

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SUDA ÇÖZÜNEBİLEN BORONİK ASİT FONKSİYONEL MANYETİK
NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZLENMESİ VE L-ASPARAJİNAZ
İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gamze DİK

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

TEMMUZ, 2021

**T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SUDA ÇÖZÜNEBİLEN BORONİK ASİT FONKSİYONEL MANYETİK
NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZLENMESİ VE L-ASPARAJİNAZ
İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANIMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Gamze DİK
(36173613117)**

Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

TEMMUZ, 2021

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleri ile yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, sabırla ve özveriyle her konuda fikir veren, hem tez çalışmamda hem de akademik hayatım süresince önümde rehber olan ve bundan sonraki sürecimde yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Pof. Dr. Burhan ATEŞ'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda her konuda fikir danıştığım, beni sabırla dinleyen, yol gösteren, desteğini her zaman yanımda hissettiğim ve öğrendiğim birçok şeyi kendisine borçlu olduğum saygıdeğer hocam Dr. Ahmet ULU'ya çok teşekkür ederim.

Çalışmam boyunca karşılaştığım her zorlukta yanımda destek olan Seda KOLAK ve İmren ÖZCAN'a, biyokimya laboratuvarı çalışma arkadaşlarım Büşra BAKAR ve Dr. Samir NOMA'ya teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, karşılaştığım her zorlukta kendisine koştuğum ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, eğitimin önemini, başarının güzelliğini, kendisinden öğrendiğim teyzem Habibe İNCİDELEN'e çok teşekkür ederim. Hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Tez projem dahilinde beni bursiyer olarak destekleyen Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde 2019 / 1865 nolu ve 'Suda Çözünebilen Boronik Asit Fonksiyonel Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve L-Asparajinaz İmmobilizasyonunda Kullanımı' başlıklı proje ile finansal destek sunan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Suda Çözünebilen Boronik Asit Fonksiyonel Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve L-Asparajinaz İmmobilizasyonunda Kullanımı” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Gamze Dik

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ	iii
ONUR SÖZÜ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. L-ASNaz	2
1.2. L-ASNaz'ın Moleküler Yapısı	3
1.3. L-ASNaz Kaynakları.....	5
1.3.1. Bakteriyel Kaynaklar	5
1.3.2. Aktinomisetler.....	5
1.3.3. Algler	5
1.3.4. Bitkisel Kaynaklar	6
1.3.5. Mayalar	6
1.3.6. Rekombinant L-ASNaz.....	6
1.4. L-ASNaz'ın Etki Mekanizması	6
1.5. L-ASNaz'ın Kemoterapötik Etkisi.....	7
1.6. Ticari L-ASNaz'lar	8
1.7. Gıda Endüstrisinde L-ASNaz Kullanımı	8
2. ENZİM İMMOBİLİZASYONU ve İMMOBİLİZASYONDA KULLANILAN	
TAŞIYICI MATERYALLER.....	10
2.1. Enzim İmmobilizasyonu.....	10
2.2. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	11
2.2.1. Kimyasal immobilizasyon yöntemleri.....	11
2.2.1.1. Çapraz bağlama yöntemi	12
2.2.1.2. Kovalent bağlama yöntemi	12
2.2.1.3. İyonik bağlama yöntemi	13
2.2.2. Fiziksel immobilizasyon yöntemleri	13
2.2.2.1. Adsorbsiyon yöntemi.....	13
2.2.2.2. Şelasyon ve metal bağlama yöntemi	14
2.2.2.3. Disülfid bağı yöntemi	14
2.2.2.4. Tuzaklama yöntemi	15
2.2.2.5. Enkapsülasyon yöntemi.....	15
2.3. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Nanotaşıyıcı Malzemeler.....	15
2.4. Nanotaşıyıcı Malzemeler.....	17
2.4.1. Organik yapılı nanotaşıyıcılar	17
2.4.1.1. Polimer yapılı nanotaşıyıcılar	17
2.4.1.2. Lipid yapılı nanotaşıyıcılar	18
2.4.1.3. Karbon yapılı nanotaşıyıcılar.....	18
2.4.2. İnorganik nanotaşıyıcılar	18

2.4.2.1. Yarı iletken nanotaşıyıcı sistemler.....	18
2.4.2.2. Silika yapılı nanotaşıyıcı sistemler	18
2.4.2.3. Upconversion nanotaşıyıcı sistemler	19
2.4.2.4. Manyetik nanotaşıyıcılar	19
2.5. Manyetik Nanopartiküllerin Kullanım Alanları	21
2.6. Manyetik Nanopartikül Sentez Yöntemleri.....	22
2.6.1. Yeşil sentez yöntemi	23
2.6.2. Mikroemülsiyon yöntemi	23
2.6.3. Sol-Jel yöntemi	24
2.6.4. Poli-ol yöntemi.....	25
2.6.5. Birlikte çöktürme yöntemi	25
2.6.6. Termal ayrışma yöntemi	26
2.6.7. Hidrotermal sentez yöntemi	26
2.6.8. Sonokimyasal yöntem	27
3. LİTERATÜR ÖZETİ	28
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
4.1. Kullanılan Kimyasallar ve Markaları	37
4.2. Kullanılan Cihazlar ve Markaları	37
4.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	37
4.4. Nessler Reaktifinin Hazırlanması.....	39
4.5. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	39
4.5.1. Manyetik nanopartiküllerin 3- Aminopropil Trimetoksi Silan’la fonksiyonelleştirilmesi	40
4.5.2. Fe ₃ O ₄ -NH ₂ Nanopartiküllerin 4-Vinilfenil Boronik Asit ile Modifiye Edilmesi	41
4.5.3. Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -4VPBA Nanopartiküllerin PEG ile Modifikasyonu.....	42
4.6. Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -4VPBA-PEG Nanopartiküllere Enzim İmmobilizasyonu	42
4.7. Serbest L-ASNaz Aktivitesinin Tayini	42
4.8 Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -4VPBA-PEG-LASNaz Aktivitesinin Tayini	43
4.9. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	43
4.10. Optimum pH’nın Belirlenmesi.....	43
4.11. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	44
4.12. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	44
4.13. Termal Kararlılığın Belirlenmesi	45
4.14. Yeniden Kullanılabilirliğin Belirlenmesi	45
4.15. Depolama Kararlılığının Belirlenmesi	46
4.16. Manyetik Alan Etkisinin İncelenmesi	46
5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI	47
5.1. Manyetik Nanopartiküllerin Fizikokimyasal Karakterizasyonları	47
5.1.1. Manyetik nanopartiküllerin FTIR karakterizasyonları	47
5.1.2. Manyetik nanopartiküllerin XRD karakterizasyonları.....	48
5.1.3. Manyetik nanopartiküllerin SEM ve EDX karakterizasyonları.....	49
5.1.4. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin partikül boyutlarının ve zeta potansiyellerinin incelenmesi	57
5.1.5. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin VSM karakterizasyonlarının incelenmesi	58
5.2. Sentezlenen Manyetik Nanopartiküllerin Biyokimyasal Sonuçlarının İncelenmesi	59
5.2.1. İmmobilizasyon verimi ve aktivite verimi	59
5.2.2. Optimum pH değerinin belirlenmesi.....	60

5.2.3. Optimum sıcaklık değerin belirlenmesi	61
5.2.4. Kinetik parametrelerin belirlenmesi.....	62
5.2.5. Termal kararlılığının belirlenmesi	63
5.2.6. Yeniden kullanılabilirlik	64
5.2.7. Depolama kararlılığının belirlenmesi.....	65
5.2.8. Manyetik alan etkisi	66
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	68
KAYNAKÇA	73
ÖZGEÇMİŞ.....	84



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 : Polimerlerin sınıflandırılması	21
Çizelge 5.1 : Elde edilen manyetik nanopartiküllerin zetapotansiyelleri ve hidrodinamik çapları	58
Çizelge 5.2: Serbest L-ASNaz ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın kinetik parametreleri.....	63



