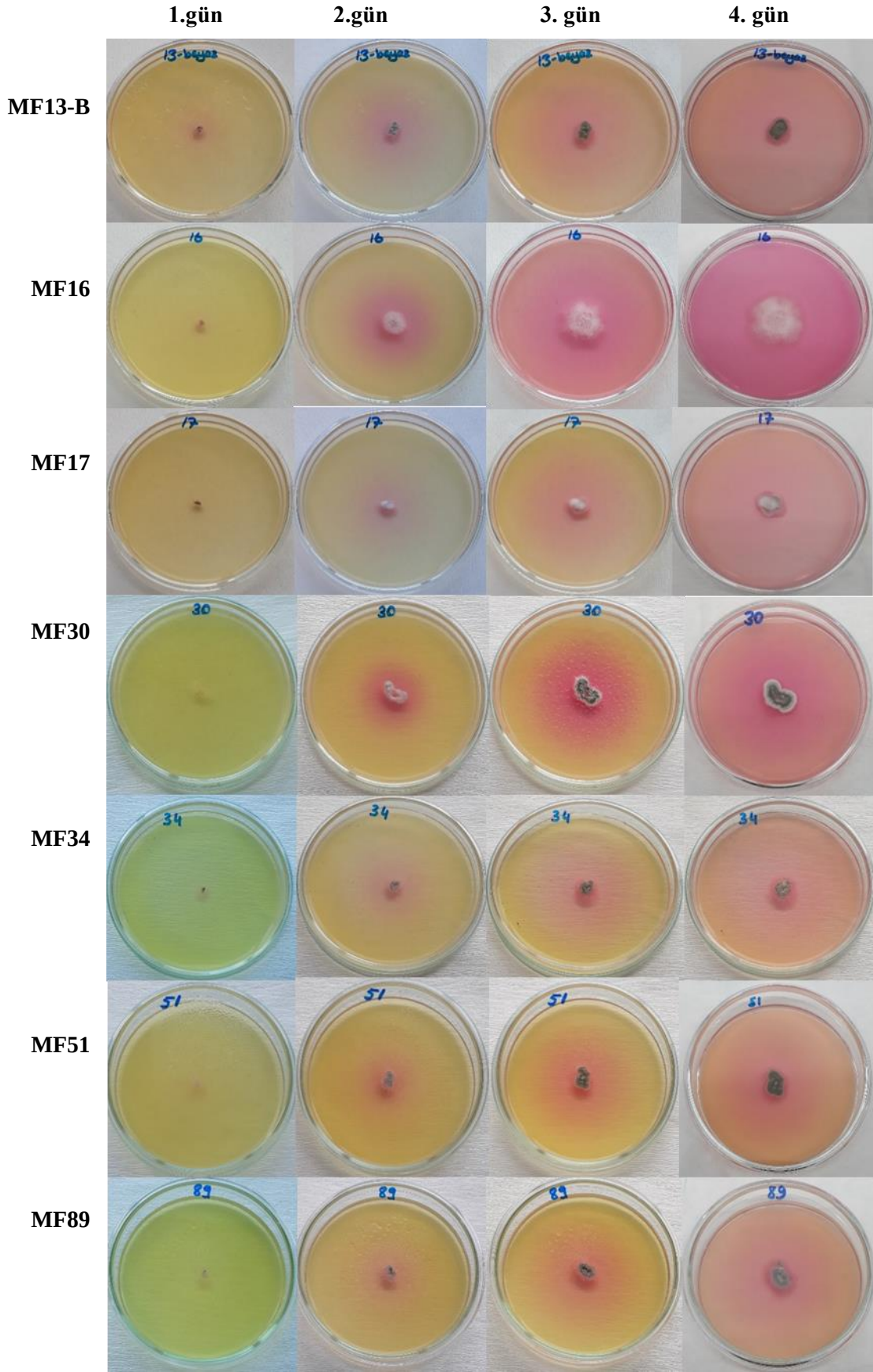
İzolatlar	A	G	Ü	İzolatlar	A	G	Ü
MF5	++++	+	+	MF61	++++	+	+
MF10	++++	+	+	MF62	++++	+	+
MF12	++++	+	-	MF63	++++	+	+
MF13	++++	+	+	MF64	++++	+	+
MF13-B	++++	+	+	MF65	++++	+	+
MF14	++++	+	+	MF66	++++	+	+
MF15	++++	+	+	MF67	+++	+	+
MF16	++++	+	+	MF68	+	+	+
MF17	++++	-	+	MF69	++++	+	+
MF19	++	+	+	MF70	+++	+	-
MF20	+	-	-	MF71	++	+	-
MF21	++++	+	+	MF73	++++	+	+
MF23	++++	+	+	MF74	++++	+	+
MF24	++++	+	+	MF75	++	-	-
MF25	+	+	+	MF77	++++	+	+
MF26	++++	+	+	MF79	++++	+	+
MF27	+++	-	+	MF80	++++	+	+
MF29	++++	+	+	MF81	++++	+	+
MF30	++++	+	+	MF88	++++	+	+
MF31	++++	+	+	MF87	++	+	+
MF32	++++	+	+	MF89	++++	+	+
MF33	++++	+	+	MF90	+++	+	+
MF34	++++	+	+	MF91	+++	-	-
MF35	++++	-	+	MF92	++++	+	+
MF36	++++	-	-	MF93	+++	+	+
MF37	+++	-	+	MF94	++	+	+
MF38	+	+	+	MF95	++++	+	+
MF39	++++	-	+	MF99	++++	+	+
MF40	++++	+	+	MF101	++++	+	+
MF42-a	+++	+	+	MF104	++	+	+
MF42-b	+++	+	+	MF105	++++	+	+
MF43	++	+	+	MF106	++++	+	+
MF43-a	++	+	+	MF107	++++	+	+
MF47	+++	+	+	MF108	++++	+	+
MF49	+++	+	+	MF109	++++	+	+
MF50	++++	+	+	MF110	++++	+	+
MF51	++++	+	+	MF111	++++	+	+
MF52	+++	-	+	MF112	+++	+	+
MF53	++++	+	+	MF113	++++	+	+
MF54	++++	+	+	MF113-K	++++	+	+
MF55	++++	+	+	MF114-a	++++	+	+
MF56	++++	+	+	MF115	++++	+	+
MF58	++	+	-	MF116	++++	+	+
MF59	++++	+	+	MF117	++++	+	+
MF60	++++	+	+				

A: L-asparajinaz, G: glutaminaz, Ü: üreaz

İleri aşama için seçilecek izolatın belirlenmesinde asparajinaz aktivitesinin yarı-kantitatif olarak değerlendirilmesine karar verilmiştir. Bunun için Tablo 4.1’de ++++ şeklinde belirtilen güçlü pozitif izolatlar ve glutaminaz ve üreaz negatif özellik gösteren izolatlar belirlenmiştir.

Bunun sonucunda hızlı tarama yöntemi ile renk skalasına göre koyu pembe renk gösteren (++++) 63 izolat (glutaminaz ve üreaz negatif olarak belirlenen MF36 izolatı içerisinde) belirlenmiştir. Tez çalışmasında glutaminaz ve/veya üreaz negatif asparajinaz aktivitesi gösteren bir enzim hedeflendiğinden glutaminaz ve üreaz negatif diğer 3 izolatta (gösteren MF20, MF75 ve MF91) değerlendirilerek toplam 66 izolatın zon indeksleri (1-4 gün arasında zon ve koloni çapları ölçülerek) hesaplanmıştır (Şekil 4.6, Tablo 4.2).





Şekil 4.6. Bazı izolatlara ait farklı günlerdeki koloni ve zon çaplarının görünümü

Zon indekslerinin belirlenmesi çalışmaları

Zon indeksleri değerlendirilmesi yapılırken 4 günlük sonuçlar ayrı ayrı değerlendirilmiş ve nihai seçim yapılmıştır. Bunun için excelde zonlar her gün için ayrı ayrı sıralanmış ve

1. gün zon indeksi 4-2,22 arasında olan izolatlar,
2. gün 5,88-4,12 arasındaki izolatlar,
3. gün 9-6.56 arasındaki izolatlar,
4. gün ise 9-7,83 arasındaki izolatlar seçilmiştir.

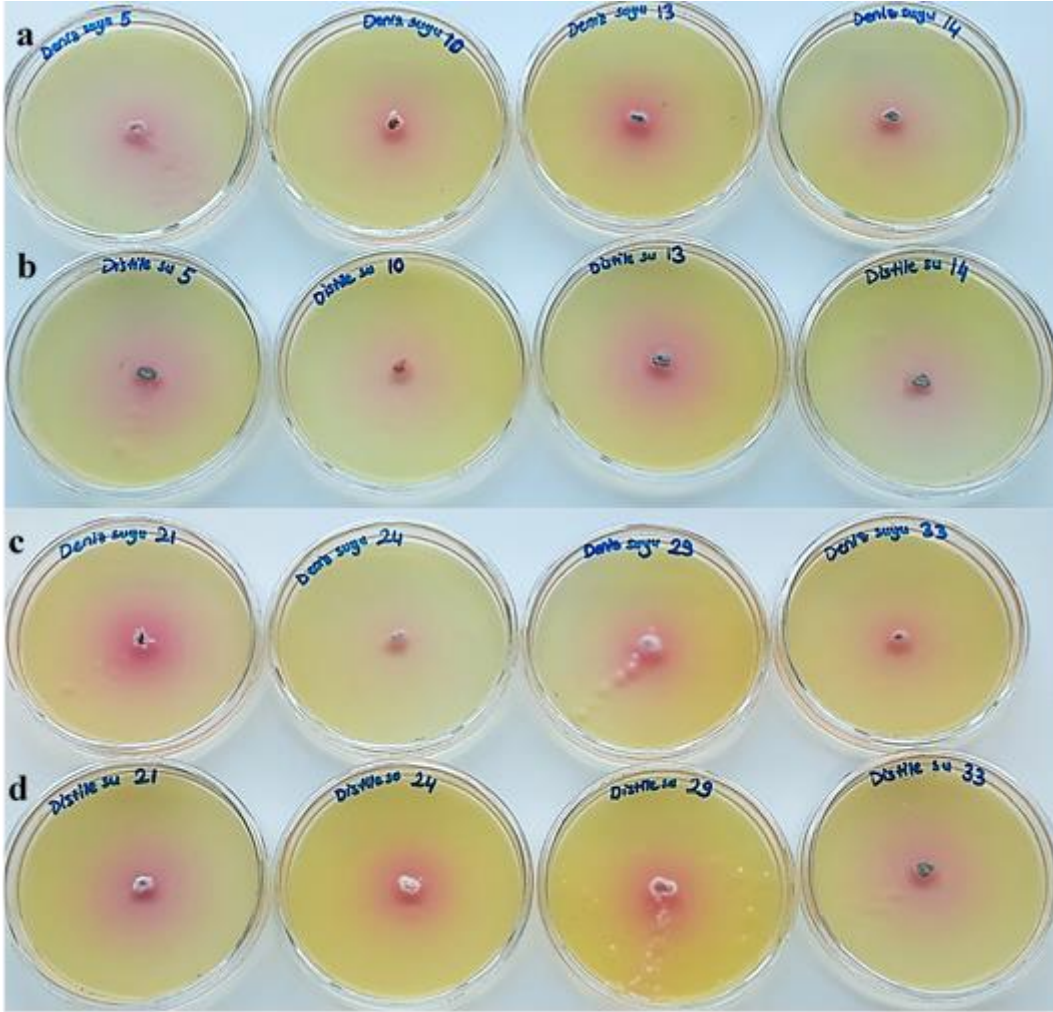
Yarı kantitatif tarama sonrası en iyi asparajinaz aktivitesi gösteren 15 izolat (MF5, MF10, MF13, MF14, MF21, MF24, MF29, MF33, MF39, MF50, MF60, MF73, MF80, MF107, MF114-a) ve glutaminaz ve üreaz negatif 4 izolat (MF20, MF36, MF75, MF91) da dahil olmak üzere toplam 19 izolat aday üretici olarak belirlenmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2.Fungus izolatlarının (66 adet) 1-4 gün arasındaki zon indeksleri (gri gölgeler seçilen aralık içinde bulunan değerleri göstermektedir)

İzolat	gün				İzolat	gün				İzolat	gün			
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
MF5	2,40	4,29	6,56	8,18	MF39	1,00	4,55	4,35	5,19	MF80	4,00	3,33	4,60	4,62
MF10	2,82	4,17	7,67	4,55	MF40	2,00	2,95	3,70	2,78	MF81	-	3,07	4,55	4,07
MF12	-	1,00	2,50	2,50	MF50	1,00	1,00	7,50	6,43	MF88	1,00	2,50	3,21	3,33
MF13	2,83	3,70	4,50	4,50	MF51	-	2,27	3,41	3,10	MF89	-	1,80	2,96	2,27
MF13-B	2,00	3,75	4,76	6,92	MF53	1,00	4,00	3,45	6,08	MF91	-	1,00	0,89	2,50
MF14	2,40	1,50	7,00	9,00	MF54	1,00	2,88	4,00	4,76	MF92	-	1,70	2,89	2,20
MF15	1,86	3,50	6,00	2,96	MF55	1,00	3,13	5,00	3,93	MF95	1,50	3,75	5,26	7,20
MF16	0,20	3,00	2,32	2,88	MF56	1,43	1,00	2,67	3,66	MF99	1,43	1,00	4,44	6,43
MF17	-	2,94	3,57	5,00	MF59	-	2,00	3,80	4,00	MF101	1,00	2,00	3,51	2,90
MF20	-	-	1,00	2,69	MF60	2,22	5,00	6,67	8,65	MF105	-	1,86	3,52	4,29
MF21	2,43	3,48	7,63	7,83	MF61	1,45	3,07	5,00	2,78	MF106	1,00	3,48	4,67	4,50
MF23	-	3,13	5,88	5,19	MF62	-	2,00	2,80	3,20	MF107	2,00	3,00	4,60	9,00
MF24	2,22	2,96	3,94	4,86	MF63	1,00	2,50	5,00	7,20	MF108	-	2,22	2,86	2,94
MF26	-	2,60	5,00	7,20	MF64	1,00	1,79	3,17	3,00	MF109	-	1,92	3,38	4,10
MF29	1,86	5,88	7,20	7,20	MF65	1,00	2,50	3,85	4,67	MF110	-	1,00	1,00	1,00
MF30	-	2,86	4,20	3,75	MF66	1,00	2,50	5,16	5,81	MF111	1,00	2,78	6,0	5,67
MF31	-	1,00	2,90	3,44	MF69	1,50	4,00	3,79	3,43	MF113	1,71	2,50	2,72	3,96
MF32	2,00	4,00	3,16	3,75	MF73	1,00	1,82	7,83	7,20	MF113-K	-	2,50	3,33	3,93
MF33	1,67	4,12	6,00	5,83	MF74	-	2,25	3,33	2,63	MF114a	3,00	4,00	5,50	6,00
MF34	-	1,92	3,50	2,84	MF75	-	-	1,00	3,00	MF115	-	2,38	2,93	4,00
MF35	-	2,50	3,33	5,63	MF77	1,00	2,22	2,86	4,00	MF116	1,00	2,38	3,57	6,43
MF36	-	-	1,00	1,00	MF79	-	1,25	2,32	2,63	MF117	-	-	1,00	2,29

Destile su ve deniz suyu karşılaştırma çalışmaları

Tez kapsamında kullanılan funguslar deniz kaynaklı olduğundan zon indekslerine göre seçilen 19 aday izolatın deniz suyu varlığındaki L-asparajinaz aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bunun için destile su ve deniz suyu ile hazırlanmış besiyerlerinde zon indeksleri belirlenmiştir. Sonuçta **deniz suyu ve destile su ile hazırlanan besiyerlerinde 19 izolatın büyüme ve zon oluşturma açısından önemli bir fark oluşturmadığı görülmüştür** (Şekil 4.7). Bu nedenle küçük ölçekli fermentasyon çalışmalarına destile su ile devam edilmiştir.