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 : L-ASNaz'ın kataliz reaksiyonu (Nunes ve diğ, 2020)	3
Şekil 1.2 : <i>E.Coli</i> 'den saflaştırılan L-ASNaz enziminin moleküler yapısı (Swain ve diğ, 1993)	4
Şekil 1.3 : <i>E. Coli</i> 'den saflaştırılan Tip II L-ASNaz enziminin aktif merkezinin aminoasit rezidüleri (Swain ve diğ, 1993).....	4
Şekil 1.4 : L-ASNaz etki mekanizması (Azmi ve diğ, 2017)	7
Şekil 1.5 : Maillard reaksiyonu.....	9
Şekil 2.1 : Farklı immobilizasyon yöntemleri (Gonçalves ve diğ, 2019).....	11
Şekil 2.2 : Nanotaşıyıcı malzeme türleri	17
Şekil 2.3 : Manyetik değerlere ait grafikler	20
Şekil 2.4 : Manyetik nanopartikül sentez yöntemleri	22
Şekil 2.5 : Mikroemülsiyon yöntemi ile manyetik nanopartikül sentezi (Chaudhary ve Chaudhary, 2018).....	24
Şekil 2.6 : Birlikte çöktürme yöntemi ile Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin sentezi (Wulandari ve diğ, 2017)	25
Şekil 2.7 : Manyetik nanopartiküllerin termal ayrışma yöntemi ile sentezlenmesi (Chaudhary ve Chaudhary, 2018)	26
Şekil 2.8 : Manyetik nanopartiküllerin sonokimyasal yöntemle sentezlenmesi (Teo ve diğ, 2009)	27
Şekil 3.1 : Pektinaz enziminin kitosan kaplı manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu (Nouri ve diğ, 2020).....	29
Şekil 3.2 : Kitosan kaplı manyetik nanopartiküllere lakkaz immobilizasyonu ve klorofenolün uzaklaştırılmasında kullanımı (Zhang ve diğ, 2020).....	30
Şekil 3.3 : Manyetik nanopartiküller üzerine selüloz immobilizasyonu (Lima ve diğ. 2017)	31
Şekil 3.4 : PD modifiyeli Fe ₃ O ₄ nanopartikülleri üzerine lipaz immobilizasyonu (Ren ve diğ, 2011)	32
Şekil 3.5 : Fe ₃ O ₄ -kitosan nanopartiküllerine L-ASNaz immobilizasyonu (Ateş ve diğ, 2018)	33
Şekil 4.1 : Manyetik nanopartiküllerin birlikte çöktürme yöntemi ile hazırlanması.....	40
Şekil 4.2 : Fe ₃ O ₄ 'ün APTMS ile fonksiyonelleştirilmesi	41
Şekil 4.3 : 4-Vinilfenil boronik asit türevli manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesi	41
Şekil 5.1 : (A) Fe ₃ O ₄ (B)Fe ₃ O ₄ -NH ₂ (C) Fe ₃ O ₄ -4VPBA (D) Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -4VPBA-PEG (E) NH ₂ -4VPBA-PEG-L-ASNaz nanopartiküllerinin FTIR karakterizasyonu	48
Şekil 5.2 : Manyetik nanopartiküllerinin XRD karakterizasyonu	49
Şekil 5.3 : Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin SEM karakterizasyonu	49
Şekil 5.4 : Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin EDAX spektrumu.....	50
Şekil 5.5 : Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin EDAX-elementel haritalama görüntüleri	50
Şekil 5.6 : Fe ₃ O ₄ -NH ₂ nanopartiküllerinin SEM görüntüleri	51
Şekil 5.7 : Fe ₃ O ₄ -NH ₂ nanopartiküllerinin EDAX spektrumu	51
Şekil 5.8 : Fe ₃ O ₄ -NH ₂ nanopartiküllerinin EDAX- elementel haritalama görüntüleri.....	52
Şekil 5.9 : Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -4VPBA nanopartiküllerinin SEM görüntüleri	52
Şekil 5.10 : Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -4VPBA nanopartiküllerinin EDAX spektrumları	53
Şekil 5.11 : Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -4VPBA nanopartiküllerinin EDAX- elementel haritalama görüntüleri	53
Şekil 5.12 : Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -BA-PEG nanopartiküllerinin SEM görüntüleri	54

Şekil 5.13 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ nanopartiküllerinin EDAX spektrumları	55
Şekil 5.14 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ nanopartiküllerinin EDAX- elementel haritalama görüntüleri	55
Şekil 5.15 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ nanopartiküllerinin SEM görüntüleri.....	56
Şekil 5.16 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ nanopartiküllerinin EDAX spektrumları.....	56
Şekil 5.17 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-LASNaz}$ nanopartiküllerinin EDAX- elementel haritalama görüntüleri	57
Şekil 5.18 : Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin VSM karakterizasyonu	59
Şekil 5.19 : Serbest L-ASNaz ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın optimum pH değeri	60
Şekil 5.20 : Serbest L-ASNaz ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi.....	61
Şekil 21 (A) : Serbest L-ASNaz'ın Lineweaver-Burk grafiği	62
Şekil 5.21 (B) : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın Lineweaver-Burk grafiği.....	63
Şekil 5.22 (A) : Serbest L-ASNaz'ın termal kararlılığının belirlenmesi.....	64
Şekil 5.22 (B) : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın termal kararlılığı.....	64
Şekil 5.23 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın yeniden kullanılabilirliği	65
Şekil 5.24 : Serbest L-ASNaz ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın depolama kararlılığı.....	66
Şekil 5.25 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ için uygulanacak olan optimum frekans değerinin belirlenmesi.....	67
Şekil 5.26 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ için uygulanacak olan optimum akı yoğunluğunun belirlenmesi.....	67
Şekil 27: Manyetik alan uygulanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ nanopartiküllerinin FTIR karakterizasyonları.....	68

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

4VPBA	: 4-vinil fenil boronik asit
APTMS	: Aminopropil trimetoksi silan
Au	: Altın
CS	: Kitosan
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DSC	: Diferansiyel taramalı kolorometri
DTA	: Diferansiyel termal analiz
EDC	: 1-Etil 3-karbodiimid hidroklorid
Fe₃O₄	: Manyetit
Fe₃O₄-NH₂	: APTES fonksiyonel manyetik nanopartikü
Fe₃O₄-NH₂-4VPBA	: Boronik asit türevli manyetik nanopartikül
Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG	: PEG kaplı manyetik nanopartikül
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi
L-ASNaz	: L-asparajinaz
MNP	: Manyetik nanopartikül
MPTMS	: 3-merkaptopropiltrimetoksi silan
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
NIR	: Yakın kızılötesi spektroskopisi
PEG	: Poli etilen glikol
SEM	: Taramalı elektron mikroskobu
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
TGA	: Termogravimetrik Analiz
VSM	: Vibrasyonlu numune magnetometre
XRD	: X-ışını diffraksiyonu
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
MPMS	: 3-Merkaptopropi metoksi silan
CDT	: Karbon nanotüp

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SUDA ÇÖZÜNEBİLEN BORONİK ASİT FONKSİYONEL MANYETİK NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZLENMESİ VE L-ASPARAJİNAZ İMMOBİLİZASYONUNDA KULLANIMI

Gamze Dik

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

85+XI sayfa

2021

Danışman: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

L-asparajinaz, başta Akut Lenfoblastik Lösemi olmak üzere birçok lenfoma hastalığının tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir enzim-ilaçtır. Bu tedavilerde kullanılan L-asparajinaz'ın bakterilerden izole edilmesinden dolayı kullanımını sınırlayan bazı yan etkileri mevcuttur. Bununla birlikte L-asparajinazın hem kandaki yarı ömrünü arttırmak hem de daha etkili bir şekilde kullanılmasını sağlamak için çeşitli nanotaşıyıcı sistemler geliştirilmektedir. Bu çalışmanın amacı L-asparajinazı bor türevli manyetik nanopartiküllere immobilize etmek, immobilize enzimin optimum parametrelerini araştırmak ve zayıf manyetik alan altında indükleyerek enzimin katalitik aktivitesinin iyileştiğini göstermektir.