Şekil 4.7. Bazı izolatların destile ve deniz suyu içeren besiyerindeki 2. gün görüntüleri
a; deniz suyu; MF5, MF10, MF13 ve MF14, b; destile su; MF5, MF10, MF13 ve MF14,
c; deniz suyu MF21, MF24, MF29 ve MF33, d; destile su MF21, MF24, MF29 ve MF33

Elde edilen veriler doğrultusunda 19 izolat içerisinde önceki zon indekslerine göre ilk üç günde en yüksek zon indeksini veren izolatlar olan **MF5 ve MF10** ve glutaminaz+üreaz negatif özellik gösteren **MF20 ve MF75** kodlu izolatlar ile **küçük ölçek fermentasyon çalışmalarına geçilmiştir.**

MF5, MF10, MF20 ve MF75 izolatları, daha önceden yapılan çalışmalar neticesinde tanımlanmıştır. Buna göre;

- MF5; *Penicillium crustosum* (aksesyon numarası: KF938375.1),
- MF10; *Aspergillus flavus* (JF729324 aksesyon numarası *A. flavus* strain TEM 32-2),
- MF20; *Penicillium canescens* (aksesyon numarası: KF938386.1),
- MF75; *Cladosporium cladosporioides* (aksesyon numarası: KF938439)

olduğu tanımlanmış olup National Center for Biotechnology Information (NCBI) Genbankta kayıtlıdır.

4.3. Küçük Ölçek Fermantasyon Çalışmaları

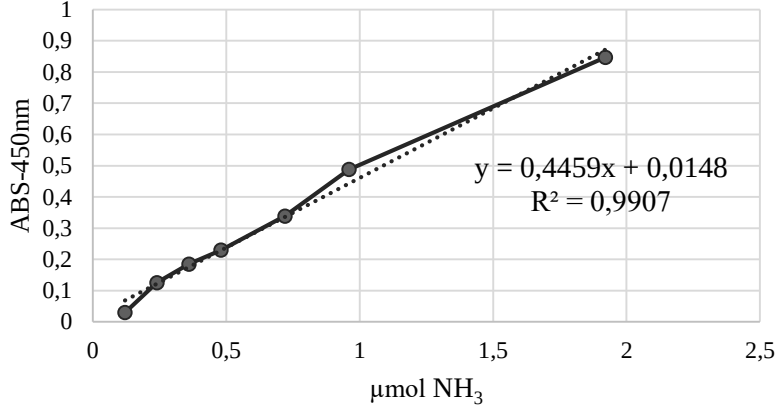
Yarı kantitatif taramalar sonucu seçilen *P. crustosum* MF5, *A. flavus* MF10, *P. canescens* MF20 ve *C. cladosporioides* MF75 suşları ile gerçekleştirilen küçük ölçek fermantasyon işlemlerinde farklı zamanlarda (24 saat, 48 saat, 72 saat) örnekler alınarak enzim aktiviteleri ölçülmüştür. *A. flavus* MF10'un küçük ölçek fermantasyon çalışmalarından bir görüntü Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8. *A. flavus* MF10'un LAF besiyerinde çalkalamalı kültürün 3. gün görüntüsü

L-asparajinaz aktivitesi Bölüm 3.2.4’de anlatılan Nesslerizasyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Bölüm 3.2.5 ve Bölüm 3.2.6’de anlatıldığı gibi glutaminaz ve üreaz aktiviteleri de Nesslerizasyon yöntemiyle belirlenmiştir.

Enzim aktivitesinin değerlendirilmesi için oluşturulan amonyum sülfat standart eğrisi Şekil 4.9 verilmiştir.



Şekil 4.9. Amonyum sülfat standart eğrisi

L-asparajinaz aktivitelerinin ölçümleri mikroparka okuyucuda 450 nm’de 9 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan amonyum sülfat standart eğrisi denklemi ile ($y=0,4459x + 0,0148$) amonyak miktarı belirlenmiştir. Ardından Bölüm 3.2.4’ te verilen formül ile U/mL miktarı hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3’ de verilmiştir.

Tablo 4.3. Seçilen suşların farklı fermantasyon sürelerine ait enzim aktiviteleri

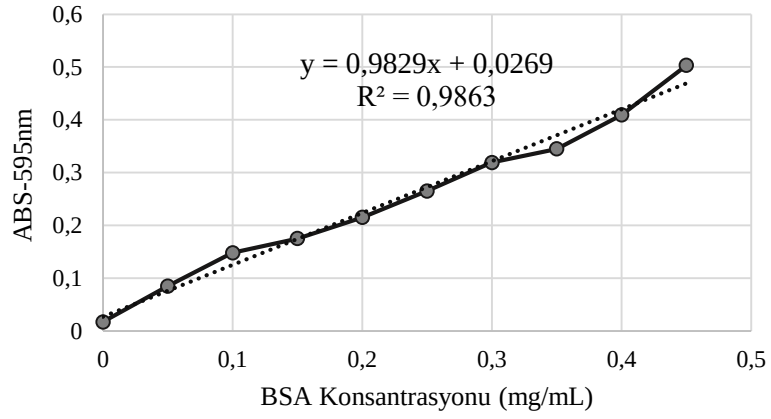
	Enzim Aktivitesi (U/mL)		
	24 saat	48 saat	72 saat
<i>P. crustosum</i> MF5	-	0,22	0,309
<i>A. flavus</i> MF10	1,004	0,456	2,82
<i>P. canescens</i> MF20	0,25	0,32	0,4
<i>C. cladosporioides</i> MF75	-	-	0,473

Sonuçlara bakıldığında her suş için en yüksek L-asparajinaz aktivitesi 72. saatte ölçülmüştür. **Bununla birlikte en yüksek aktivite değerinin ise *A. flavus* MF10’a ait**

olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar dikkate alınarak ileri çalışmalara *A. flavus* MF10 ile devam edilmesine karar verilmiştir.

A. flavus MF10'un 72 saat fermentasyonu sonrası hücre içi enzim aktivitesi de değerlendirilmiştir. Bunun için toplanan biyokütle sonikatörde %40 titreşim genliğinde, 70W, 60 saniye 3 döngü ve 8 döngü olmak üzere 2 farklı işlem ile parçalanmış ve elde edilen üstsıvı enzim aktivite tayininde kullanılmıştır.

Ayrıca *A. flavus* MF10'un spesifik aktivitesinin belirlenmesi için toplam protein tayini de yapılmıştır. Bunun için oluşturulan BSA standart eğrisi Şekil 4.10'da sunulmuştur. Protein miktarlarının belirlenmesi için Bölüm 3.2.7'de anlatıldığı üzere BSA ile oluşturulan standart eğri denklemi ($y = 0,9829x + 0,0269$) kullanılmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. BSA standart eğrisi

Bu işlemler sonucunda 3 döngü ile yapılan sonikasyon işleminde hücre içi aktiviteye rastlanmamıştır. Sekiz döngü sonikasyon işlemi sonrası enzim aktivitesi ölçülmüştür. *A. flavus* MF10'un hücre içi ve hücre dışı enzim aktivite ve protein sonuçları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. *A. flavus* MF10'un hücre içi ve hücre dışı enzim aktivite ve protein değerleri

	MF10	
	Hücre içi	Hücre dışı
Enzim aktivitesi (U/mL)	0,534	2,77
Protein (mg/mL)	0,185	0,056

L-asparajinazın hücre içi ve hücre dışı aktivite sonuçları değerlendirildiğinde hücre dışı enzim aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle ilerleyen çalışmalara hücre dışı enzim aktivitesi ile devam edilmiştir.

4.4. Kısmi Saflaştırma İşlemleri

Kısmi saflaştırma için küçük ölçek fermantasyon işlemleri ile elde edilen 150 mL fermantasyon sıvısı kullanılmıştır. Hücreler santrifüj ile ayrıldıktan sonra fermantasyon sıvısında enzim aktivitesi ve protein konsantrasyonu ölçülmüş ve sırasıyla 3,66 U/mL ve 0,068 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Fermantasyon sıvısı (150 mL) 10kDa'luk membran sistemi ve ultrafiltrasyon cihazı kullanılarak 35 mL'ye konsantre edilmiştir. Ardından konsantrasyon işlemine santrifugal filtre (Vivaspin 20 Sartorius, 10kDa) ile devam edilmiş ve 35 mL örnek 2,5 mL'ye konsantre edilmiştir. Bu aşamada retentat kısmına enzim aktivitesi tayini yapılmış ve aktivitenin yaklaşık 10 kat artarak 37,16 U/mL olduğu belirlenmiştir. Konsantre fermantasyon sıvısında protein miktarı ise 0,734 mg/mL olarak ölçülmüştür. Enzim aktivitesi ve protein tayini retentatın yanı sıra permeat için de ölçülmüş ve beklenildiği gibi permeat kısmında enzim aktivitesi bulunmamıştır.

Küçük ölçek fermantasyon işlemlerinden elde edilen fermantasyon ortamı kullanılarak glutaminaz ve üreaz aktivite tayini sonucunda her iki enzim için de aktivite ölçülememiştir. Ancak konsantre edilen örnekte **glutaminaz aktivitesi L-asparajinaz aktivitesinden yaklaşık 30 kat düşük -1.27 U/mL- olarak ölçülmüş, üreaz aktivitesine ise rastlanmamıştır** (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. *A. flavus* MF10'a ait glutaminaz ve üreaz aktiviteleri

	Glutaminaz (U/mL)	Üreaz (U/mL)
<i>A. flavus</i> MF10	1,27	-

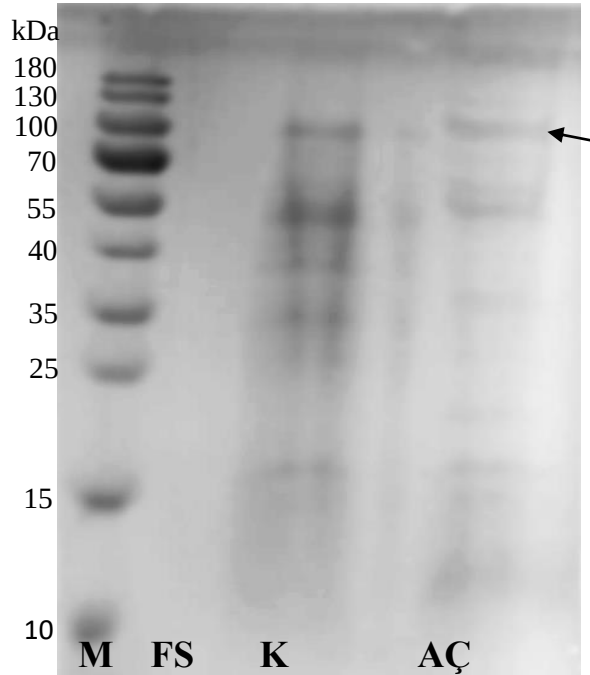
Ardından konsantre edilen fermantasyon sıvısının aseton ile çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Çöktürme sonrası pellet 1,5 mL fosfat tamponu ile süspanse edilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür. Eş zamanlı protein tayini de yapılarak toplam protein

miktarı (mg) ve spesifik aktivite (U/mg) değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.6). **Bunun sonucunda izole edilen L-asparajinaz aseton ile çöktürme sonrası %14,73 verimlilik ile 4.82 kat saflaştırılmıştır.**

Tablo 4.6. Kısmi saflaştırma işlemleri

Saflaştırma	Protein (mg/ml)	Enzim aktivitesi (U/ml)	Toplam protein (mg)	Toplam aktivite (U)	L-asparajinaz aktivitesi		
					Spesifik aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma katsayısı
Kültür filtratı	0,068	3,66	10,2	549,15	53,80	100	1
Ultrafiltrat	0,734	37,16	1,835	92,89	50,62	16,91	0,94
Aseton ile çöktürme	0,208	53,92	0,312	80,88	259,23	14,73	4,82

L-asparajinazın moleküler ağırlığının belirlenebilmesi amacıyla yapılan SDS-PAGE işlemi sonrası fermantasyon sıvısı, ultrafiltrasyon sonrası konsantre enzim ve aseton ile çöktürme sonrası enzimin jeldeki bant görüntüleri Şekil 4.11’de verilmiştir. **GelAnalyzer (version 19.1) programı kullanılarak enzimin yaklaşık 100 kDa olduğu belirlenmiştir.**



Şekil 4.11. SDS-PAGE görüntüsü (M:marker, FS: fermantasyon sıvısı, K: Konsantre enzim, AÇ: asetonla çöktürme)