Bu amaçla öncelikle taşıyıcı matriks olarak kullanılmak üzere manyetik demir oksit nanopartikülleri sentezlenmiş ve boronik asit ile modifiye edilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen tüm malzemeler yapısal ve morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Ayrıca, immobilize enzimin optimum parametreleri (pH, sıcaklık), termal kararlılığı, depolama kararlılığı, yeniden kullanılabilirliği ve kinetik parametreleri incelenmiş ve serbest enzimle kıyaslanmıştır. Dahası, immobilize enzimin zayıf manyetik alan altında aktivitesi incelenmiştir. Serbest enzimin optimum pH ve sıcaklığı sırasıyla 8,5 ve 45 °C bulunurken, immobilize enzim için 7,5 ve 40 °C olarak bulunmuştur. Ayrıca, 10 kullanım döngüsünden sonra bile immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %54'ünü korumuştur. Kinetik çalışmalarda serbest enzim için ve immobilize enzim için K_m değerleri sırasıyla $10,376 \pm 0,5$ ve $7,06 \pm 2,99$ mM olarak, V_{max} ise sırasıyla $138,88 \pm 2,64$ ve $121,95 \pm 1,070$ $\mu\text{mol/dk}$ olarak bulunmuştur. Bunlara ek olarak 10 Hz'lik bir manyetik alan ve 20 mT'lık bir manyetik akı uygulandığında aktivitenin sırasıyla yaklaşık 3,2 ve 4,3 kat arttığı gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, L-asparajinaz immobilizasyonunda kullanılmak üzere suda çözünürlükleri yüksek fonksiyonel bor türevli manyetik nanotaşıyıcılar hazırlanmış, L-asparajinaz enzimi immobilize edilmiş ve immobilize enzimin aktivitesi zayıf manyetik alanda artırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Boronik asit, L-asparajinaz, Enzim immobilizasyonu, Nanotaşıyıcılar, Manyetik nanopartiküller

ABSTRACT

Master Thesis

SYNTHESIS OF WATER-SOLUBLE BORONIC ACID FUNCTIONAL MAGNETIC NANOPARTICLES AND THEIR USE IN L-ASPARAGINASE IMMOBILIZATION

Gamze Dik

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Chemistry

85+XI pages

2021

Supervisor: Prof. Dr. Burhan ATEŞ

L-asparaginase is an enzyme-drug used in the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) and some lymphomas. L-asparaginase, which is used in these treatments, has some side effects resulting from its isolation from bacteria and limiting its use. To prevent this situation, L-asparaginases are available in PEG-conjugated form. However, various magnetic nanocarrier systems are being developed to make L-asparaginase more biocompatible, to ensure that it reaches the desired region more effectively, and to examine its kinetic properties. The aim of this study is to synthesize boron-derived magnetic nanoparticles to immobilize L-asparaginase and to examine the kinetic properties of the immobilized enzyme.

For this purpose, magnetic iron oxide nanoparticles were synthesized and modified with boronic acid to be used as carrier matrix. All materials obtained within the scope of the study were characterized structurally and morphologically. In addition, the optimum parameters (pH, temperature), thermal stability, storage stability, reusability and kinetic parameters of the immobilized enzyme were investigated and compared with the free enzyme. Moreover, the activity of the immobilized enzyme under weak magnetic field was investigated. The optimum pH and temperature of the free enzyme were found to be 8.5 and 45 °C, respectively, while it was found to be 7.5 and 40 °C for the immobilized enzyme. Moreover, even after 10 cycles of use, the immobilized enzyme retained 54% of its initial activity. In kinetic studies, K_m values for free enzyme and for immobilized enzyme were found to be 10.376 ± 0.5 and 7.06 ± 2.99 mM, respectively, and V_{max} was found to be 138.88 ± 2.64 and 121.95 ± 1.070 $\mu\text{mol/min}$, respectively. In addition, when a magnetic field of 10 Hz and a magnetic flux of 20 mT were applied, it was observed that the activity increased approximately 3,2 and 4,3 times, respectively.

As a result, functional boron-derived magnetic nanocarriers with high water solubility were prepared for use in L-asparaginase immobilization, L-asparaginase enzyme was immobilized and the activity of the immobilized enzyme was increased in a weak magnetic field.

Keywords: Boronic acid, L-asparaginase, Enzyme Immobilization, Nanocarriers, Magnetic nanoparticle

1. GİRİŞ

Çağımızın en önemli hastalıklarından biri olan kanserle mücadele için çeşitli tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan enzim-ilaç tedavileri enzimlerin kemoterapide yüksek kullanım potansiyellerinin fark edilmesi ve olumlu sonuçların gözlenmesiyle birlikte oldukça ilgi gören bir yöntem haline gelmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada kullanılan L-asparajinaz (L-ASNaz, EC.3.5.1.1) enzimi, Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) tedavisi başta olmak üzere farklı birçok kanser türünün tedavisi için kullanılan bir enzimdir. L-ASNaz enzimi esansiyel olmayan L-asparajin amino asidini L-aspartik asit ve amonyağa dönüştürür. Sağlıklı hücreler ihtiyaç halinde L-asparajin amino asidini sentezleyebilirken, tümör hücreleri bu amino asidi sentezleyemez ve büyüebilmek için kandaki amino asidi kullanırlar. Bu sebeple kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan L-ASNaz enzimi, kandaki L-asparajin amino asidini ortamdan uzaklaştırarak kanserli hücrelerin büyümesini yavaşlatır ve zamanla ölümüne yol açar. Enzimlerin yüksek maliyetli olması, yarılanma ömürlerinin kısa olması ve çeşitli alerjik reaksiyonlar göstermeleri gibi dezavantajlar onların kemoterapide kullanımlarını sınırlandırabilmektedir. Bu dezavantajların önüne geçebilmek için yeni stratejiler geliştirilmektedir. Enzimlerin uygun taşıyıcılara immobilize edilmeleri bu stratejilerin başında gelmektedir. Çalışmalardan elde edilen sonuçlara dayanarak enzimlerin uygun taşıyıcılara immobilize edilmesi sayesinde çevresel faktörlere karşı dayanıklılığın artırılması, maliyetin düşürülmesi, yeniden kullanılabilirliği, ilacın istenilen bölgeye hedeflendirilmesi ve alerjik etkilerin azaltılması gibi olumlu etkilerinin olduğu söylenilebilir. Ancak, immobilizasyon yönteminin bu kadar avantajına rağmen, karşılaşılan en büyük sorun enzimin aktivitesinin sınırlanmasıdır. Bundan dolayı, son zamanlarda immobilize enzimlerin çeşitli uyarıcılarla (akustik, manyetik alan, elektrik vb.) aktivitesinin tetiklenmesi üzerine araştırmacılar yoğun bir şekilde çalışmaktadırlar.

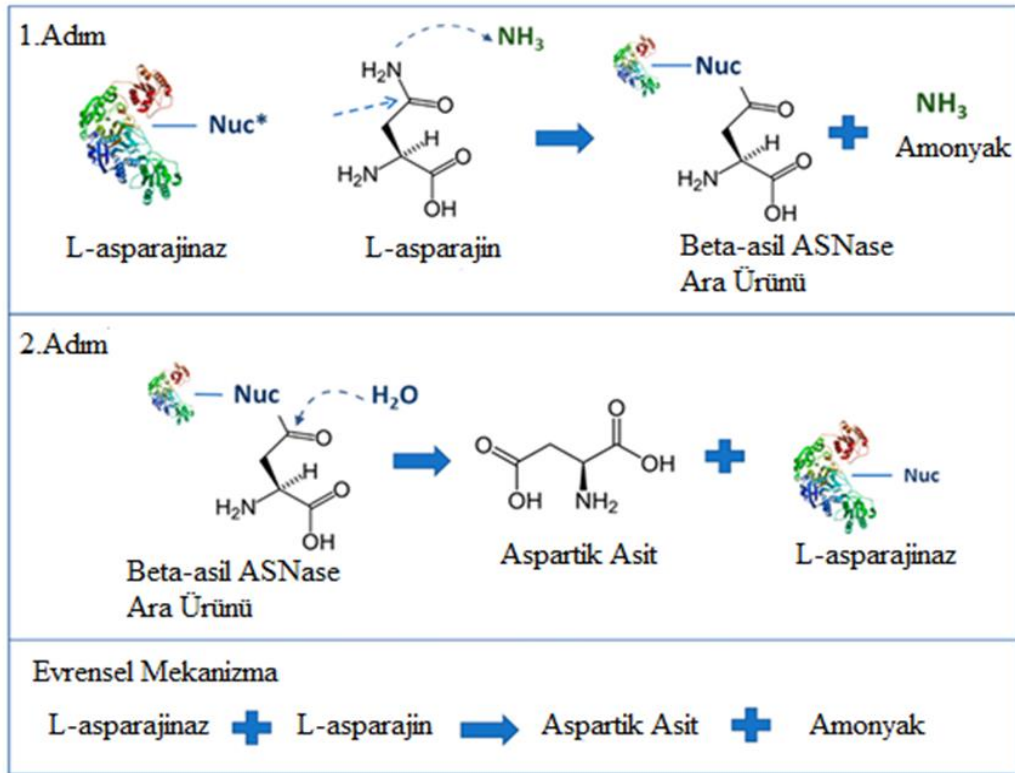
Bu amaçla yapmış olduğumuz çalışmada manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri hazırlanmış olup, 3-aminopropil trimetoksi silan (APTMS) ile modifiye edilerek NH_2 uçlar oluşturulmuştur. Hazırlanmış olan bu nanopartiküllere 4-vinil fenil boronik asit (4VPBA) eklendikten sonra poli etilen glikol (PEG) ile kaplanarak sudaki çözünürlüğü artırılmıştır.