4.5. Karakterizasyon İşlemleri

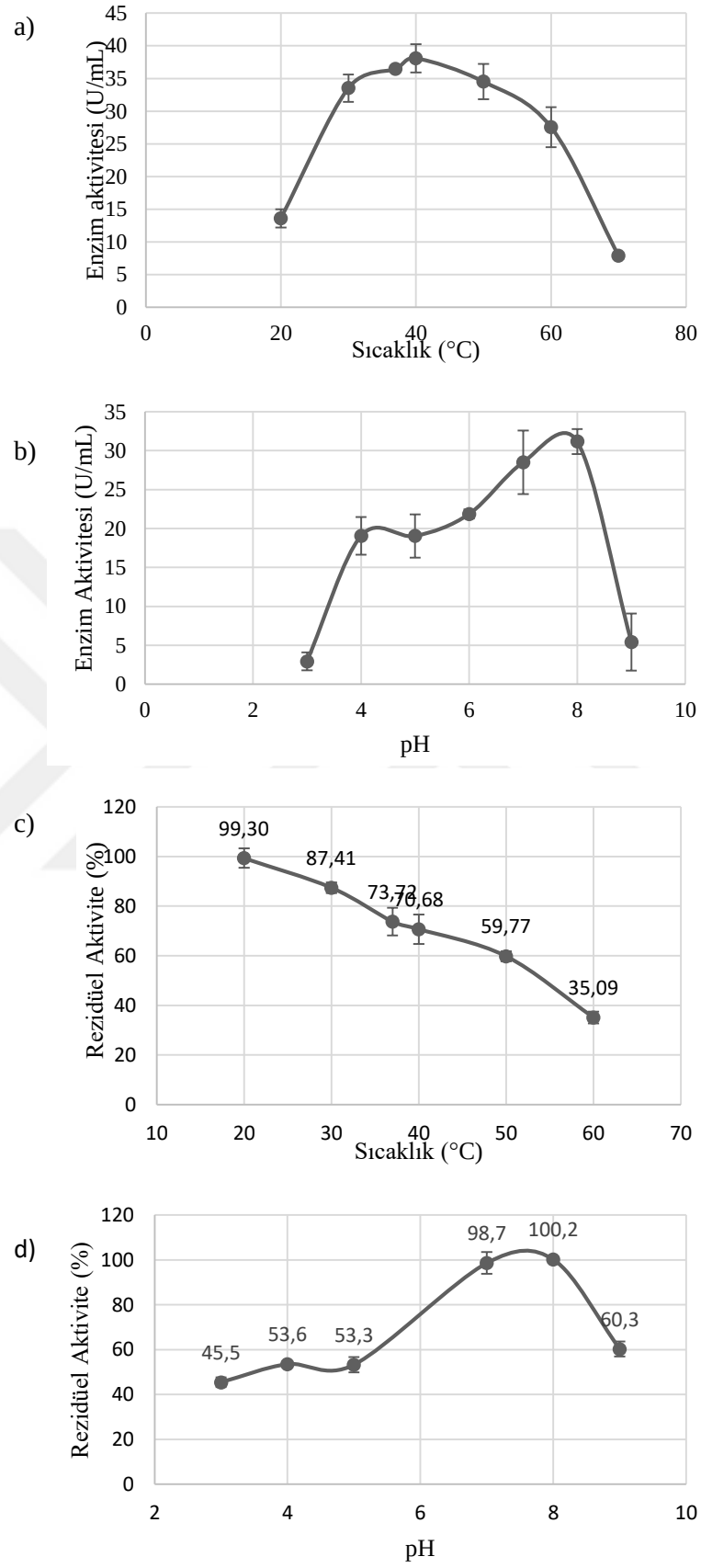
L-asparajinaz enziminin kısmi karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.12’de verilmiştir.

Optimum sıcaklığın belirlenmesi için 20°C, 30°C, 37°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C sıcaklıklarda inkübe edilen enzimin aktivitesi ölçülmüştür. **Optimum sıcaklık 40°C olarak belirlenmiştir.** Vücut sıcaklığı olan 37°C’de de enzim aktivitesi diğer sıcaklıklara göre yüksektir. Ancak 40°C üzerinde ve altındaki sıcaklıklarda aktivitenin kademeli olarak düştüğü görülmektedir.

L-asparajinazın optimum pH değerinin belirlenmesi için 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 pH değerlerinde hazırlanan farklı tamponlar ile aktivite ölçümü yapılmıştır. **Enzim aktivitesi ölçümleri sonucunda optimum pH değerinin 8 olduğu görülmektedir.** Enzimin pH 4’ün altında ve pH 8’in üzerindeki değerlerde aktivitesinin önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir.

Enzimin termal stabilitesinin belirlenmesi amacıyla örnekler 20, 30, 37, 40, 50, 60°C aralığında 1 saat inkübe edilmiş ve ardından enzim aktiviteleri ölçülmüştür. 4°C’de bekletilen enzim kontrol olarak kullanılmıştır. L-asparajinaz, **20°C’de termal stabilitesini neredeyse tamamen korurken, 30°C’de yaklaşık %87 korunduğu belirlenmiştir.** Ancak sıcaklıklar yükseldiğinde termal stabilitenin de kademeli şekilde azaldığı görülmektedir.

L-asparajinazın pH stabilitesinin belirlenmesi için farklı tampon sistemlerinde ve pH değerlerinde (pH 3, 4, 5, 7, 8 ve 9) 1 saat ön inkübasyonun ardından enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçta **pH stabilitesinin en yüksek olduğu değer 7 ve 8** olarak belirlenmiştir.



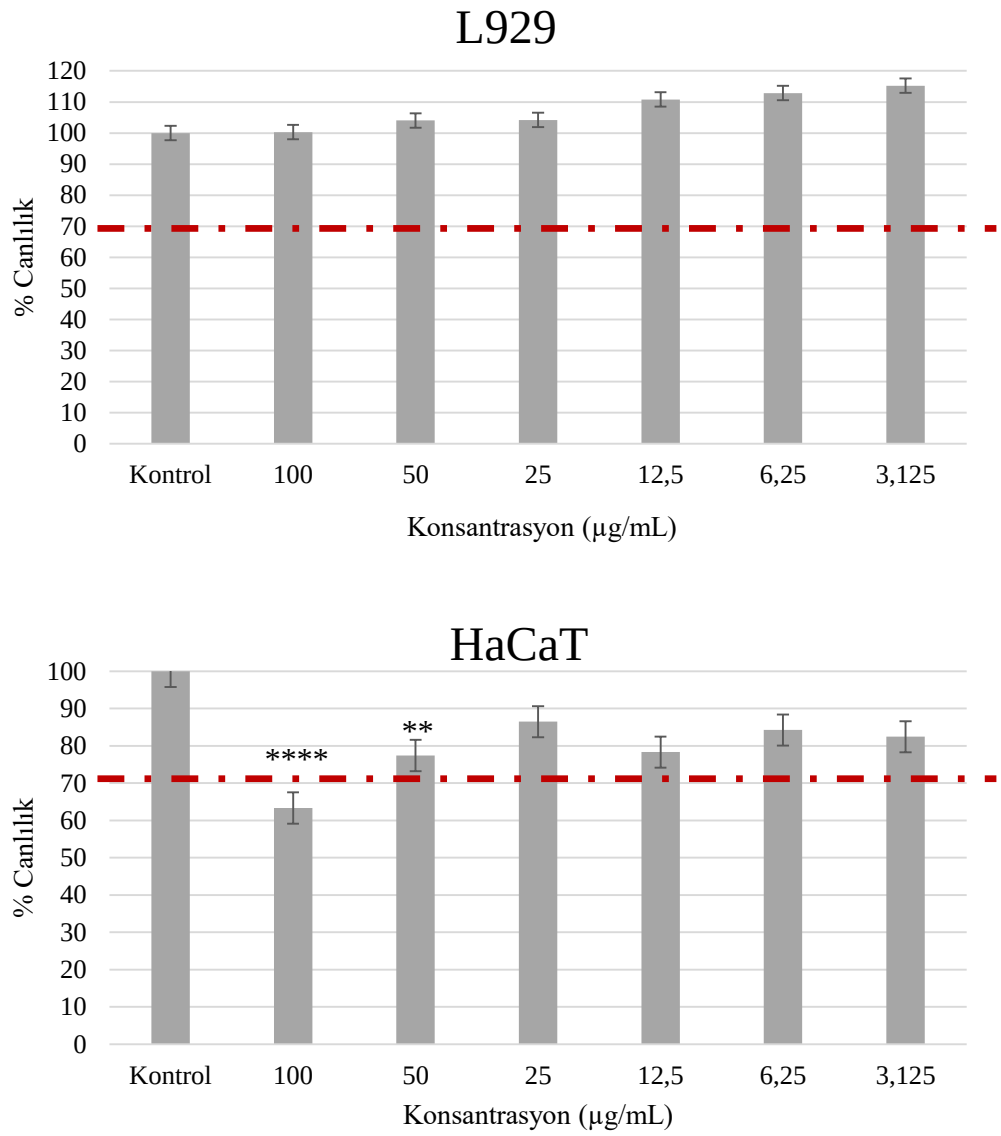
Şekil 4.12. L-asparajinazın a) optimum sıcaklık, b) optimum pH, c) termal stabilite ve d) pH stabilitesi

4.6. Sitotoksosite Analizi

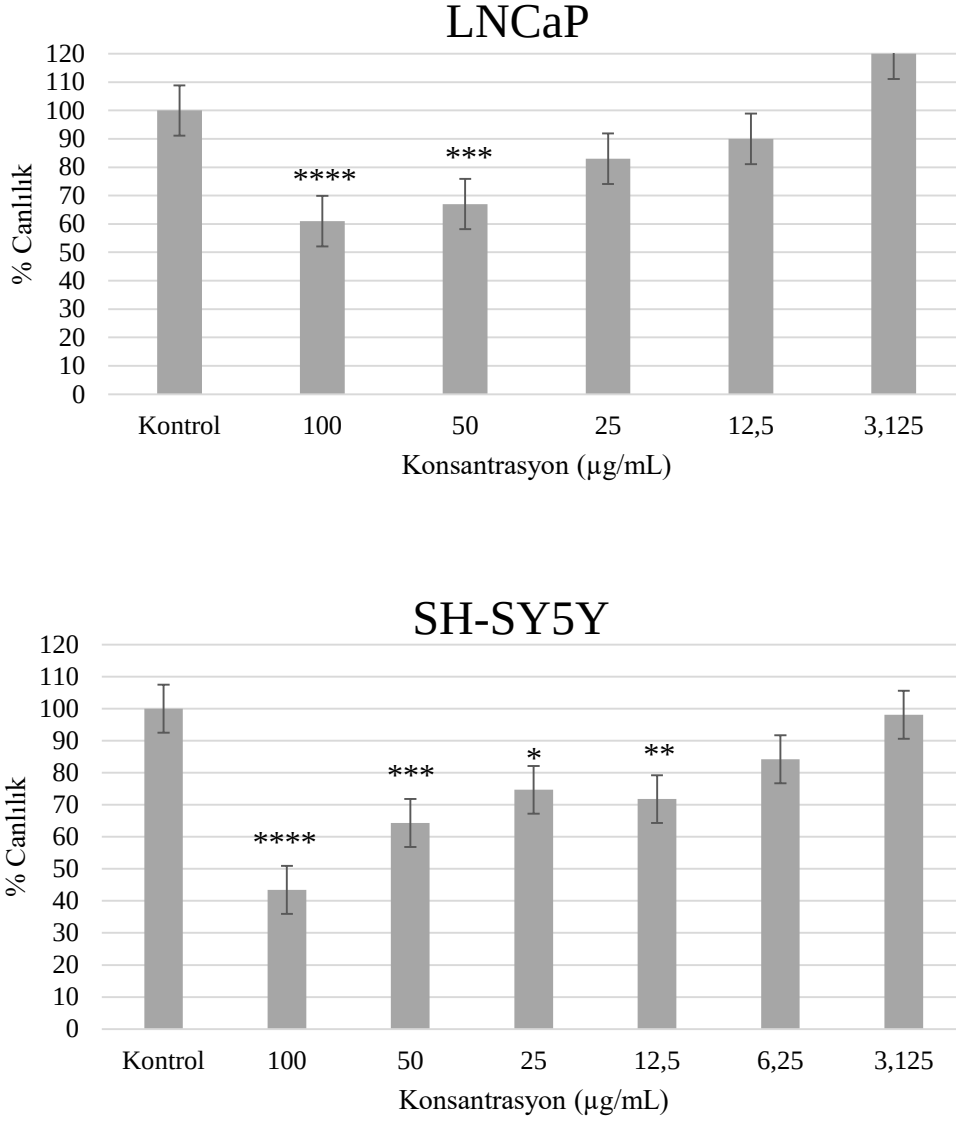
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) testi ile L-asparajinazın LNCaP (insan prostat kanser hücre hattı), SH-SY5Y (insan nöroblastom hücre hattı), HaCaT (insan keratinosit hücre hattı) ve L929 (fare fibroblast hücre hattı) hücre hatları üzerinde 24 saat sonrası hücre canlılık oranları belirlenmiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).

ISO 10993-12 standardına göre yapılan testte hücre canlılığının %30'dan fazla azalması sitotoksik etki olarak kabul edilmektedir. Sitotoksosite analizi sonucunda 24 saat sonrasında kısmi saflaştırılan enzim preparatının fibroblast hücre hattı (L929) üzerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilememiştir. **Enzim preparatı L929 sağlıklı hücre hattı üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir. HaCaT hücre hattında ise 100 µg/mL enzim uygulaması kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre canlılığını düşürmüştür. 50 µg/mL kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark olmakla birlikte hücre canlılığı açısından kabul edilebilir düzeydedir.**

L-asparajinazın kanser hücre hatlarında hücre canlılık etkilerine bakıldığında **LNCaP ve SH-SY5Y hücrelerinin artan enzim konsantrasyonlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre canlılığının düştüğü görülmektedir. 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonda uygulanan L-asparajinazın LNCaP'ın hücre canlılığı üzerindeki etkisi sırasıyla %61 ve %67 olarak gözlenmiştir. Bununla birlikte 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonda uygulanan enzimin SH-SY5Y'nin hücre canlılığını sırasıyla %43 ve %64'e düşürdüğü belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında SH-SY5Y'in LNCaP hücre hattına göre daha fazla etkilendiği belirlenmiştir.**



Şekil 4.13. L-asparajinazın sağlıklı hücre hatlarında konsantrasyona bağlı 24 saat sonrası % canlılık (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)



Şekil 4.14.L-asparajinazın kanser hücre hatlarında konsantrasyona bağlı 24 saat sonrası % canlılık
 (***** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$)

5. GENEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Enzimler çeşitli işlevlere sahip olan proteinlerdir ve ilgili reaksiyonları katalizlemektedirler. Günümüze kadar yüzlerce farklı enzim tanımlanmış ve birçoğu önemli ölçüde karakterize edilmiştir. Enzimler metabolizmanın katalitik temel taşı olduklarından birçok üretim sürecinde olduğu kadar sağlık alanında da önemli role sahiptirler.

Lösemi tedavisinde öne çıkan L-asparajinaz son 40 yılda bir çok makalenin odak noktası olmuştur (Batool et al., 2016; Qeshmi et al., 2018). L- asparajinaz, L-asparajinin L-aspartat ve amonyağa dönüşümünü katalizlemektedir. Uzun yıllardan beri lösemi tedavilerinde kullanılan bir enzimdir. Lösemi hücreleri ve normal hücreler metabolik ihtiyaçlarını karşılamak için L-asparajine ihtiyaç duymaktadır. L-asparajinazın asparajini parçalamasıyla tümör hücreleri, metabolik ihtiyaçlarını karşılayamaz ve bu durum protein sentezinin inhibisyonuna neden olarak kanser hücrelerinin apoptozuna yol açar. Sağlıklı hücreler ise ihtiyaçları olan asparajini, asparajin sentetaz enzimi sayesinde üretirler.