Son olarak hazırlanmış olan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ nanopartiküllerine L-ASNaz enzimi immobilize edilmiştir. Hazırlanmış olan tüm malzemeler fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometre (FTIR), X-ışını difraksiyon (XRD), vibrasyonlu numune magnetometre (VSM), taramalı elektron mikroskopu (SEM), enerji yayımlı X-ışını analizi (EDX) ve dinamik ışık saçılımı (DLS) ile karakterize edilmiştir. İmmobilize enzim ile serbest enzimin optimum sıcaklık, optimum pH, depolama kararlılığı, kinetik parametre, termal kararlılık, yeniden kullanılabilirlik ve enzim aktivitesi üzerinde manyetik alan etkisi gibi parametreler ölçülerek immobilize edilen enzimin sağladığı avantajlar göz önüne serilmiştir.

Enzimin etkinliğine karşı kullanımını sınırlandıran sorunlar düşünüldüğünde, enzimin immobilize edilmesi kullanımını daha elverişli hale getirir. Bu çalışma hazırlanmış olan ve modifiye edilen Fe_3O_4 nanopartiküllerine L-ASNaz immobilizasyonunu içermekte olup, manyetik alan etkisi ile enzim aktivitesinin iyileştirilmesi ilaç taşıyıcı sistemler içinde yeni bir bakış açısı ortaya koymaktadır.

1.1.L-ASNaz

Enzimler canlı organizmalardaki biyokimyasal reaksiyonları hızlandıran biyolojik katalizörlerdir (Robinson, 2015). Enzimler substratlara özgü çalıştıklarından dolayı canlı hücrelerdeki metabolik olayları kontrol ederler. Bunun yanı sıra tıbbi çalışmalardan, tekstil çalışmalarına kadar olan çok geniş bir çalışma yelpazesine sahiptirler (Ahmed ve diğ, 2012). Son zamanlarda, enzimlerin klinik çalışmaları çeşitli hastalıkların tedavisi için oldukça artış göstermiştir. Bu enzimlerden biri olan L-ASNaz, esas olarak L-asparajinin, L-aspartik asit ve amonyağa hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. L-ASNaz'ın L-asparajini hidroliz tepkimesi iki aşamada gerçekleşir. İlk aşamada enzimin nükleofilik kalıntısı güçlü bir baz tarafından aktive edilir ve böylece L-asparajinin amil karbon atomuna saldırarak beta-asil-enzim oluşumuna neden olur. İkinci aşama ise bir su molekülü tarafından aktive edilen nükleofil tarafından ester karbonu üzerine etki eder ve ürün olarak L-aspartik asit ile amonyak molekülünü oluşturur (Cachumba ve diğ., 2016). L-ASNaz'ın, L-asparajin amino asidini L-aspartik asit ve amonyağa hidrolizini katalizleyen tepkime Şekil 1.1'de gösterilmektedir.



Şekil 1.1 : L-ASNaz'ın kataliz reaksiyonu (Nunes ve diğ, 2020)

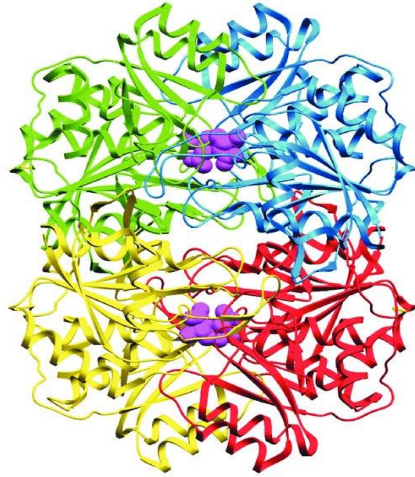
L-ASNaz'ın aynı zamanda L-glutamin, D-asparajin, D-glutamin amino asitlerine de düşük bir derecede affinitesi vardır.

1.2. L-ASNaz'ın Moleküler Yapısı

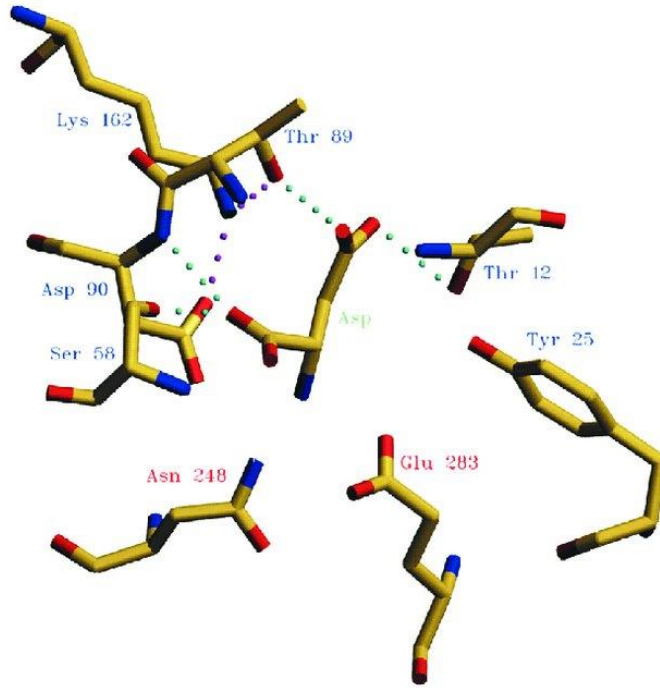
L-ASNaz aktivitesi ilk olarak **Clementti (1922)**, tarafından domuz kan plazmasında keşfedilmiştir. Ardından **Kidd (1953)**, L-ASNaz'ı bakteri ve bitki gibi farklı kaynaklardan saflaştırmak üzerine bir çok çalışma yapmıştır ve uyguladığı kobay serumunun antitümör aktivite gösterdiğini rapor etmiştir. Daha sonra Neuman ve McCoy, (1956) L-asparajin varlığında ve yokluğunda *in vitro* koşullar altında normal hücreler ve tümör hücreleri arasındaki metabolik farklılıkları sunmuşlardır. Tüm bu bilgilerden yola çıkarak **Broom (1953)**, kobay serumunun antitümör aktivitesinin L-ASNaz enzimi tarafında L-asparajinin tüketilmesine bağlamıştır. Enzimin antitümör aktivitesinin kabul edilmesine rağmen, o zamanlar kobay olarak domuzun kullanılması ve büyük miktarlarda enzimin saflaştırılamaması kullanılmalarını sınırlandırmaktaydı. Bu nedenle 1964'te Mashburn ve Wriston alternatif enzim kaynağı araştırmaya başlamışlardır. Son olarak Champell ve arkadaşları bakterilerden saflaştırılan enzimleri Tip I ve Tip II olmak üzere ikiye ayırmışlardır. Tip I L-ASNaz periplazmada bulunurken Tip II L-ASNaz sitoplazmada

bulunmaktadır. Bununla beraber Tip II L-ASNaz'ın antitümör özellik gösterdiği bilinmektedir.

L-ASNaz'ın en yaygın saflaştırıldığı bakteri türleri *E. Coli* ve *Erwinia sp.*'dir. *E.coli*'den saflaştırılan L-ASNaz'ın molekül ağırlığı 132-141 kDa arasındayken *Erwinia sp.* yaklaşık 138 kDa'dır. L-ASNaz her biri 35,6 kDa'dan oluşan homotetrametik bir yapıya sahiptir. Aşağıda verilmiş olan Şekil 1.2'de *E.Coli*'den saflaştırılan L-ASNaz'a ait molekül yapısı gösterilmektedir. Ayrıca verilmiş olan Şekil 1.3'te yine *E.Coli*'den saflaştırılan Tip II L-ASNaz'ın aktif merkezdeki amino asitleri gösterilmektedir.