Günümüzde Akut Lenfoblastik Lösemi tedavisinde kullanılan FDA tarafından onaylı 3 tip ilaç bulunmaktadır ve bu ilaçlar *E. coli* ve *E. chrysanthemi* bakterilerinden elde edilir. Bunlar sırasıyla doğal *E.coli* türevli L-asparajinaz (Elspar®, Kidrolase®), *E. coli* türevli L-asparajinazın PEG ile kovalent bağlanması ile oluşturulan Pegasparaz (Oncaspar®) son olarak *E. chrisanthemi* türevli L-asparajinaz (Crisantaspase®, Erwiniase®)'dır (Avramis and Panosyan, 2005; Chand et al., 2020; Muneer et al., 2020). *E.coli* türevli L-asparajinaz uzun süreli kullanımda hiperglisemi pankreatit, kan pıhtılaşma faktörlerinin bozulması gibi çeşitli rahatsızlıklara yol açar. Bu nedenle aşırı duyarlılık gösteren hastalar için *E. chrysanthemi* türevli L-asparajinaz kullanılmaktadır. 2006 yılından itibaren *E.coli* türevli L-asparajinazın PEG ile kovalent bağlanması sonucu oluşturulan ilaç ise ALL hastalarında ilk tedavi basamağı olarak onaylanmıştır (Dinndorf et al., 2007; Batool et al., 2016).

Deniz ortamı zengin kimyasal ve biyolojik çeşitlilik kaynağıdır. Tez kapsamında kullanılan denizden izole edilmiş filamentöz fungus suşları karasal eşdeğerleri ile karşılaştırıldığında ekstrem sıcaklık, pH toleransı, ultraviyole ışık, basınç, dalga kuvveti, ve substratlara erişim açısından farklı bir yaşam alanından gelmektedir. Aynı zamanda

bazı habitatlarda insan kan plazmasına yakın olan tuz seviyeleri ile başa çıkmak zorundadırlar (Qeshmi et al., 2018). Bu farklı koşullara adapte olabilmeleri ve yapısal çeşitlilikleri, deniz kaynaklı funguslardan elde edilen enzimlerin ve sekonder metabolitlerin hem ticari ürün imalatında hem de sağlık sektöründe ilgili biyoteknolojik uygulamalarda kullanılması açısından ilgi çekici kılmaktadır (Qeshmi et al., 2018; Gladfelter et al., 2019). Aynı zamanda farklı bölgelerden elde edilen aynı tür deniz kaynaklı fungusların farklı metabolit profillerini de üretebildiği bilinmektedir (Jones et al., 2019). Bu da çevresel koşulların önemini göstermektedir. Bu bağlamda deniz ortamından izole edilmiş funguslar L-asparajinaz için potansiyel bir kaynak olabilir (Nageswara et al., 2014).

Yapılan bu çalışma ile ilk aşamada L-asparajinaz enzim üreticiliği açısından taranan 94 adet deniz kaynaklı filamentöz fungus izolatının 89'unun (%94.7'si) L-asparajinaz üreticisi olduğu belirlenmiştir. Bu durum deniz kaynaklı fungusların potansiyel L-asparajinaz üreticisi olabileceklerini doğrulamaktadır. Thirunavukkarasu ve arkadaşlarının 2011 yılında deniz kaynaklı funguslarla yaptığı çalışmada 82 izolattan 64 (%78.04)'ünün hücre dışı L-asparajinaz için pozitif olduğu görülmüştür. Bu izolatların büyük çoğunluğunun *Aspergillus* sp. olduğu bunun yanında *Fusarium*, *Penicillium* ve *Cladosporium* cinslerine ait suşlar olduğu da bildirilmiştir. Benzer şekilde **bu tez çalışmasında da seçilen 4 aday suş *Penicillium crustosum* (MF5), *Penicillium canascens* (MF20), *Cladosporium cladosporioides* (MF75) ve *Aspergillus flavus* (MF10)'tur.** Aynı zamanda hücre dışı asparajinaz çalışılan diğer çalışmalarda da çoğunlukla *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* genuslarının rapor edildiği görülmektedir (Micu et al., 2020; Muneer et al., 2020).

Tez çalışmasında ileri aşamaya *A. flavus* asparajinazı ile devam edilmiştir. Bu nedenle buradan sonra tartışmada *Aspergillus* türlerine öncelik verilmiştir. *Aspergillus* türleri arasında L-asparajinaz için çoğunlukla *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae* ile yapılan çalışmalar dikkat çekmektedir (Luhana et al., 2013; Dias et al., 2016; Da Cunha et al., 2021). *Aspergillus* türleri, bir veya daha fazla aflatoksin üretebilmektedir ve aflatoksin üreten türlerin çoğu *Flavi* bölümünde bulunmaktadır. Ancak *Flavi* bölümündeki tüm türler aflatoksin üretmez; *A. caelatus*, *A. oryzae*, *A. tamarii* ve *A. sojae* (Frisvad et al., 2018). *A. flavus* doğada yaygın olarak bulunur ve skleroit boyutuna göre 2 sınıfa (L suşu ve S suşu) ayrılmaktadır. Her iki suş B1 ve B2

aflatoksinleri üretir ayrıca S suşları aflatoksin G1 ve G2' yi üretebilmektedir (Amaike and Keller, 2011). *A. flavus*, mikotoksin üreterek, tarla ekinlerine zarar verir ve insanlarda enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Ancak tüm *A. flavus* suşları aflatoksin üretmez. Aflatoksin yolundaki genlerde doğal olarak meydana gelen mutasyonlar veya gen kayıpları ile genetik olarak aflatoksin üretimi inhibe edilir (Moore et al., 2021). Örneğin iki aflatoksijenik olmayan *A. flavus* suşu (AF36 ve NRRL 21882) şu anda biyokontrol ajanı olarak ABD Çevre Koruma Ajansı tarafından kayıtlanmıştır (Chang et al., 2019). *A. flavus* aflatoksinlere ek olarak birçok sekonder metabolit üretir ve bu bilinmeyen sekonder metabolitler potansiyel farmasötik kullanım için araştırılabilir. Daha da önemlisi *A. flavus* çok sayıda karmaşık organik polimeri parçalayabilir (Cleveland et al., 2009). *A. flavus* NRRL 3357 ve onunla yakından ilişkili genomlarında yakın dizi benzerliği olan *A. oryzae* RIB 40'taki gen ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve selülozik enzimleri kodlayan *A. flavus* genlerinin *A. oryzae*' den iki kat daha yüksek düzeyde eksprese ettiği gösterilmiştir. Bu yüksek düzeyde eksprese edilen genler amilaz, glukanaaz, ksilenaz, kitinaz, hidrolaz proteinlerini kodlayan dizileri içermektedir. Her iki türde de aynı genler bulunsa da *A. flavus*'un bu genleri daha yüksek seviyede ifade edebildiğini göstermiştir (Cleveland et al., 2009). *A. flavus*'tan α -amilaz, pektinaz, proteaz, glukoamilaz, ksilanaz, proteinaz, selülaz ve lipaz gibi çeşitli enzimlerin üretimi rapor edilmiştir (Rhodes et al., 1990; Abou-Zeid et al., 1997; Gomes et al., 2005; Oyeleke et al., 2010; Guimaraes et al., 2013). Farklı yıllarda yapılan farklı çalışmalarda *A. flavus* 'tan L-asparajinaz izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Shrivastava et al., 2010; Patro et al., 2014; Pendharkar et al., 2021) Tüm bunların yanında *A. flavus* çeşitli enzimler için gen kaynağı olarak kullanılarak enzimlerin rekombinant üretimler gerçekleştirilebilir. Örneğin günümüzde lösemi tedavilerinde kullanılan Rasburikaz, *A. flavus* suşundan ürikazı kodlayan tamamlayıcı DNA (cDNA)'nın modifiye edilmiş bir *Saccharomyces cerevisiae* şusunda eksprese edilmesi ile üretilir. Bu şekilde rekombinant üretilen ilaç, lösemi gibi hematolojik kanserler için kemoterapi alan hastalarda tümör lizis sendromunun önlenmesi ve bu nedenle ortaya çıkan gut ve hipergliseminin tedavisi amacıyla ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından kullanımı onaylanmıştır (Ueng, 2005; İmani and Shahmohamadnejad, 2017). Ayrıca kullanılan ilacın yan etkilerinin azaltılması amacıyla *A. flavus* ürikazının farklı konakçılarda ekspresyonu denenmektedir (Fazel et al., 2014). **Tez kapsamında üreaz içermeyen ve düşük glutaminaz aktivitesine sahip nitelikli bir L-asparajinaz üreticisi olan *A. flavus*'un asparajinaz bağlamında önemli bir kaynağı olduğu düşünülmektedir.**

L-asparajinazın glutaminaz ve üreaz aktivitesi de göstermesi bazı dezavantajları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle tez kapsamında L-asparajinaz aktivitesi ile birlikte fungal izolatların glutaminaz ve üreaz aktiviteleri de değerlendirilmiştir. L-asparajinazlarda bulunan ikincil aktivite glutaminin hidrolizine neden olan glutaminaz aktivitesidir. Bazı çalışmalarda optimal asparajin deaminasyonu için glutamin deaminasyonunun gerekli olduğunu gösterilmiştir ancak daha yakın tarihli diğer çalışmalar, L-glutaminaz aktivitesinin, lösemik hücreler üzerinde L-asparajinazın sitotoksitesine katkısını göstermiştir (Nguyen et al., 2018). Hem asparajinin hem de glutaminin hidroliziyle açığa amonyak çıkar. Glutamin vücutta en fazla bulunan aminoasitlerden biri olduğundan hidrolizi sonrası ortaya çıkan amonyak miktarının kandaki konsantrasyon üzerinde daha derin bir etkisi olur. Bu da hastalarda hiperamonyemiye neden olmaktadır. Glutamin hidrolizi ile ortaya çıkan glutamat hastalar üzerinde ekstrasvasküler sistemde toksisiteye yol açarken üreaz aktivitesi ise baş ağrısından komaya kadar çeşitli rahatsızlıklarla sonuçlanan kanda yüksek amonyak seviyelerine yol açmaktadır (Prakash et al., 2020a; Chakraborty and Shivakumar, 2021). Glutaminaz ve üreaz gibi enzimlerin birleşmesi ile meydana gelen bu yan etkilerin ortadan kaldırılması için ilave saflaştırma basamakları gerekmektedir (Ashok et al., 2019). Bu nedenle son yıllarda düşük glutaminaz ve üreaz aktivitesi gösteren veya glutaminaz ve üreaz aktivitesi göstermeyen L-asparajinaz kaynaklarının belirlenmesi konusunda çalışmalar önem kazanmıştır. 2019 yılında Ashok ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 33 farklı çevreden toplanan 55 fungus izolatu arasında 30 tanesinin glutaminaz ve üreaz içermeyen L-asparajinaz üreticisi oldukları belirlenmiştir. 2021 yılında ise Arumugam ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Chaetomium* sp., tarafından üretilen L-asparajinaz enziminin glutaminaz ve üreaz içermediği belirlenmiştir. Bu L-asparajinazın insan kan kanseri (MOLT-4) hücreleri üzerinde antikanser aktivite sergilediği gösterilmiştir (Arumugam et al., 2021). **Tez kapsamında hızlı tarama testlerinde glutaminaz aktivitesi göstermeyen 10 izolat (MF17, MF20, MF27, MF35, MF36, MF37, MF39, MF52, MF75 ve MF91) ve üreaz aktivitesi göstermeyen 8 izolat (MF12, MF20, MF36, MF58, MF70, MF71, MF75 ve MF91) tespit edilmiştir.** Her iki enzim aktivitesini de göstermeyen ortak türler *Penicillium canascens* MF20 ve *Cladosporium cladosporioides* MF75 küçük ölçek fermantasyon çalışmaları için seçilmiştir. Ancak bu türlerden elde edilen L-asparajinazın küçük ölçek fermantasyon çalışmalarında yüksek miktarda üretilmemesi sonucunda çalışmalara A.

flavus MF10 ile devam edilmiştir. ***A. flavus* MF10 tarafından üretilen L-asparajinaz fermantasyon ortamı ile yapılan enzim aktivitesi belirlenmesinde glutaminaz ve üreaz aktivitesine rastlanmamıştır. Konsantre enzim (37,16 U/mL) ile yapılan çalışmada düşük glutaminaz aktivitesine (L-asparajinaz aktivitesinden yaklaşık 30 kat daha az, 1,27 U/mL) rastlanırken üreaz aktivitesine rastlanmamıştır. Bu durum *A. flavus* MF10'dan üretilen L-asparajinazın potansiyel bir ilaç kaynağı olabileceğini göstermektedir.** Mahajan ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yayınlanan bir çalışmada düşük glutaminaz aktivitesi gösteren L-asparajinazın akut lösemi tedavisinde potansiyel ilaç olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir (Mahajan et al., 2014). Yapılan diğer bir çalışmada düşük glutaminaz koaktivitesine sahip L-asparajinazın *in vivo* hem T hem B hücreli akut lenfolastik lösemilere karşı oldukça etkili olduğu belirlenmiştir. Bu enzimin FDA tarafından onaylanan ilaç tedavisinde kullanılan yüksek glutaminaz aktiviteli L-asparajinaz enzimlerine göre daha az toksik olduğu rapor edilmiştir (Nguyen et al., 2018).

Funguslardan elde edilen L-asparajinazlar yaygın olarak hücre dışı üretilir. Bu durum alt akım proseslerini kolaylaştırmaktadır (Qeshmi et al., 2018; Chand et al., 2020; Wang et al., 2021). Bu nedenle L-asparajinaz aktivitesinin belirlenmesinde fungal kaynaklarla çalışılan denemelerde genelde hücre dışı enzim aktivitesine odaklanılmıştır (Qeshmi et al., 2018). Bu tez kapsamında hızlı plaka yöntemi sonrasında seçilen fungal izolatlarda ilk olarak hücre dışı enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda hücre dışı en yüksek enzim aktivitesi gösteren *A. flavus* MF10 türünde hücre içi enzim aktivitesi de değerlendirilmiştir. ***A. flavus* MF10 kullanılarak yapılan küçük ölçek fermantasyonu sonucunda hücre dışı enzim aktivitesi 2.77 U/mL iken, hücre içi aktivitesi 0,534 U/mL olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmalara hücre dışı enzim aktivitesi ile devam edilmiştir. İkinci aşamada 150 mL fermantasyon ortamı kullanılarak gerçekleştirilen L-asparajinaz üretimi sonrası ultrafiltrasyonun ve aseton ile çöktürmenin ardından enzim aktivitesi 53,92 U/mL olarak ölçülmüştür.** Literatürde funguslar ile yapılan L-asparajinaz çalışmalarında farklı enzim aktivite değerleri belirlenmiştir. Dias ve Sato tarafından 2016 yılında *Aspergillus oryzae* CCT 3940 ile yapılan çalışmada enzim aktivitesi 67.49 U/mL olarak belirlenmiştir (Dias and Sato 2016). *Aspergillus terreus* MTCC 1782 ile yapılan bir çalışma da enzim aktivitesi 33.25 U/mL olarak rapor edilmiştir (Baskar et al., 2010). *Cladosporium* ile yapılan bir çalışmada 3.74 U/ mL olarak belirlenmiştir (Kumar and Manonmani, 2013).