Şekil 1.2 : *E.Coli*'den saflaştırılan L-ASNaz enziminin moleküler yapısı (Swain ve diğ, 1993)



Şekil 1.3 : *E. Coli*'den saflaştırılan Tip II L-ASNaz enziminin aktif merkezinin aminoasit rezidüleri (Swain ve diğ, 1993)

1.3.L-ASNaz Kaynakları

Amino asit sekansı ve biyokimyasal özellikleri göz önüne alındığında L-ASNaz enzimi bulunduran birkaç farklı grup mevcuttur. Bunlar bakteriler, mantarlar, aktinomisetler, algler ve bitkiler olarak sınıflandırılabilirler. En yaygın kullanılan sınıf türü ise bakterilerdir. L-ASNaz'ın pankreatit, hiperglisemi hepatoksisite, pıhtılaşma, immünolojik vb. çeşitli yan etkilerinin enzimin farklı kaynaklardan saflaştırılması ve kapsamlı karakterizasyonu ile birlikte ortadan kaldırılabilir (Oza ve diğ, 2011; Borek ve Jaskolski, 2001).

1.3.1. Bakteriyel Kaynaklar

Bakteriyel L-ASNaz'lar Tip I ve Tip II olmak üzere iki şekilde sınıflandırılırlar (Campbell ve diğ. 1967). Tip I enzimler periplazmada ifade edilirler ve hem asparajini hem de glutamini hidrolize ederler. Tip II enzimler ise sitoplazmada ifade edilirler ve ekspresyonları için anaerobik ortam gereklidir. Bunun yanı sıra Tip II L-ASNaz'lar tümör hücreleri için temel bir besin olan L-asparajin'e karşı yüksek bir affiniteye sahiptirler.

L-ASNaz varlığı *E. Coli*, *E. Carotovora*, *Bacillus sp*, *Pseudomonas spp*, *E. Chrysanthemi* gibi birçok bakteri türünde tespit edilmiştir (Cappelletti ve diğ, 2008). Ancak günümüzde endüstriyel ve klinik uygulamalarda, yüksek affiniteleri ve düşük glutaminaz aktivitesi sebebiyle *E. Coli* ve *E. Chrysanthemi* bakterileri daha çok kullanılmaktadırlar.

1.3.2. Aktinomisetler

Zengin antibiyotik kaynakları, anti-tümör ilaçlar ve diğer birçok biyoaktif olarak dikkat çeken bu organizmalar üzerinde çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Aktinomisteler, tüm L-ASNaz üreten kaynaklar arasında üzerinde en az durulmuş organizmalardır (Sudhir ve diğ, 2012). Ayrıca *S. Karnatakensis*, *S. venezuale*, *S. Longisporusflavus*, *S. Ginsengisoli herampon jarbua* gibi aktinomisetlerin L-ASNaz ürettiği bilinmektedir (Deshpande ve diğ, 2014; Mostafa ve diğ., 1979; Mostafa ve Salama, 1979).

1.3.3. Algler

Algal L-ASNaz ilk olarak John H. Paul tarafından *Chlamydomonas spp*'den saflaştırılmıştır (Paul, 1982). Saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı 275 kDa, Km değeri ise $1,34 \times 10^{-4}$ M olarak tespit edilmiştir. Enzimi *in vivo* koşullarda az antitümör etkisinin

gözlenmesi, saflaştırılan bu enzimin klinik çalışmalar için tercih edilmemesine neden olmuştur.

1.3.4. Bitkisel Kaynaklar

Bitkilerde L-asparajin başlıca nitrojen depolama ve taşıma bileşiğidir. Bitkilerde L-ASNaz protein sentezi için gerekli olan amonyağı L-asparajin'den serbest bırakmakla görevlidir. L-ASNaz bitkilerde arpa kökleri, *Lupinus leutus* ve *Dilichos lab* fideleri, yeşil biber, *Tamarindus indica*, *Lupinus angustifolius*, soya fasulyesi yaprakları, *Lupines arabreus*'un yaprakları, çiçek tomurcukları, ve kök uçları, *Arabidopsis thaliana*, nohut fidesi kotiledonları, bezelye, *Lotus japonicas*, *Datura innoxia*, *Lypersicum lycopersicum*, *Vigna unguiculata* gibi birçok bitki türünde tespit edilmiştir (El-Sayed ve diğ, 2012; Bruneau ve diğ, 2006; Cho ve diğ, 2007; Oza ve diğ, 2009). Ayrıca birçok yüksek bitkide de tespit edilmiştir. Fakat yüksek bitkilerden L-ASNaz'ın saflaştırılması ve karakterizasyonu konusunda çok az çalışma mevcuttur (Oza ve diğ, 2009).

1.3.5. Mayalar

L-ASNaz mantarlardan da izole edilebilmektedir. Ayrıca bakterilerden elde edilen L-ASNaz'lara kıyasla daha az yan etkileri olduğu gözlenmiştir. *Aspergillus tamarii* ve *Aspergillus terreus* L-ASNaz izole edilebilen mantarlara örnek gösterilebilmektedir (Sarquis ve diğ, 2004).

1.3.6. Rekombinant L-ASNaz

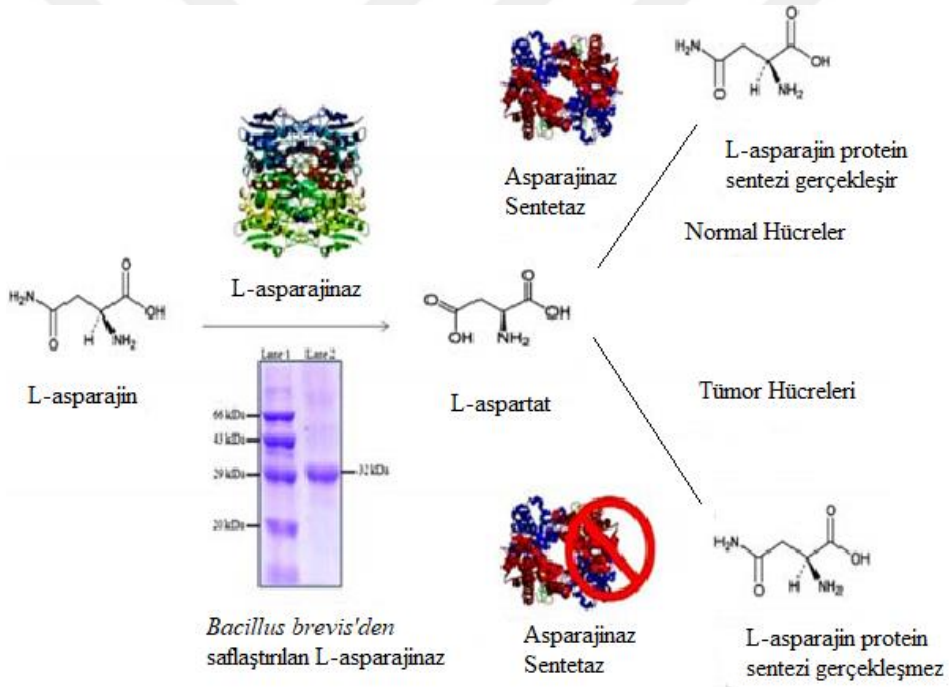
L-ASNaz'ın hidroliz aktivitesi ilk olarak Lang tarafından birkaç sığır eti dokusunda keşfedildiğinden (Lang, 1904), bakteri, maya, mantar, bitki, hayvan ve hatta toprakta dahil olmak üzere değişken L-ASNaz kaynakları bulunmuştur (Kuldeep Kumar, 2012). Bunlardan *E. coli* ve *Erwinia*'dan L-ASNaz için kodlanan gen, ilaç pazarında rekombinant L-ASNaz üretimi için sıklıkla kullanılmaktadır, ancak *Erwinia* L-ASNaz, *E.coli* L-ASNaz'a karşı duyarlılığı yüksek olan hastalar için daha uygundur (Mashburn ve Landin, 1970; Gallo ve diğ., 1971; Ashworth ve MacLennan, 1974).