L-asparajinaz aktivitesinin test edilmesi amacıyla nitel ve nicel teknikler kullanılmaktadır. Aktivitenin belirlenmesi için, reaksiyon sırasında çıkan amonyanın ölçümüne dayanan spektrofotometrik, kinetik enzimatik yöntem olan gaz algılama elektrodu, kağıt elektroforezi, kromatografi gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir. Ancak kinetik enzimatik yöntemin pahalılığı, kağıt elektroforezi ve kromatografinin zaman alıcı olması nedeniyle L-asparajinaz aktivitesinin tayininde Nesslerizasyon yöntemi yaygın kullanılmaktadır (Batool et al., 2016; Souza et al., 2017). Bu yöntem asparajinazın asparajini hidroliz etmesi sonucunda ortama salınan amonyanın Nessler reaktifi ile ölçülmesine dayanmaktadır (Imada et al., 1973). Yaygın olarak nesslerizasyon yöntemiyle yapılan spektrofotometrik deneyler iyi kurulmuş olup iyi tekrarlanabilir sonuçlar verse de titiz bir çalışma gerektirir. Aynı zamanda Nessler'in duyarlılığından dolayı aynı numunenin analiz edildiği farklı laboratuvarlarda aktivite değerlerinde farklılıklar çıkabilmektedir bu durum da L-asparajinaz aktivite miktarının olduğundan farklı tahmin edilmesine yol açabilir (Batool et al., 2016; Souza et al., 2017). Co^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ve Ni^{2+} tuzlarının Nessler reaktifi ile etkileşime girip amonyak miktar tayinine etki ettiği, Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mo^{2+} , Na^{+} ve Zn^{2+} tuzlarının ise amonyak miktarını etkilemediği belirlenmiştir (Simas et al., 2021). Tez çalışmasında tüm pipetlemeler çok dikkatli yapılmış ve en az üç en fazla 9 tekrarlı olarak enzim aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Makromoleküllerin immünojenikliği, molekülün moleküler ağırlığı, kimyasal karmaşıklığı ve homojenliği ile yakından ilişkilidir. 6 kDa'dan büyük olan bileşikler immünojenik olarak adlandırılırlar (Krishnapura et.al., 2016). Farklı mikroorganizmalardan ve suşlardan elde edilen L-asparajinazların moleküler ağırlıklarındaki değişimler fazladır (Krishnapura et. al., 2016). Dolayısıyla farklı kaynaklardan elde edilen L-asparajinazın özellikleri ve immünojenitesi farklılık gösterir. Literatürde farklı fungal kaynaklarla elde edilen L-asparajinazın 25 ila 133.7 kDa arasında olduğu belirlenmiştir (Da Cunha et al., 2018). *A. flavus* ile yapılan bir çalışmada saflaştırılmış enzimin moleküler ağırlığı 100 kDa olarak belirlenmiştir (Patro et al., 2014). **Benzer şekilde çalışmamızda *A. flavus* MF10 aseton çöktürme sonrası 100 kDa yakın değerlerde bir bant elde edilmiştir. Bu bandın L-asparajinaza ait olduğu düşünülmektedir.** *Chaetomium* sp. ile 2022 yılında yapılan bir çalışmada kısmi saflaştırılmış L-asparajinazın yaklaşık 66 kDa olduğu tespit edilmiştir (Arumugam and Thangavelu, 2022). *Fusarium equiseti* AHMF4 türü kullanılarak yapılan çalışmada L-

asparajinazın moleküler ağırlığı 45.7 kDa olarak belirlenmiştir (El-Gendy et al., 2021). Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında *A. niger*, *Aspergillus* sp., *A. oryzae* CCT 3940, *A. terreus*, *A. fumigatus* türlerinin moleküler ağırlıkları sırasıyla, 136 kDa, 25 ve 31 kDa, 115 kDa, 85 kDa ve 35 kDa olarak belirlenmiştir (Rahiman et al., 2014; Abbas Ahmed et al., 2015; Dange and Peshwe, 2015; Dutta et al., 2015; Dias et al., 2016; Hassan et al., 2018).

L-asparajinaz'ın karakterizasyon çalışmaları sonucunda enzimin 40°C'de optimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir, sıcaklık miktarı arttıkça enzim aktivitesi düşmektedir. Benzer şekilde deniz kaynaklı *A. terreus* ile yapılan bir çalışmada optimum sıcaklık 40°C olarak rapor edilmiştir aynı zamanda sıcaklık artışıyla enzim aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Hassan et al., 2018). 2015 ve 2021 yıllarında yapılan çalışmalar sonucunda *A. niger* ve *Chaetomium* sp.'den elde edilen enzimin optimum sıcaklığı 40°C olarak belirlenmiştir (Dange and Peshwe, 2015; Arumugam et al., 2021). *Aspergillus* türleri ile yapılan diğer çalışmalarda optimum sıcaklığın genelde 40-50°C olduğu rapor edilmiştir (Patro et al., 2014; Abbas Ahmet et al., 2015; Dutta et al., 2015; Dias et al., 2016).

Karakterizasyon çalışmaları sonucunda L-asparajinaz'ın pH 7,0-8,0 değerlerinde yüksek aktivite gösterdiği görülmektedir. Optimum pH değeri 8 olarak belirlenmiştir. Dias ve arkadaşları tarafından 2016 yılında *A. oryzae* CCT 3940 ile yapılan çalışmada optimum pH 8,0 olarak rapor edilmiştir (Dias et al., 2016). Benzer şekilde *Penicillium brevicompactum* NRC 829'den elde edilen L-asparajinazın optimum pH değeri 8 olarak belirlenmiştir (El-Shafei et al., 2012). Patro ve arkadaşları tarafından *A. flavus* ile yapılan çalışmada asparajinaz aktivitesi için optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir (Patro et al., 2014). *A. niger* ile yapılan başka bir çalışmada da optimum pH 7,0 olarak belirlenmiştir (Vala et al., 2018). *F. equiseti* AHMF4, *Penicillium* sp., *P. digitatum*, *Chaetomium* sp., *Mucor hiemalis*, *Trichoderma viride* gibi farklı fungus kaynakları ile yapılan çalışmalarda da bu enzim için optimum pH değeri 7,0 olarak rapor edilmiştir (Patro and Gupta, 2012; Shrivastava et al., 2012; Thakur et al., 2014; Lincoln et al., 2015; Arumugam et al., 2021; El-Gendy et al., 2021). Fungal organizmalardan elde edilen asparajinazın optimum pH değerinin genel olarak 7-8 olduğu görülmektedir. Elde ettiğimiz optimum pH değerinin literatür çalışmaları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Enzimin termal stabilitesinin değerlendirilmesi sonucunda 20°C’de bir saat bekletilmesinin ardından aktivitesini %99,30 oranında koruduğu belirlenmiştir. Enzim 50°C’de aktivitesini %59,7 oranında korumuştur. Dias ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan çalışmada çeşitli *Aspergillus* türleri ile çalışılmış ve her *Aspergillus* türünden elde edilen enzimin bir saat 20°C’de enzim aktivitesini koruduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda *A. oryzae* LBA 01’in 50°C’de bir saat bekletilmesiyle enzim aktivitesinin bu tez çalışmasındakine uyumlu bir şekilde %60 oranında korunduğu rapor edilmiştir. Bu tez kapsamında *A. flavus*’tan elde edilen enzimin 60°C’de aktivitesini %35 oranında koruduğu görülmüştür. Benzer olarak *A. oryzae* LBA 01 ve *A. oryzae* CCT 3940 türleri enzim aktivitelerini 60°C’de %20-40 oranında koruduğu belirlenmiştir (Dias et al., 2019).

Enzimin pH stabilitesinin belirlenmesi çalışmasında farklı tamponlarda bir saat ön inkübasyon sonrasında nötr ve baza yakın pH (8) değerlerinde daha kararlı olduğu görülmektedir. pH 7,0 değerinde enzim aktivitesinin %98,7 oranında korunduğu belirlenmiştir. El-Gendy ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Fusarium equiseti* AHMF4 tarafından üretilen enzimin aktivitesini pH 7,0’de (%100) koruduğu gözlenmiştir. Benzer olarak başka bir çalışmada *A. oryzae* LBA 01 ve *A. niger* LBA 02’nin pH 7,0 ve 9,0 aralığında oldukça stabil olduğu rapor edilmiştir (Dias et al., 2019). **Bu tez çalışmasında pH 8’de stabilitesini %100 oranında koruyan asparajinazın, optimum aktiviteyi pH 8’de göstermesi ile de uyumlu olduğu görülmektedir.** Bu çalışmayı doğrular nitelikte *A. terreus* KLS2 ile yapılan çalışmada enzim aktivitesinin alkali pH’ta (8,0) 30 dakika ve 60 dakika inkübasyon sonrası %100’ünü koruduğu rapor edilmiştir (Siddalingeshwara and Lingappa, 2011).

Çalışma kapsamında LNCaP, SH-SY5Y, olmak üzere 2 farklı kanser hücre hattında ve L929 ile HaCaT olmak üzere 2 farklı sağlıklı hücre hattında L-asparajinaz enziminin hücre canlılığına etkisi incelenmiştir. Sitotoksikite analizi sonucuna 24 saat sonrasında sonuçlara bakıldığında kanser hücreleri içinde hücre canlılığı en çok etkilenen SH-SY5Y hücreleri olmuş ve 100 µg enzim/mL ile hücre canlılığı %43’e düşmüştür. İlk 4 konsantrasyonda kontrole göre anlamlı şekilde hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir. LNCaP hücrelerinde ise 100 µg enzim/mL’de canlılığı %61’e düşürmüştür. İlk iki konsantrasyonda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde hücre canlılığının düştüğü gözlenmiştir. Sağlıklı hücre hatlarında ise L929 hiçbir L-asparajinaz enzim

konsantrasyon uygulamasından etkilenmeyerek hücre canlılığını korumuştur. HaCaT hücresi ise en yüksek enzim konsantrasyonundan etkilenerek hücre canlılığı %63 olarak belirlenmiştir. 50 µg enzim/mL'de kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmişse hücre canlılığı açısından kabul edilebilir düzeydedir. 2011 yılında yapılan bir çalışmada *A. flavus*'tan kısmen saflaştırılmış olan L-asparajinazın farklı konsantrasyonları MTT testi ile MCF7 (meme kanser hücre hattı) üzerinde test edilmiştir. 1.953 µg/mL konsantrasyonda %4,78'lik minimum etki, 1000 µg/mL' de ise maximum inhibisyon (%67.85) gözlenmiştir (Rani et al., 2011). *Fusarium equiseti* AHMF4 tarafından üretilen hücre dışı L-asparajinaz enziminin HeLa (insan rahim ağzı kanser hücre hattı), Hep-2 (larenks karsinoma hücre hattı), HCT-116 (insan kolorektal kanser hücre hattı), HepG-2 (insan hepatoselüler karsinoma hücre hattı) ve MCF-7 insan kanser hücre hatları üzerinde etkileri değerlendirilmiştir. Sağlıklı hücre olarak WI-38 hücre hattı kullanılmış ve 100 µg/mL konsantrasyondan 5 µg/mL'ye L-asparajinaz uygulaması yapılmıştır. MCF-7'nin diğer kanser hücre hatlarına göre daha dirençli olduğu görülmüştür. HeLa hücre hattında 10 µg/mL L-asparajinaz uygulamasında hücre canlılığı kalmamıştır. Bu kaynaktan üretilen L-asparajinaz insan normal hücreleri olan WI-38'e karşı zayıf sitotoksikite göstermiştir (El-Gendy et al., 2021). El-Gendy ve arkadaşları tarafından 2017 tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise HCT-116 ve HEPG-2 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda (2,5,10,15,20,30 µg/mL) L-asparajinaz uygulanmıştır. *A. nomius* tarafından üretilen L-asparajinazın sitotoksikitesine A549 hücre hattı üzerinde bakılmıştır en yüksek sitotoksik etki 160 µg/mL konsantrasyonda belirlenmiştir (Prabavathy, 2020). *Chaetomium* sp. tarafından üretilen L-asparajinaz MOLT-4 (insan T hücre lenfoblastı; akut lenfoblastik lösemi) hücre hattı üzerinde 72 saat uygulanması sonrası 12.13 µM'dan yüksek konsantrasyona maruz kalan hücrelerin canlılığında dikkate değer bir düşme olduğu rapor edilmiştir (Arumugam et al., 2021). **Çalışmamızda da kısmi saflaştırılan enzim preparatının kanser hücre hattında etkileri olduğu gösterilmiş sitotoksikite standart yönteminde kullanılan L929 sağlıklı hücre hattını etkilemediği ancak HaCaT hücre hattı üzerinde hücre canlılığını etkilediği belirlenmiştir.**

Bu tez çalışmasında 94 adet deniz kaynaklı fungus izolatının %95'inin L-asparajinaz üreticisi olduğu bunların %67'sinin (63 adet) renk skalasına göre güçlü üretici, %20'sinin (19 adet) ise zon indeksine göre iyi üretici olduğu belirlenmiştir. İzolatların %11'inin glutaminaz negatif (10 adet), %8,5'inin üreaz negatif (8 adet)

ve %4.2'sinin glutaminaz ve üreaz negatif (4 adet) L-asparajinaz üreticisi olduğu belirlenmiştir. Deniz suyu varlığı enzim aktivitesinde belirgin bir artışa neden olmamıştır. Seçilen *A. flavus* MF10 suşu ile üretilen enzimin üreaz negatif ve düşük glutaminaz aktivitesi gösterdiği, 100 kDa boyutunda optimum 40°C ve pH 8'de etkin olduğu, 40°C'de aktivitesinin %70'ini koruduğu, pH 7 ve 8 de stabil olduğu belirlenmiştir. SH-SY5Y ve LNCap kanser hücre hatlarında hücre canlılığının -100 µg protein/mL'de - %43 ve %61'e düştüğü belirlenmiştir. Enzim preparatı L929 hücrelerinde sitotoksik etki göstermezken HaCaT hücrelerinde en yüksek konsantrasyonda sitotoksik etki göstermiştir.



6. ÖNERİLER

- Seçilen izolatlar ile biyoproses optimizasyonu yapılarak üretim verimi arttırılabilir.
- Daha ileri saflaştırma adımları gerçekleştirilerek farklı inhibitör ve aktivatörlerin enzim üzerindeki etkileri belirlenebilir.
- Enzimin pegilasyon işlemi gerçekleştirilerek immunojenite veya yarı ömrü arttırma çalışmaları yapılabilir.
- *In vivo* çalışmalar gerçekleştirilebilir
- *A. flavus* MF10 asparajinaz gen kaynağı olarak kullanılarak rekombinant protein üretimi planlanabilir.
- Diğer aday üreticiler ile L-asparajinaz üretim çalışmaları gerçekleştirilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbas Ahmed, M. M., Dahad, F. N. A., Taha, M. T., and Hassan, S. M. F.,** 2015, Production, purification and characterization of L-asparaginase from marine endophytic *Aspergillus* sp. ALAA-2000 under submerged and solid state fermentation, *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7:165-172pp.
- Abd El Baky, H.H. and El Baroty, G.S.,** 2016, Optimization of growth conditions for purification and production of l-asparaginase by *Spirulina maxima*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*.
- Abou-Zeid, A. M.,** 1997, Production, purification and characterization of an extracellular alpha-amylase enzyme isolated from *Aspergillus flavus*, *Microbios*, 89(358):55-66pp.
- Adebo O.A., Kayitesi E., Adebisi J.A., Gbashi S., Temba M.C., Lasekan A, Phoku J.Z., Njobeh PB.,** 2017, Mitigation of acrylamide in foods: an African perspective. *Acrylic Polym Healthc* (<https://www.intechopen.com/chapters/55285>) (Erişim Tarihi: 07.11.21)
- Aghaiypour, K., Wlodawer, A. and Lubkowski, J.,** 2001, Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* l-asparaginase, *Biochemistry*, 40(19):5655-5664pp.
- Ahmed, M. M., Dahad, F. N. A., Taha, M. T. and Hassan, S. M. F.,** 2015, Production, purification and characterization of L-asparaginase from marine endophytic *Aspergillus* sp. ALAA-2000 under submerged and solid state fermentation, *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7, 165-172pp.
- Ali, D., Ouf, S., Eweis, M. and Solieman, D.,** 2018, Optimization of l-asparaginase production from some filamentous fungi with potential pharmaceutical properties, *Egyptian Journal of Botany*, 58(3):355-369pp.
- Amaike, S., and Keller, N. P.,** 2011, *Aspergillus flavus*, *Annual review of phytopathology*, 49:107-133pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ardalan, N., Sepahi, A. A. and Khavari-Nejad, R. A.,** 2020, Development of *Escherichia coli* asparaginase II for the Treatment of Acute Lymphocytic Leukemia: In Silico Reduction of asparaginase II Side Effects by a Novel Mutant (V27F), *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*,22(4):1137.
- Arumugam, N., and Thangavelu, P.,** 2022, Purification and anticancer activity of glutaminase and urease free intracellular l-asparaginase from *Chaetomium* sp, *Protein Expression and Purification*, 190:106006.
- Arumugam, N., Shanmugam, M. K., and Thangavelu, P.,** 2021, Purification and anticancer activity of glutaminase and urease-free l-asparaginase from novel endophyte *Chaetomium* sp, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1-6pp.
- Ashok, A., Doriya, K., Rao, J.V., Qureshi, A., Tiwari, A.K. and Kumar, D.S.,** 2019, Microbes producing l-asparaginase free of glutaminase and urease isolated from extreme locations of antarctic soil and moss, *Scientific reports*,9(1):1-10pp.
- Asselin, B., and Rizzari, C.,** 2015, Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring, *Leukemia & lymphoma*, 56(8):2273-2280pp.
- Asselin, B.L., Kreissman, S., Coppola, D.J., Bernal, S.D., Leavitt, P.R., Gelber, R.D. and Cohen, H.J.,** 1999, Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia, *Journal of pediatric hematology/oncology*, 21:6-12pp.
- Asselin, B.L., Ryan, D., Frantz, C.N., Bernal, S.D., Leavitt, P., Sallan, S.E. and Cohen, H.J.,** 1989, *In vitro* and *in vivo* killing of acute lymphoblastic leukemia cells by l-asparaginase, *Cancer research*, 49(15):4363-4368pp.
- Asselin, B.L., Whitin, J.C., Coppola, D. J., Rupp, I.P., Sallan, S.E. and Cohen, H.J.,** 1993, Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations, *Journal of Clinical Oncology*, 11(9):1780-1786pp.
- Asthana, N. and Azmi, W.,** 2003., Microbial l-asparaginase: A potent antitumour enzyme, *Indian Journal of Biotechnology*, 2:184-194pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Avramis, V.I. and Panosyan, E.H.**, 2005, Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of asparaginase formulations, *Clinical pharmacokinetics*, 44(4):367-393pp.
- Baruch, M., Belotserkovsky, I., Hertzog, B.B., Ravins, M., Dov, E., McIver, K.S., Le Breton, Y.S., Zhou, Y., Cheng, C.Y. and Hanski, E.**, 2014, An extracellular bacterial pathogen modulates host metabolism to regulate its own sensing and proliferation, *Cell*, 156:97-108pp.
- Baskar, G., Sriharini, C., Sripriya, R., & Renganathan, S.**, 2010, Statistical screening of supplementary nitrogen source for enhanced production of L-Asparaginase by *Aspergillus terreus* 1782. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 24(4), 467-472pp.
- Batool, T., Makky, E.A., Jalal, M. and Yusoff, M.M.**, 2016, A comprehensive review on L-asparaginase and its applications, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(5):900-923pp.
- Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D. and Seaman, S.W.**, 2003, Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3):802-808pp.
- Bedaiwy, M., Awadalla, O., Abou-Zeid, A. and Hamada, H.**, 2016, Optimal conditions for production of L-asparaginase from *Aspergillus tamaru*, *The Egyptian Society of Experimental Biology*, 12(2): 229 – 237pp.
- Benchamin, D., Sreejai, R., Sujitha, S., Jency Roshan, F., Albert, C., and Rishad, K.S.**, 2019, Anti-proliferative activity of l-asparaginase enzyme from fungi on breast cancer, *Journal of Pharmacognosy Phytochemistry*, 8(1):407-10pp.
- Bennett, S.**, 2007, An overview of the genus *Aspergillus*. *The Aspergilli*, 23-34pp.
- Boyse, E.A., Old, L.J., Campbell, H.A. and Mashburn, L.T.**, 1967, Suppression of murine leukemias by l-asparaginase: incidence of sensitivity among leukemias of various types: comparative inhibitory activities of guinea pig serum l-asparaginase and *Escherichia coli* l-asparaginase, *The Journal of Experimental Medicine*, 12(51):17-31pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bradford, M.**, 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72 (1–2): 248–254pp. doi:10.1006/abio.1976.9999
- Broome, J.D.**, 1963., Evidence that the l-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects: I. properties of the l-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance, *Journal of Experimental Medicine*, 118(1):99-120pp.
- Cachumba, J.J.M., Antunes, F.A.F., Peres, G.F.D., Brumano, L.P., Dos Santos, J.C. and Da Silva, S.S.**, 2016, Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production, *Brazilian Journal of Microbiology*, 47:77-85pp.
- Campbell, H.A. and Mashburn, L.T.**, 1969, L-Asparaginase ec-2 from *Escherichia coli*. some substrate specificity characteristics, *Biochemistry*, 89:3768-3775pp.
- Campbell, H.A., Mashburn, L.T., Boyse, E.A. and Old, L.J.**, 1967, Two L-asparaginases from *Escherichia coli* their separation, purification, and antitumor activity, *Biochemistry*, 6(3):721-730pp.
- Chakraborty, M., & Shivakumar, S.**, 2021, Bioprospecting of the agaricomycete *Ganoderma australe* GPC191 as novel source for l-asparaginase production, *Scientific Reports*, 11(1):1-8pp.
- Chand, S., Mahajan, R.V., Prasad, J.P., Sahoo, D.K., Mihooliya, K.N., Dhar, M.S. and Sharma, G.**, 2020, A comprehensive review on microbial l-asparaginase: bioprocessing, characterization, and industrial applications, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1-29pp.
- Chang, P. K.**, 2019, Genome-wide nucleotide variation distinguishes *Aspergillus flavus* from *Aspergillus oryzae* and helps to reveal origins of atoxigenic *A. flavus* biocontrol strains, *Journal of Applied Microbiology*, 127(5), 1511-1520.
- Chohan, S.M., and Rashid, N.**, 2013, TK1656, Athermostable L-asparaginase from *Thermococcus kodakaraensis*, exhibiting highest ever reported enzyme activity, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116:438–443pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chow, Y. and Ting, A. S.**, 2015, Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties, *Journal of Advanced Research*, 6(6):869-876pp.
- Clavell, L.A., Gelber, R.D., Cohen, H.J., Hitchcock-Bryan, S., Cassady, J.R., Tarbell, N.J., Blattner, S.R., Tantravahi, R., Leavitt, P. and Sallan, S.E.**, 1986, Four-agent induction and intensive asparaginase therapy for treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia, *New England Journal of Medicine*, 315(11):657-663pp.
- Clementi, A.**, 1922, La désamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa présence dans l'organisme, *Archives Internationales de Physiologie*, 19(4):369-398pp.
- Cleveland, T. E., Yu, J., Fedorova, N., Bhatnagar, D., Payne, G. A., Nierman, W. C., & Bennett, J. W.**, 2009, Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. *Trends in biotechnology*, 27(3), 151-157pp.
- Costa-Silva, T. A., Flores-Santos, J. C., Freire, R. K., Vitolo, M., & Pessoa-Jr, A.**, 2018, Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(8):707-717pp.
- Da Cunha, M. C., Aguilar, J. G. D. S., Orrillo Lindo, S. M. D. R., De Castro, R. J. S., & Sato, H. H.**, 2021, L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* spp.: effects of production process and biochemical parameters, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 1-11pp.
- Da Cunha, M. C., dos Santos Aguilar, J. G., de Melo, R. R., Nagamatsu, S. T., Ali, F., de Castro, R. J. S., & Sato, H. H.**, 2019, Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications. *Food Research International*, 126, 108658.
- Dange, V. and Peshwe, S.**, 2015, Purification and biochemical characterization of l-asparaginase from *Aspergillus niger* and evaluation of its antineoplastic activity, *International Journal of Science and Research*, 4(2):564-569pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Deokar, V.D., Vetal, M.D., Rodrigues L.,** 2010, Production of intracellular l-asparaginase from *Erwinia carotovora* and its statistical optimization using response surface methodology (Rsm), *International Journal of Chemical Sciences*, 1(1):25–36pp.
- Deshpande, N., Choubey, P., Agashe, M.,**2014, Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*, *The Scientific World Journal*, 2014:1–6pp.
- Dharmaraj, S.,** 2011, Study of L-asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*, *Iranian Journal of Biotechnology*, 9:102-108pp.
- Dias, F. F., & Sato, H. H.,** 2016, Sequential optimization strategy for maximum l-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 6:33-39pp.
- Dias, F.F.G., dos Santos Aguilar, J.G. and Sato, H.H.,** 2019, L-Asparaginase from aspergillus spp.: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization, *3 Biotech*, 9:289pp.
- Dias, F.F.G., Ruiz, A.L.T.G., Della Torre, A. and Sato, H.H.,** 2016, Purification, characterization and antiproliferative activity of l-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9):785-794pp.
- Dinndorf, P.A., Gootenberg, J., Cohen, M.H., Keegan, P. and Pazdur, R.,** 2007, Regulatory issues: FDA, *The oncologist*, 12:991-998pp.
- Dutta, S., Ghosh, S., & Pramanik, S.,** 2015, L-asparaginase and L-glutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and some physicochemical properties, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(4):425-431pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Duval, M., Suci, S., Ferster, A., Rialland, X., Nelken, B., Lutz, P., Benoit, Y., Robert, A., Manel, A.M., Vilmer, E., Otten, J. and Philippe, N.,** 2002, Comparison of *Escherichia coli*–asparaginase with erwinia-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized european organisation for research and treatment of cancer—children's leukemia Group phase 3 trial, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 99(8):2734-2739pp.
- Ebrahiminezhad, A., Rasoul-Amini, S., Ghoshoon, M.B. and Ghasemi, Y.,** 2014, *Chlorella vulgaris*, a novel microalgal source for L-asparaginase production, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2):214-217pp.
- Edens, L., Dekker, P., Van Der Hoeven, R., Deen, F., de Roos, A., & Floris, R.,** 2005, Extracellular prolyl endoprotease from *Aspergillus niger* and its use in the debittering of protein hydrolysates, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20):7950-7957pp.
- El-Gendi, H., Saleh, A.K., Badierah, R., Redwan, E.M., El-Maradny, Y.A. and El-Fakharany, E.M.,** 2022, A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges, *Journal of Fungi*, 8(1), 23.
- El-Gendy, M.M.A.A., Awad, M.F., El-Shenawy, F. S. and El-Bondkly, A.M.A. ,** 2021, Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4):2540-2548pp.
- El-Naggar, N.E.A., El-Ewasy, S.M. and El-Shweihy, N.M.,** 2014, Microbial l-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: the pros and cons, *International Journal of Pharmacology*, 10(4):182-199pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- El-Shafei, A.M. and El-Ghonemy, D.H.**, 2015, Screening and media optimization for enhancing L-asparaginase production, an anticancer agent, from different filamentous fungi in solid state fermentation, *Biotechnology Journal International*, 1-15pp.
- Farag, A. M., Hassan, S. W., Beltagy, E. A., & El-Shenawy, M. A.**, 2015, Optimization of production of anti-tumor l-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*, *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41(4):295-302pp.
- Fazel, R., Zarei, N., Ghaemi, N., Namvaran, M. M., Enayati, S., Ardakani, E. M., ... & Khalaj, V.**, 2014, Cloning and expression of *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Pichia pastoris*. *Springerplus*, 3(1), 1-7pp
- Foda, M. S., Mohamed, S., Abd El Megeed, S.**, 1980, Formation and properties of l-glutaminase and l-asparaginase activities in *Pichia polymorpha*. *Acta Microbiologica Polonica.*, 29:343-352pp.
- Fonseca, M. H. G., da Silva Fiúza, T., de Moraes, S. B. and Trevizani, R.**, 2021, Circumventing the side effects of L-asparaginase, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111616.
- Freire, R. K. B., Mendonça, C. M. N., Ferraro, R. B., Moguel, I. S., Tonso, A., Lourenco, F. R. and Pessoa Junior, A.**, 2021, Glutaminase-free L-asparaginase production by *Leucosporidium muscorum* isolated from Antarctic marine-sediment, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51(3):277-288pp.
- Friedman, M.**, 2003, Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16):4504-4526pp.
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S. B., Nováková, A., Chen, A. J., & Houbraken, J.**, 2018, Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins, *Studies in Mycology*, 91(1), 37-59.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fu, C.H. and Sakamoto, K.M.,** 2007, PEG-asparaginase, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(12):1977-1984pp.
- Ghasemi, Y., Ebrahimezhad, A., Rasoul-Amini, S., Zarrini, G., Ghoshoon, M., Raee, M. J., Kazemi, A.,** 2008, An optimized medium for screening of L-asparaginase production by *Escherichia coli*, *American Journal of Biochemistry Biotechnology*, 4(4):22-424pp.
- Gladfelter, A. S., James, T. Y. and Amend, A. S.,** 2019, Marine fungi, *Current Biology*, 29(6), 191-195pp.
- Gomes, E., Souza, S. R. D., Grandi, R. P., & Silva, R. D.,** 2005, Production of thermostable glucoamylase by newly isolated *Aspergillus flavus* A 1.1 and *Thermomyces lanuginosus* A 13.37, *Brazilian Journal of Microbiology*, 36:75-82pp.
- Guimaraes, N. D. A., Sorgatto, M., Peixoto-Nogueira, S. D., Betini, J. H., Zanoelo, F., Marques, M., ... & Giannesi, G. C.,** 2013, Bioprocess and biotechnology: effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract, *SpringerPlus*, 2(380):1-7pp.
- Gulati, R., Saxena, R.K., Gupta, R.,** 1997, A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms, *Letters in Applied Microbiology*, 24:23–26pp.
- Gupta, N., Dash, S. J., and Basak, U. C.,** 2009, L-asparaginases from fungi of *Bhitarkanika mangrove* ecosystem, *Asia-Paific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 17(1):27-30pp.
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S. and Rai, V.,** 2013, A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond, *BioMed Research International*, 1-18pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Güvenç, G., Yılmaz, İ., Çiftçi, K., Baş, A., Kaşıkçı, E., Ersoy, F., Oral, H.B. ve Yalcin, M.,** 2018, Fare deneysel artrit modelinde genetik olarak modifiye toleran dentritik hücre tedavisinin bazı kan parametreleri üzerine etkisi, *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine/Veteriner Fakültesi Dergisi*, 37(2):101-107s.
- Haley, E.E., Fischer, G.A. and Welch, A.D.,** 1961, The requirement for L-asparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture, *Cancer Research*, 21(4):532-536pp.
- Hassan, S. W., Farag, A. M. and Beltagy, E. A.,** 2018, Purification, characterization and anticancer activity of L-asparaginase produced by marine *Aspergillus terreus*, *Journal of Pure Applied Microbiology*, 12(4):1845-1854pp.
- Hatamzadeh, S., Rahnema, K., Nasrollahnejad, S., Fotouhifar, K.B., Hemmati, K., White, J.F. and Taliei, F.,** 2020, Isolation and identification of l-asparaginase-producing endophytic fungi from the asteraceae family plant species of Iran, *PeerJ*, 8, 8:1-16pp.
- Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P. and Denning, D. W.,** 2007, *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*, 153(6):1677-1692pp.
- Hendriksen, H.V., Kornbrust, B.A., Østergaard, P.R. and Stringer, M.A.,** 2009, Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10):4168-4176pp.
- Ho, D.H.W., Thetford, B., Carter, C.J. and Frei III, E.,** 1969, Clinical pharmacologic studies of l-asparaginase, *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 11(3):408-417pp.
- Husain, Q.,** 2010, β Galactosidases and their potential applications: a review, *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(1):41-62pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K. and Isono, M.,** 1973, Asparaginase assay is rapid, reliable and results correlate directly with those ginase and glutaminase activities of microorganisms, *Journal of From Broth Studies General Microbiology* ,76:85–99pp.
- Imani, M., & Shahmohamadnejad, S.,** 2017, Recombinant production of *Aspergillus Flavus* uricase and investigation of its thermal stability in the presence of raffinose and lactose.3 *Biotech*, 7(3), 1-9pp.
- Jaskolski, M., Kozak, M., Lubkowski, J., Palm, G. and Wlodawer, A.,** 2001, Structures of two highly homologous bacterial L-asparaginases: a case of enantiomorphic space groups, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 57(3):369-377pp.
- Jha, S.K., Pasrija, D., Sinha, R.K., Singh, H.R., Nigam, V.K., Vidyarthi, A.S.,** 2012, Microbial L-asparaginase: a review on current scenario and future prospects, *Int J Pharm Sci Res*, 3(9):3076–3090pp.
- Jiao, L., Chi, H., Lu, Z., Zhang, C., Chia, S. R., Show, P.L., Tao, Y. and Lu, F.,** 2020, Characterization of a novel type 1 l-asparaginase from acinetobacter soli and its ability to inhibit acrylamide formation in potato chips, *Journal of Bioscience and Bioengineering*.
- Jones, E. G., Pang, K. L., Abdel-Wahab, M. A., Scholz, B., Hyde, K. D., Boekhout, T. and Norphanphoun, C.,** 2019, An online resource for marine fungi, *Fungal Diversity*, 96(1), 347-433.
- Kalyanasundaram, I., Nagamuthu, J., Srinivasan, B., Pachayappan, A. and Muthukumarasamy, S.,** 2015, Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from salt marsh fungal endophytes, *World Jornal Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 4(3):663-677pp.