1.4. L-ASNaz'ın Etki Mekanizması

L-ASNaz'ın substratı olan L-asparajin, amino asitlerin amid grubu üyesidir ve tümör hücreleri için önemli bir besin kaynağıdır. Kanserli hücrelerde artan yayılma hızı ve metabolik süreçler nedeniyle bu aminoaside olan ihtiyaçları artmaktadır (Luhana ve diğ, 2013). Bu L-asparajin talebi iki şekilde karşılanır:

1. Kan serumundan
2. Hücrelerin kendileri tarafından sentezlenmesi yoluyla

Bir enzim-ilaç modeli olan L-ASNaz L-asparajini, L-aspartik asit ve amonyağa hidrolize eder (Narta ve diğ, 2007). Ortaya çıkan düşük L-ASNaz seviyesi, normal hücreleri etkilemeden, tümör hücrelerinin canlılığını etkileyerek büyümelerini engeller. Bu sebeple bu enzim ilaç modeli başta ALL olmak üzere, Hodking Hastalığı, Melano karsinoma gibi kanser hastalıklarının tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Aşağıda verilmiş olan Şekil 1.4'te L-ASNaz'ın etki mekanizması verilmiştir.



Şekil 1.4 : L-ASNaz etki mekanizması (Azmi ve diğ, 2017)

1.5.L-ASNaz'ın Kemoterapötik Etkisi

L-ASNaz aktivitesi ilk olarak 1904 yılında Lang tarafından sığır dokularında tespit edilmiştir. Clementi, 1922 yılında, Lang'ın gözlemi için deneysel bulguları sağlamış ve enzimin amido-hidrolitik aktivitesinin otçulların tüm dokularında, sadece omnivor hayvanları karaciğerlerinde bulunduğunu ve etçil hayvanların organlarında bulunmadığını bildirmiştir (Clementi,1922). Bir anti-kanser olarak enzimin gücü kobay serumunun anti-tümör özelliklerini gözlemleyen Kidd tarafından keşfedilmiştir (Kidd, 1953). Sonraki yıllarda Neuman ve McCoy, *in vitro* koşullarda L- asparajin varlığı ve yokluğu durumunda tümör hücrelerinin ve normal hücrelerin arasındaki metabolik farklılıkları göstermişlerdir (Neuman ve McCoy, 1956). Bu bilgilere dayanarak Broom, kobay serumunun anti-tümör aktivitesini L-ASNaz enzimi tarafından L-asparajin tüketimiyle ilişkilendirmiştir (Broom, 1963).

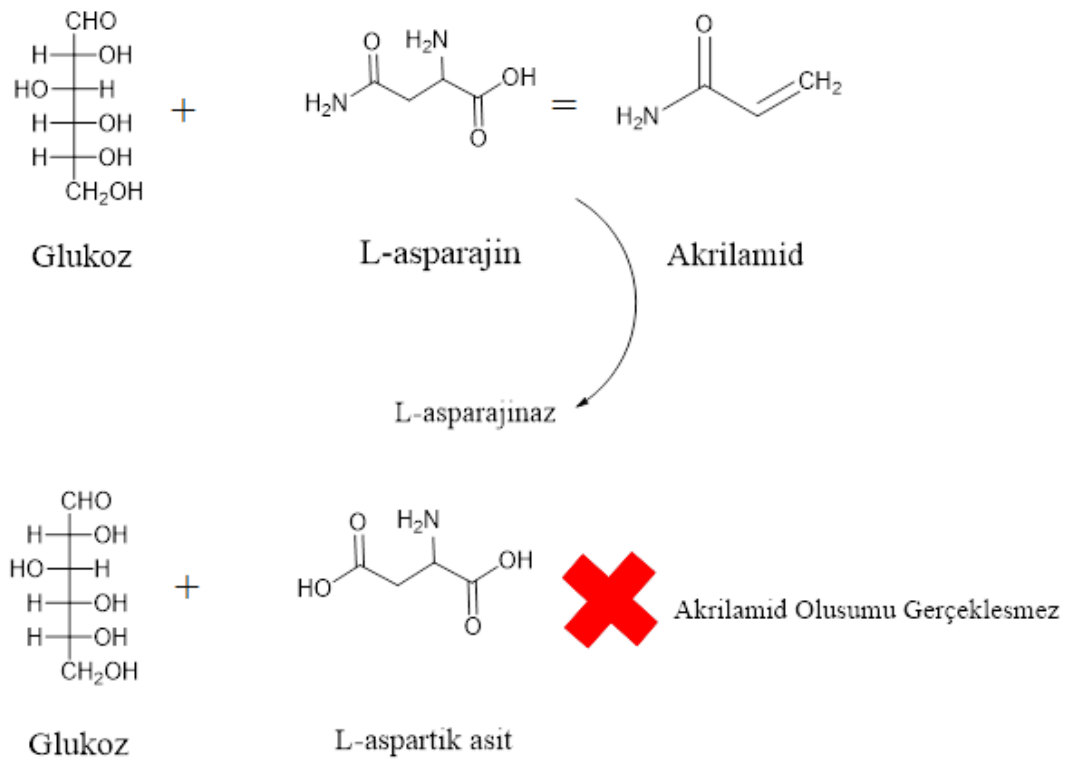
Enzimin bir antikanser ilaç olarak kullanılması teorisinin kabul edilmesine rağmen, o zamanlar ana kaynak olarak kobayların ve domuz serumlarının kullanımı enzimlerin izole edilebilmesini zorlaştırmaktaydı. Bu nedenle farklı enzim kaynağı olarak *E. coli* üzerinde çalışmışlardır (Champbell ve diğ, 1964). Daha sonra 1970'li yıllarda bakteriyel kaynaklı L-ASNaz'ların yan etkilerinin gözlenmesi, enzimin yapısal özelliğini değiştirmeden yan etkilerinin azaltılması amaçlanarak enzim PEG'e bağlanmıştır. Ayrıca doğal formlarına kıyasla azalmış antikor oluşumu ve yarılanma ömründe önemli ölçüde uzama gözlenmiştir (Abuchowski ve diğ, 1979).

1.6.Ticari L-ASNaz'lar

L-ASNaz'ın halihazırda kullanılan üç preparatı mevcuttur. Bunlar; *E. Coli* L-ASNaz (Elspars Merck& Co, West point, PA, ABD), *Pegasparagase* (Oncaspars Enzon, Inc., Bridgewater, NJ,ABD) ve *Erweniases* (Ipsen-Speywood, Pharmaceuticals Ltd, İngiltere) olmak üzere gruplandırılabilir. Ayrıca *Medacs* (Kyowa Hakko, Kogyo, Japonya), *Crasnitins* (Bayer AG, Leverkusen, Almanya), *Leunases* (Sanofi-Aventis, Paris, Fransa) gibi muadilleri de mevcuttur. Mevcut olan bu preparatların doğal formlara kıyasla daha uzun bir yarı ömre sahip oldukları ve daha az immünolojik yan etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

1.7.Gıda Endüstrisinde L-ASNaz Kullanımı

Akrilamid insanlar için kanserojen bir madde olarak bilinir ve gıdalarda bulunan L-ASNaz ile karbonil bileşikleri arasında gerçekleşen Maillard reaksiyon sonucu açığa çıkar (Medeiros ve diğ, 2011). Maillard reaksiyonları akrilamid oluşturmaya rağmen gıda endüstrisinde birçok olumlu değişikliğe de neden olduğundan tamamen ortadan kaldırılması mümkün değildir. Bu sebeple özellikle yüksek dozda tüketildiğinde hemoglobin ile katkı oluşturan ve üreme bozukluğunada neden olan akrilamidin gıdalarda oluşumunu engellemek için L-ASNaz enziminden faydalanılmaktadır (Williams ve diğ., 2019). Son yıllarda, L-ASNaz, gıda sisteminde akrilamid oluşumunun azaltılmasında bir uygulama bulduğu için gıda enzimi olarak başarıyla kullanılmıştır. L-asparajin nişastalı gıdaların birçoğunda bulunur ve ısıtma işlemi sırasında indirgenen şeker ile reaksiyona girerek Maillard reaksiyonunun bir yan ürünü olan akrilamidi oluşturur (Mottram ve diğ, 2002). L-ASNaz varlığında akrilamid oluşumu engellenmiş olur. L-ASNaz'ın akrilamid oluşum sürecindeki rolü aşağıda verilmiş olan Şekil 1.5'te gösterilmektedir.