- Kamisaki, Y., Wada, H., Yagura, T., Matsushima, A. and Inada, Y.,** 1981, Reduction in immunogenicity and clearance rate of *Escherichia coli* l-asparaginase by modification with monomethoxypolyethylene glycol, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 216(2):410-414pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kataria, M., Kaur, N., Narula, R., Kumar, K., Kataria, S. and Verma, N.,** 2015, L-Asparaginase from novel source-solanum nigrum and development of asparagine biosensor, *The Pharma Innovation Journal*, 4(5):81-84pp.
- Kaur, R. and Sekhon, B. S.,** 2012, Enzymes as drugs: an overview, *Journal of Pharmaceutical Education & Research*, 3(2).
- Keating, M.J., Holmes, R., Lerner, S. and Ho, D.H.,** 1993, L-asparaginase and PEG asparaginase—past, present, and future, *Leukemia & Lymphoma*, 10(1):153-157pp.
- Khalil, N. M., Rodríguez-Couto, S. and Abd El-Ghany, M. N.,** 2021, Characterization of *Penicillium crustosum* l-asparaginase and its acrylamide alleviation efficiency in roasted coffee beans at non-cytotoxic levels, *Archives of Microbiology*, 203(5):2625-2637pp.
- Kidd, J.G.,** 1953, Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum: I. course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum, *The Journal of Experimental Medicine*, 98(6):565-582pp.
- Knott, S.R., Wagenblast, E., Khan, S., Kim, S.Y., Soto, M., Wagner, M., Turgeon, M.O., Fish, L., Erard, N., Gable, A.L., Maceli, A.R., Dickopf, S., Papachristou, E.K., D'Santos, C.S., Carey, L.A., Wilkinson, J.E., Harrell, J.C., Perou, C.M., Goodarzi, H., Poulogiannis, G. And Hannon, G.J.,** 2018, Asparagine bioavailability governs metastasis in a model of breast cancer, *Nature*, 554(15):378-381pp.
- Kondapalli, K. and Teege, V. S. L.,** 2021, Characterization and optimization of fermentation conditions for increased production of l-asparaginase from marine fungi, *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, 8(3):1758-1769pp.
- Krishnapura, P.R., Belur, P.D. and Subramanya, S.,** 2016, A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases, *Critical Reviews in Microbiology*, 42(5):720-737pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, K., Pathak, T. and Aggarwal, D.**, 2013, Asparagine based plant biosensor for leukemia, *The Pharma Innovation*, 2(10):75-82pp.
- Kumar, N. M., and Manonmani, H. K.**, 2013, Purification, characterization and kinetic properties of extracellular l-asparaginase produced by *Cladosporium* sp, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4):577-587pp.
- Laemmli, U. K.**, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685pp.
- Lin, R. J., Chien, H. L., Lin, S. Y., Chang, B. L., Yu, H. P., Tang, W. C. and Lin, Y. L.**, 2013, MCP1P1 ribonuclease exhibits broad-spectrum antiviral effects through viral RNA binding and degradation, *Nucleic Acids Research*, 41(5):3314-3326pp.
- Lincoln, L., Niyonzima, F. N. and More, S. S.**, 2015, Purification and properties of a fungal L-asparaginase from *Trichoderma viride* pers: SF GREY, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 310-316pp.
- Lopes, A.M., Oliveira-Nascimento, L.D., Ribeiro, A., Tairum Jr, C.A., Breyer, C.A., Oliveira, M.A.D., Monterio, G., Souza-Motta, C.M.D., Magalhaes, P.D.O., Avendano, J.G.F., Cavaco-Paulo, A.M., Mazzola, P.G., Rangel-Yagui, C.D., Sette, L.D., Converti, A. and Pessoa, A.**, 2017, Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond, *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(1):82-99pp.
- Lorenzi, P.L., Reinhold, W.C., Rudelius, M., Gunsior, M., Shankavaram, U., Bussey, K.J., Scherf, U., Eichler, G.S., Martin, S.E., Chin, K., Gray, J.W., Kohn, E.C., Horak, I.D., Hoff, D.D.V., Raffeld, M., Goldsmith, P.K., Caplen, N.J. and Weinstein, J.N.**, 2006, Asparagine synthetase as a causal, predictive biomarker for l-asparaginase activity in ovarian cancer cells, *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(11):2613-2623pp.
- Luhana, K., Dave, A. and Patel, K.**, 2013, Production, purification and characterization of extracellular L-Asparaginase (Anti Cancerous Enzyme) from *Aspergillus niger*, *International Journal of Chemtech and Technology Application*, 2(3):14-25pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mahajan, R. V., Kumar, V., Rajendran, V., Saran, S., Ghosh, P. C., and Saxena, R. K.,** 2014, Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from *Bacillus licheniformis*: in vitro evaluation of anti-cancerous properties, *PLoS One*, 9(6):1-8pp.
- Mahajan, R.V., Saran, S., Kameswaran, K., Kumar, V., and Saxena, R.K.,** 2012, Efficient production of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: optimization, scale up and acrylamide degradation studies, *Bioresource Technology*, 125:11-16pp.
- Mane, P. and Tale, V.,** 2015, Overview of microbial therapeutic enzymes, *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 4(4):17-26pp.
- Mashburn, L.T. and Wriston, J.C.,** 1964, Tumor inhibitory effect of l-asparaginase from *Escherichia coli*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 105(2):450–453pp.
- Meghavarnam, A. K. and Janakiraman, S.,** 2015, Purification and characterization of therapeutic enzyme L-asparaginase from a tropical soil fungal isolate *Fusarium culmorum* ASP-87, *Journal Anesth Crit Care Open Access*, 2(5):00064.
- Meghavarnam, A.K. and Janakiraman, S.,** 2018, Evaluation of acrylamide reduction potential of l-asparaginase from *Fusarium culmorum* asp-87 in starchy products, *LWT-Food Science and Technology*, 89:32-37pp.
- Micu, G., Roming, F., Cornea, C.,** 2020, Methods for screening of novel L-asparaginase from microorganisms, *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 24(1):144-153pp.
- Mishra, A.,** 2006, Production of l-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 135(1):33-42pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Moore, G. G.**, 2021, Practical considerations will ensure the continued success of pre-harvest biocontrol using non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* strains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-18pp.
- Mosmann, T.**, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2):55-63.
- Muneer, F., Siddique, M.H., Azeem, F., Rasul, I., Muzammil, S., Zubair, M. and Nadeem, H.**, 2020, Microbial l-asparaginase: purification, characterization and applications, *Archives of Microbiology*, 1-15pp.
- Müller, H.J. and Boos, J.**, 1998, Use of l-asparaginase in childhood all. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 28(2):97-113pp.
- Nageswara, S., Guntuku, G. And Tadimalla, P.**, 2014, Production of L-asparaginase by solid state fermentation using marine fungus, *BioMed Res*, 1-9pp.
- Narayana, K.J.P; Kumar, K.G. and Vishalakshi, M.**, 2008, L-Asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*, *Indian Journal of. Microbiology*, 48:331-336pp.
- Narta, U.K., Kanwar, S.S. and Azmi, W.**, 2007, Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 61(3):208-221pp.
- Naveena, B., Narayani, T.G., Sakthiselvan, P. and Partha, N.**, 2012, Antioxidant and antimicrobial efficacies of amaranthus polygonoides and its impact on l-asparaginase production, *African Journal of Biotechnology*, 11(61):12483-12490pp.
- Neuman, R.E. and McCoy, T.A.**, 1956, Dual requirement of walker carcinosarcoma 256 in vitro for asparagine and glutamine, *Science*, 124(3212):124-125pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nguyen, H. A., Su, Y., Zhang, J. Y., Antanasijevic, A., Caffrey, M., Schalk, A. M., and Lavie, A.,** 2018, A novel l-asparaginase with low l-glutaminase coactivity is highly efficacious against both T-and B-cell acute lymphoblastic leukemias in vivo, *Cancer research*, 78(6):1549-1560pp.
- Ohnuma, T., Holland, J.F. and Meyer, P.,** 1972, *Erwinia carotovora* asparaginase in patients with prior anaphylaxis to asparaginase from e. coli, *Cancer*, 30(2):376-381pp.
- Old, L. J., Boyse, E.A., Campbell, H.A., Brodey, R.S., Fidler, J. and Teller, J.D.,** 1967, Treatment of lymphosarcoma in the dog with L-asparaginase, *Cancer*, 20(7):1066-1070pp.
- Onishi, Y., Prihanto, A. A., Yano, S., Takagi, K., Umekawa, M. and Wakayama, M.,** 2015, Effective treatment for suppression of acrylamide formation in fried potato chips using L-asparaginase from *Bacillus subtilis*, *3 Biotech*, 5(5):783-789pp.
- Orabi, H.M., El-Fakharany, E. M., Abdelkhalek, E. S. and Sidkey, N. M.,** 2019, L-asparaginase and L-glutaminase: sources, production, and applications in medicine and industry, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 179-190pp.
- Oyeleke, S. B., Egwim, E. C., & Auta, S. H.,** 2010, Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production, *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 2(7):83-87pp.
- Patro, K. R. and Gupta, N.,** 2012, Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation, *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 3(3):30-34pp.
- Patro, K. R., Basak, U. C., Mohapatra, A. K., & Gupta, N.,** 2014, Development of new medium composition for en d production of L-asparaginase by *Aspergillus flavus*, *Journal of Environmental Biology*, 35, 295-300pp.
- Paul, J.H.,** 1982, Isolation and characterization of a chlamydomonas l-asparaginase, *Biochemical Journal*, 203(1):109-115pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pendharkar, G. B., Sonawane, H. G., Khare, K. A., & Yadav, D.,** 2021, Production of Chemotherapeutic Enzyme L-asparaginase from a Fungal Source, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 22(15):2031-2037pp.
- Prabavathy, D.,** 2020, Cytotoxic activity of L-asparaginase isolated from endophytic *Aspergillus nomius* of *Justicia adhatoda* on A549 cell lines, *International Journal of Green Pharmacy*, 14(2).
- Prakash, P., Singh, H. R. and Jha, S. K.,** 2020a., Indicator dye based screening of glutaminase free L-asparaginase producer and kinetic evaluation of enzyme production process, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(8):803-813.
- Prakash, P., Singh, H. R. and Jha, S. K.,** 2020b, Production, purification and kinetic characterization of glutaminase free anti-leukemic L-asparaginase with low endotoxin level from novel soil isolate, *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 50(3):260-271pp.
- Pritsa, A.A., and Kyriakidis, D.A.,** 2001, Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 216:93–101pp.
- Qeshmi, F.I., Homaei, A., Fernandes, P. and Javadpour, S.,** 2018, Marine microbial l-asparaginase: biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry, *Microbiological Research*, 208:99-112pp.
- Rahiman, O. F., Mohthash, M., Faris, U. S., Muneersha, T. M., and Shejina, M.,** 2014, Production, purification and standardization of anticancerous enzyme (L-asparaginases) from *Aspergillus niger* using soil samples by solid state fermentation, *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 2(4):488-492pp.
- Ramakrishnan, M. S. and Joseph, R.,** 1996, Characterization of an extracellular asparaginase of *Rhodospiridium toruloides* CBS14 exhibiting unique physicochemical properties, *Canadian Journal of microbiology*, 42(4):316-325pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ramya, L.N., Doble, M., Rekha, V.P.B. and Pulicherla, K.K.,** 2012, L-Asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167(8):2144-2159pp.
- Rani, S. A., Sundaram, L. and Vasantha, B. P.,** 2011, In vitro antioxidant and anticancer activity of L-asparaginase from *Aspergillus flavus* (KUFS20), *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 4(2):174-177pp.
- Ravi, A. and Gurunathan, B.,** 2018, Acrylamide mitigation in fried kochchi kesel chips using free and immobilized fungal asparaginase, *Food Technology and Biotechnology*, 56(1):51-57pp.
- Reiff, A., Zastrow, M., Sun, B.C., Takei, S., Mitsuhashi, H., Bernstein, B. and Durden, D.L.,** 2001, Treatment of collagen induced arthritis in dba/1 mice with L-asparaginase, *Clinical and Experimental Rheumatology*, 19(6):639-646pp.
- Reinert, R. B., Oberle, L. M., Wek, S. A., Bunpo, P., Wang, X. P., Mileva, I., & Anthony, T. G.,** 2006, Role of glutamine depletion in directing tissue-specific nutrient stress responses to L-asparaginase, *Journal of biological chemistry*, 281(42):31222-31233pp.
- Rhodes, J. C., Amlung, T. W., & Miller, M. S.,** 1990, Isolation and characterization of an elastinolytic proteinase from *Aspergillus flavus*. *Infection and Immunity*, 58(8):2529-2534pp.
- Roberts, J., Prager, M.D. and Bachynsky, N.,** 1966, The antitumor activity of *Escherichia coli* l-asparaginase, *Cancer Research*, 26(10):2213-2217pp.
- Robinson,** 2015, Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays in Biochemistry*, 59:1-41pp.
- Rudrapati, P., Audipudi, A.V.,** 2017, Production and purification of anticancer enzyme L-asparaginase from *Bacillus firmus* AVP 18 of mangrove sample through submerged fermentation, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5:1–18pp.
- Sabu, A.,** 2003, Sources, properties and applications of microbial therapeutic enzymes, *Indian Journal of Biotechnology*, 2:334-341pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sabu, A., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A.,** 2005, L-Glutaminase as a therapeutic enzyme of microbial origin, *Microbial Enzymes and Biotransformations*, 75-90pp.
- Sarquis, M.I.D.M., Oliveira, E.M.M., Santos, A.S. and Costa, G.L.D.,** 2004, Production of l-asparaginase by filamentous fungi, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5):489-492pp.
- Schwartz, J.H., Reeves, J.Y. and Broome, J.D.,** 1966, Two L-asparaginases from *E. coli* and their action against tumors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(5): 1516-1519pp.
- Sharma, A., Gupta, G., Ahmad, T., Mansoor, S., Kaur, B.,** 2021, Enzyme engineering: current trends and future perspectives, *Food Reviews International*, 37(2):121–154pp.
- Shrivastava, A., Khan, A. A., Jain, S. K., Singhal, P. K., Jain, S., Marotta, F., and Yadav, H.,** 2010, Biotechnological advancement in isolation of anti-neoplastic compounds from natural origin: a novel source of L-asparaginase, *Acta Biomed*, 81(2): 104-108pp.
- Shrivastava, A., Khan, A. A., Shrivastav, A., Jain, S. K., & Singhal, P. K.,** 2012, Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(6):574-581pp.
- Shrivastava, A., Khan, A.A., Khurshid, M., Kalam, M.A., Jain, S.K. and Singhal, P.K.,** 2016, Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 100:1-10pp.
- Siddalingeshwara, K. G., & Lingappa, K.,** 2011, Production and characterization of L asparaginase-a tumour inhibitor, *International Journal of PharmTech Research*, 3(1):314-319pp.
- Simas, R. G., Krebs Kleingesinds, E., Pessoa Junior, A., and Long, P. F.,** 2021, An improved method for simple and accurate colorimetric determination of l-asparaginase enzyme activity using Nessler's reagent, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(5):1326-1332pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Souza, P.M., de Freitas, M.M., Cardoso, S.L., Pessoa, A., Guerra, E.N.S. and Magalhaes, P.O.,** 2017, Optimization and purification of l-asparaginase from fungi: a systematic review, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 120:194-202pp.
- Stepanyan K. R. and Davtyan, M. A.,** 1998, Some question of thermostability of L-asparaginase of yeast *Candida guilliermondii*, *Biologicheskii Zhurnal Armenii*. 41, 599-603pp.
- Tallal, L., Tan, C., Oettgen, H., Wollner, N., McCarthy, M., Helson, L., Burchenal, J., Karnofsky, D. and Murphy, M.L.,** 1970, *E. coli* l-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children, *Cancer*, 25(2):306-320pp.
- Tandon, S., Sharma, A., Singh, S., Sharma, S. and Sarma, S. J.,** 2021, Therapeutic enzymes: discoveries, production and applications, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 102455.
- Thakur, M., Lincoln, L., Niyonzima, F.N., More, S.S.,** 2014, Isolation, purification and characterization of fungal extracellular L-asparaginase from *Mucor hiemalis*, *Journal of Biocatalysis & Biotransformation*, 2:1-9pp
- Theantana, T., Hyde, K.D. and Lumyong, S.,** 2007, Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some thai medicinal plants, *Current Applied Science and Technology*, 7(1):13-18pp.
- Theantana, T., Hyde, K.D. and Lumyong, S.,** 2009, Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: cytotoxicity properties, *International Journal of Integrative Biology*, 7(1):1-8pp.
- Thirunavukkarasu, N., Suryanarayanan, T.S., Murali, T.S., Ravishankar J.P. and Gummadi, S.N.,** 2011, L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds, *Mycosphere*, 2(2):147-155pp.
- Tüylek, Z.,** 2019, İlaç Taşıyıcı Nanosistemler, *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 28(3):184-192s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ueng, S.**, 2005, Rasburicase (Elitek): a novel agent for tumor lysis syndrome. In *Baylor University Medical Center Proceedings*, 18(3):275-279pp.
- Vala, A. K., Sachaniya, B., Dudhagara, D., Panseriya, H. Z., Gosai, H., Rawal, R., & Dave, B. P.**, 2018, Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste, *International Journal of Biological Macromolecules*, 108:41-46pp.
- Verma, N., Kumar, K., Kaur, G. and Anand, S.**, 2007, L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent, *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1):45-62pp.
- Vidya, J., Vasudevan, U.M., Soccol, C.R., Pandey, A.**, 2011, Cloning, functional expression and characterization of L-asparaginase II from *E. coli* MTCC 739, *Food Technology and Biotechnology*, 49:286–290pp.
- Vimal, A. and Kumar, A.**, 2017, Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(1):40-61pp.
- Vimal, A. and Kumar, A.**, 2018, L-Asparaginase: a feasible therapeutic molecule for multiple diseases, 3 *Biotech*, 8(6):278p.
- Wade, H.E., Elsworth, R., Herbert, D., Keppie, J. and Sargeant, K.**, 1968, A new l-asparaginase with antitumour activity, *The Lancet*, 776-777pp.
- Wade, H.E., Robinson, H.K. and Phillips, B.W.**, 1971, Asparaginase and glutaminase activities of bacteria, *Microbiology*, 69(3):299-312pp.
- Wang, Y., Xu, W., Wu, H., Zhang, W., Guang, C., & Mu, W.**, 2021, Microbial production, molecular modification, and practical application of L-asparaginase: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 186:975-983pp.
- Wangler, M., and Bellen, H.**, 2017, In vivo Animal Modeling, *Basic Science Methods For Clinical Researchers*, 211-234pp.
- Whelan, H.A. and Wriston Jr, J.C.**, 1969, Purification and properties of asparaginase from *Escherichia coli* B, *Biochemistry*, 8(6):2386-2393pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Xue, D., Zhang, T., Jiang, B., Mu, W., Zuo, S.,** 2014, Biochemical characterization of an extremely thermostable L-asparaginase from *Thermococcus gammatolerans* EJ3, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 109:122–129pp.
- Yadav, S., Verma, S.K., Singh, J. and Kumar, A.,** 2014, Industrial production and clinical application of l-asparaginase: a chemotherapeutic agent, *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 8(1):76:41pp.
- Yıldız, O., Şahin, H., Kara, M., Aliyazıcıoğlu, R., Tarhan, Ö., Kolaylı, S.,** 2010, Maillard reaksiyonları ve reaksiyon ürünlerinin gıdalardaki önemi, *Akademik Gıda*, 8(6):44-51pp.
- Zia, M., Bashir, R., Ahmed, I. and Iftikhar, T.,** 2013, Production of l-asparaginase from *Aspergillus niger* using agro wastes by-products in submerged fermentation process, *Journal Teknologi*, 62(2):47-51pp.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı yapan, desteğini ve emeğini esirgemeyerek bana yol gösteren, kıymetli fikir ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. E. Esin HAMEŞ TUNA'ya,