Şekil 1.5 : Maillard reaksiyonu

2. ENZİM İMMOBİLİZASYONU ve İMMOBİLİZASYONDA KULLANILAN TAŞIYICI MATERYALLER

2.1. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, birçok kimyasal reaksiyonu katalize eden biyomoleküllerdir ve canlı organizmalardan saflaştırılırlar. Üretim kolaylığı, substrat özgüllüğü ve yeşil kimyası nedeniyle birçok farklı alan tarafından ilgi görmüştür. Bununla beraber, stabilite, raf ömrü ve yeniden kullanılabilirliklerinin olmaması kullanımlarını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle enzimlerin özelliklerinin geliştirilmesi ve dezavantajlarının önüne geçebilmek için yeni stratejiler geliştirilmektedir. Enzim immobilizasyonu, bu sorunların üstesinden gelme stratejilerinden biridir (Lima-Ramos ve diğ, 2014).

Enzim immobilizasyonu, enzimlerin substrat ve üründen farklı bir taşıyıcı matrikse bağlanması olarak tanımlanır. Bu taşıyıcı matriksler bazı özelliklere sahip olmalıdırlar. Bunlar; uygun maliyetli olmalı, toksik olmamalı, inert olmalı, yeniden kullanılabilir olmalı enzim aktivitesini arttırabilme, ürün inhibisyonunu azaltabilme ve en önemlisi klinik uygulamalar için biyoyoumlu olmalı denilerek sıralanabilir (Brady ve Jordaen, 2009) .

Enzim immobilizasyonunun temel amacı, düşük sentez maliyeti ve yüksek bağlama kapasitesine sahip bir taşıyıcı matriks kullanarak mümkün olan enzim katalizinin avantajlarını maksimum hale getirmektir (Garcia-Galan ve diğ, 2011). İmmobilize edilmeyen bir enzimin stabilitesi esas olarak kendi iç yapısı tarafından belirlenirken, immobilize bir enzimin stabilitesi, taşıyıcıyla etkileşiminin doğası, bağlanma konumu ve bağ sayısı matriksteki konformasyon değişikliği özgüllüğü, enzim molekülünün bulunduğu mikro ortam, taşıyıcının kimyasal ve fiziksel yapısı, aralayıcının özellikleri (örneğin, yüklü veya nötr, hidrofilik veya hidrofobik, boyut, uzunluk), enzim moleküllerinin immobilize edildiği koşullar dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Bu nedenle, immobilize enzimlerin zaman, sıcaklık ve diğer saklama koşulları ve deneysel değişkenlere göre stabilitesinin, immobilizasyonda artması veya azalması beklenebilir (Sheldon, 2007). Sunulan bu bilgiler dikkate alındığında immobilize edilen enzimin, immobilize edilmeyen enzime kıyasla bazı avantajları olduğu söylenilebilir. Bu avantajlar aşağıda sıralanmaktadır.

- Genellikle daha yüksek stabilite gösterirler
- Yeniden kullanılabilirler
- Çevresel koşullara (sıcaklık, pH vb.) daha dayanıklıdırlar

- Yeniden kullanılabilirlikleri sayesinde maliyeti düşürürler
- Reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilirler
- Klinik uygulamalarda yan etkilerin azalmasını sağlarlar.

2.2.Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

İmmobilizasyon yönteminin seçimi, enzimin bağlanma yerindeki kimyasal yapıyı veya reaktif grupları değiştirmeyerek enzim aktivitesi kaybını önlemek için çok önemlidir. Enzimin aktif bölgesinin doğası hakkında önemli bilgiler yardımcı olacaktır. Diğer yandan, aktif bölge koruyucu grupların bağlanmasıyla korunabilir, daha sonra bunlar herhangi bir enzim aktivitesi kaybı olmadan çıkarılabilir. Bazı durumlarda, bu koruyucu işlev, bir substrat veya enzimin yarışmalı bir inhibitörü tarafından yerine getirilebilir. Enzim immobilizasyonunun en yaygın prosedürleri adsorpsiyon, kovalent bağlanma, tuzaklama ve çapraz bağlamadır (Sheldon, 2007). Şekil 2.1’de çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin şematik temsilini verilmektedir.



Şekil 2.1 : Farklı immobilizasyon yöntemleri (Gonçalves ve diğ, 2019)

2.2.1. Kimyasal immobilizasyon yöntemleri

Geri dönüşümsüz immobilizasyon yöntemlerinde enzim taşıyıcı matrise geri kazanılmayacak bir şekilde bağlanır. Enzim kimyasal yapısını ve aktivitesi kaybetmeden taşıyıcı matrisden ayrılmaz. Geri dönüşümsüz immobilizasyon yöntemleri 3 başlık altında toplanabilir.

2.2.1.1. Çapraz bağlama yöntemi

Bu yöntem, enzimlerin iki veya çok işlevli reaktifler veya ligandlarla birbirine bağlanmasını içerir . Bu şekilde, çok yüksek moleküler ağırlıklı tipik olarak çözünmeyen agregatlar oluşur. Çapraz bağlama basit bir süreçtir. Herhangi bir taşıyıcı matriksi kullanmadığı için çokça tercih edilen bir yöntem değildir. Kovalent türden bir bağ içerdiğinden, bu şekilde immobilize edilmiş enzimler sıklıkla konformasyonel değişikliklere uğrayarak aktivite kaybına uğrar. Bu yöntem diğer desteğe bağlı immobilizasyon yöntemleri ile kombinasyon halinde, yani adsorpsiyonla immobilize edilmiş enzimlerin kaybını en aza indirmek için elverişli bir yöntemdir.

Çapraz bağlama için en yaygın olarak kullanılan iki işlevli ajan glutaraldehittir. Glutaraldehidin iki ucundaki reaktif aldehit grupları, bir baz reaksiyonu yoluyla enzimlerin serbest amino grupları ile reaksiyona girer. Gluteraldehit düşük maliyeti, yüksek etkinliği ve stabilitesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmasına rağmen bazı dezavantajları da vardır. Başlıca dezavantajlar, katalitik grupların immobilizasyondan sorumlu etkileşimlere katılımindan kaynaklanabilecek istenmeyen aktivite kayıplarıdır (Bilal ve diğ, 2017; Brady ve diğ, 2008).

2.2.1.2. Kovalent bağlama yöntemi

Enzimler taşıyıcı matrikse kovalent bağlar yardımıyla bağlanır. Enzim molekülleri ya doğrudan matriks üzerinde bulunan reaktif gruplara ya da çeşitli kimyasal reaksiyonlarla matrikse yapay olarak bağlanan bir ara yüzey yardımıyla bağlanır. Taşıyıcı matriks olarak doğal ya da sentetik matriksler kullanılabilir. Uygun taşıyıcı matriks seçimi, çeşitli uygulamalar sırasında maliyetine, bağlama kapasitesine, kullanılabilirliğine, hidrofilikliğine, yapısal özelliklerine ve dayanıklılığına bağlıdır.

Bu immobilizasyon yöntemi yok denecek kadar az konformasyonel değişikliklere yol açan esansiyel olmayan aminoasitleri içerir. İmmobilize enzimlerin aşır fıziksel veya kimyasal koşullara karşı yüksek direnç göstermesini sağlar. Bununla beraber bu yöntemde sert immobilizasyon koşulları ve enzimin etkileşimi sırasında dahil olan aktif bölgedeki benzer amino gruplarının uyumu nedeniyle enzimin konformasyonel ve katalitik özelliklerinde ciddi değişikliklere neden olur (Kayastha diğ, 2003; Reddy ve Kayastha, 2006; Zheng ve diğ, 2012; Pierre ve diğ, 2006).