FYL-2020-22265 nolu “Terapötik bir enzim olan L-asparajinazın deniz kaynaklı filamentöz fungus suşlarından üretimi ve kısmi karakterizasyonu” başlıklı bilimsel araştırma projemi destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Tez konumun belirlenmesinde yardımcı olarak beni yönlendiren Dr. Yüksel GEZGİN'e, değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren Prof. Dr. Figen ZİHNİOĞLU ve Arş. Gör. Dr. Ebru KOCADAĞ KOCAZORBAZ'a, çalışmalarım süresince laboratuvar imkânlarından yararlandığım Doç. Dr. Sait SARGIN, Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ve Dr. Öğr. Üyesi İsmail Hakkı AKGÜN'e, Proses Laboratuvarı ve Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı öğrencilerine,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan biricik dostum Sibel ARSLAN'a, her zaman yanımda olduklarını hissettiren canım arkadaşlarım Beyza EFE ve Kardelen KALMAZ'a, desteklerini esirgemeyen aynı laboratuvarı paylaştığım Medikal Biyoteknoloji grubuna,

Eğitim hayatım boyunca yanımda olan ve beni her koşulda destekleyen, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

ZEYCAN NURÇE

EĞİTİM BİLGİLERİ**2018-2022, Yüksek Lisans:**

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü

*Medikal Biyoteknoloji Laboratuvarı***2020-Devam ediyor, Lisans:**

Anadolu Üniversitesi

*Sağlık Yönetimi***2014-2018, Lisans:**

Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü

*Yüksek Onur Derecesi (3.63): Bölüm Üçüncülüğü***2009-2013, Lise:**

İzmir Karşıyaka Lisesi

YETKİNLİKLER**Bilgisayar:** Microsoft Office Programları- (Word, Powerpoint, Excel)

Design Expert 7.0.0

MATLAB (Başlangıç)

GraphPad Prism

Dil:

Anadil-Türkçe

İngilizce (Intermediate)

Almanca (Başlangıç)

İŞ/STAJ DENEYİMLERİ

10/2020-02/2022: Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir

Yüksek lisans tez öğrencisi- Medikal Biyoteknoloji Laboratuvarı

FYL-2020-22265 no'lu BAP projesi- **Araştırmacı**

İş paketinde yer alan yetkinlikler: Mikroorganizmaların aktivasyonu, üretimi, enzim aktivitesi, kısmi saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri, sitotoksite testi

01/2020-11/2021: Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir

Hayvan Hücre Mühendisliği ve Biyoproses Laboratuvarı

TÜBİTAK 1001- Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı- **Bursiyer**

İş paketinde yer alan yetkinlikler: Hayvan hücrelerinin pasajlanması, Hücre dondurma/çözdürme işlemleri, Biyoaktivite testleri: Sitotoksite testleri ve Apoptik çalışmalar kapsamında; MTT Testi, Hoechst 33342 boyaması, Laktat Dehidrogenaz (LDH) testi, DNA Fragmentasyon, Caspase 3/7 testi

03/2017-06/2018: Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir

Gönüllü stajyer/Lisans Tez öğrencisi- Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuvarı

TÜBİTAK 2209-A- Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri

İş paketinde yer alan yetkinlikler: Mikroorganizmaların (fungus ve bakteri) aseptik şartlarda üretimi, mikrobiyal DNA izolasyonu, PCR işlemleri, antimikrobiyal testlerin yapılması ve yeni prosedürlerin geliştirilmesi.

07/2017-08/2017: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir

Stajyer- Tıbbi Genetik - Moleküler Genetik Laboratuvarı

DNA İzolasyonu, PCR işlemleri, Strip Testler: FMF, CVD, FACTOR V, Hemokromatozis, Kistik Fibrozis, Yeni nesil DNA dizileme çalışmaları (Sanger, Ion Torrent, Miseq).

SEMİNERLER VE SERTİFİKALAR

- 04/2020:** Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, “ Mikrobiyal L-Asparajinaz Üretimi ve Uygulama Alanları” Konulu Yüksek Lisans Seminer Sunumu
- 05/2019:** Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, 7. Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, İzmir, Türkiye.
- 12/2018:** TSC Yönetim Sistemleri Akademisi
ISO 9001:2015 Kalite Yönetim Sistemi Sertifikası
- 12/2018:** TSC Yönetim Sistemleri Akademisi
ISO/IEC 17025:2017 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği Sertifikası
- 12/2018:** TSC Yönetim Sistemleri Akademisi
GLP-İyi Laboratuvar Uygulamaları Sertifikası
- 12/2018:** TSC Yönetim Sistemleri Akademisi
GMP-İyi Üretim Uygulamaları Sertifikası
- 03/2018:** TMMOB Kimya Mühendisleri Odası
TS-EN-ISO 9001-2015 Kalite Yönetim Sistemi Bilgilendirme Eğitimi Katılım Sertifikası
- 03/2017:** .Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü
“Senden ne olur? Kariyer Planlama ve Elalem” Etkinliği Katılım Sertifikası
- 05/2016:** Ege Üniversitesi,13. Biyomühendislik Günleri
- 03/2015:** Marmara Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, 3. Ulusal Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, İstanbul, Türkiye