2.2.1.3. İyonik bağlama yöntemi

Bu yöntem, yüklü bir taşıyıcı matriks ile enzim molekülleri arasındaki iyonik etkileşimlere dayanmaktadır. Burada, matriks üzerindeki yüzey yük yoğunluğu ne kadar yüksekse, matrikse bağlanan enzim miktarı o kadar büyük olacaktır. Bazen iyonik etkileşimlere ek olarak enzim molekülleri de taşıyıcı matrikse fiziksel olarak adsorbe edilebilir. İmmobilizasyon sırasında iyonik etkileşimler yoluyla enzim bağlanması, çözeltinin pH'ına, enzim konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlıdır. Yaygın olarak kullanılan matriksler polisakarit türevler, sentetik polimerler ve inorganik malzemeler olarak sıralanabilir. Bu immobilizasyon yöntemi enzimin yapısında minimum değişikliklere yol açar. Bununla birlikte, optimal olmayan koşullar altında matriksten enzim ayrılma şansı arttığı için, immobilize enzimin katalize uğradığı çözeltinin doğru iyonik kuvvetinin ve pH'sının korunmasına özel önem verilmelidir (Kayastha ve Srivastava, 2001; Tripathi ve diğ, 2007; Kumar ve diğ, 2009; Neto ve diğ, 2011).

2.2.2. Fiziksel immobilizasyon yöntemleri

Fiziksel immobilizasyon yöntemleri enzim ve taşıyıcı matriks arasındaki ikincil etkileşimlerden faydalanılmaktadır. Bu yöntemde enzim ve matriks arasındaki etkileşimler geri dönüştürülebilirler.

2.2.2.1. Adsorbsiyon yöntemi

Çözünmeyen taşıyıcı matrikslerin üzerine enzimlerin adsorbsiyonu, diğer immobilizasyon yöntemlerine göre geniş uygulama ve yüksek kapasiteli enzim yüklemesine sahip çok eski ve basit bir yöntemdir. Bu yöntemle enzimler, enzimlerin uygun bir adsorban madde ile uygun pH ve iyonik kuvvet koşulları altında basitçe karıştırılmasıyla immobilize edilebilir. Adsorban seçimi özellikle kullanılan enzim sızıntısının en aza indirilmesini hedef alır. Kimyasal modifikasyonu ve enzim hasarını önlemek için, enzimlerin ve taşıyıcı matriksin mevcut yüzey özelliklerinin dikkate alınması gerekir, pH veya iyonik güçte olağandışı değişikliklerin kullanımı sırasında bağlanma kuvvetlerinin zayıflamasına dikkat edilmelidir. Adsorpsiyon, genellikle protein mikro ortamında büyük değişikliklere yol açar ve tipik olarak, tek bir protein molekülü ile immobilizasyon yüzeyindeki bir dizi bağlanma bölgesi arasında çok noktalı protein adsorpsiyonunu içerir. Bu yöntemin temel dezavantajı, enzimin sıcaklık dalgalanmaları, substrattaki değişiklikler ve iyonik

konsantrasyonlar gibi faktörler tarafından kolaylıkla desorbe edilmesidir (Junior ve diğ, 2016; Bastida ve diğ, 1998).

2.2.2.2. Şelasyon ve metal bağlama yöntemi

Şelasyon veya metal bağlama yöntemi, çoğunlukla kromatografik bir yöntem olarak kullanılan bir başka yaygın fiziksel enzim immobilizasyonu türüdür. Yüksek maliyetli ve güvenlik sorunları içeren bu yöntem, endüstrilerde çok tercih edilmemektedir. Bu yöntem yüklü ve polar amino asitlerin (histidin, lizin, fenilalanin, sistein ve tirozin) koordinat bağları yoluyla metal iyonlarına bağlanma kabiliyetine dayanır. Taşıyıcı matriks yüzeye bağlanan metal iyonları, kendilerine zayıf bir şekilde bağlanmış metal ligandlara sahiptir. Enzimin taşıyıcıya maruz kalması üzerine, zayıf ligandların yerini enzim molekülleri alır (Wu ve diğ, 2009). Bağlanma, metal iyonu için daha yüksek afiniteye sahip bir ligandın (etilen diamin tetraasetat, EDTA) katılmasıyla veya fazla rakip ligandın eklenmesiyle kolayca tersine çevrilebilir (Afaq ve diğ, 2001).

Bağlanmanın tersine çevrilmesi, verim üzerinde herhangi bir kayda değer etki olmaksızın desteğin kolayca yenilenmesini sağlar. Diğer tersine çevrilebilir enzim immobilizasyon yöntemlerine göre en önemli avantajı, enzim salınımının maksimum düzeyde kısıtlanabilmesi nedeniyle bağlanmanın makul ölçüde güçlü olmasıdır. Çeşitli şelatlama anyonları geçici olarak matrikse eklenebilir ve ardından enzimin desteğe yarı kararlı eklenmesi izler (Afaq ve diğ, 2001). İlgili reaktifler gıda ürünlerinin üretimi için güvenli olmayabilir ve sağlık tehlikelerine neden olabilir. Enzimlerin aktif bölgelerinde metal iyonları ile etkileşime bağlı olarak enzim aktivitesindeki azalma da bu işlemin önemli bir dezavantajıdır.

2.2.2.3. Disülfid bağı yöntemi

Bu yöntemde enzim ve taşıyıcı matriks arasında disülfür bağları mevcuttur. Aslında bir tür kovalent bağlanma yöntemi olmasına rağmen bağlanmanın tersine çevrilebilirliği sağlanılabilir. Bu yöntemde immobilizasyon sırasında serbest bir tiyol grubu ile genellikle sistein kalıntıları üzerinde disülfid bağı oluşmaktadır. Bu reaksiyon uygun koşullar altında ditiyotritol eklenmesiyle geri dönüştürülebilir (Neves-Petersen ve diğ , 2006).

2.2.2.4. Tuzaklama yöntemi

Tuzaklama yönteminde, enzimin her yönde bir polimere (poliakrilamid, aljinat vb.) çapraz bağlanmasını, enzimin yüzeyinde bulunan hemen hemen her yan zinciri polimer kafesi içindeki fiziksel tuzakla kaplamayı içerir. Sürekli dönüşümü sağlayan uygun boyutta substratın nüfuz etmesine ve ürün moleküllerinin salınmasına izin verir. Ancak bu yöntem sadece sınırlı sayıda enzimde kullanılabilir. Bu yöntemin birkaç avantajı vardır: basitlik, iç enzim özelliklerinde değişiklik olmaması, kimyasal modifikasyon içermemesi, minimum enzim gereksinimi ve çeşitli şekillerde matrisler mevcuttur. Bu yöntemin çeşitli dezavantajları; sadece küçük boyutlu substrat / ürünler kullanılabilen enzim sızıntısı, matrisin mekanik özellikleri ile enzim aktivitesi üzerindeki etkisi ve difüzyon kısıtlamalarının varlığı arasında hassas bir denge gerektirir (Das ve diğ, 1998; Nakarani ve Kayastha, 2007).

2.2.2.5. Enkapsülasyon yöntemi

Bu yöntemin temel ilkesi, substratlara veya ürünlere kıyasla enzimin daha büyük boyutudur. Enzim yarı geçirgen bir zar içinde tutulabildiğinde veya tıkandığında, küçük substrat moleküllerinin içeri dağılmasına ve ürün moleküllerinin dağılmasına izin verecektir. Ancak enzimler çok daha büyüktür, membrandan geçemez ve zarın içinde kalırlar. Dolayısıyla, enzim, kapsül içinde serbestçe hareket etmesine rağmen, zar içinde sınırlıdır. Bir membran içerisindeki kapsülleme, enzim yapısını doğal formunda tutar ve enzimin sızmasını önleyerek onu ortamın zorlu koşullarından korur. Çoklu enzim kapsüllemeleri, bir zar içinde birden fazla enzimi yakalayarak da oluşturulabilir . Fakat bu teknik, benzer çaplardaki substrat ve enzim moleküllerini içeren reaksiyonlar için tavsiye edilmez çünkü bu gibi durumlarda optimum gözenek boyutu seçilemez (Krishnamoorthi ve diğ, 2015).

2.3.Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılan Nanotaşıyıcı Malzemeler

Nano, kelimesi Yunanca ‘*Nanos*’ yani cüce anlamına gelir. Nano yapıları taneciklere nanometre ölçeğiyle değerlendirilir ve nanometre metrenin milyarda birine (10^{-9}) denktir. Nano teknolojiye ait ilk çalışmalar 1959 yılında Richard Feynman tarafından başlatılmasına rağmen nanoteknoloji kelimesini ilk kez 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından kullanılmıştır. Nanoteknolojide nanomalzemenin boyutu genellikle 1-100 nm arasındadır. Ancak bu nm aralığında bulunan her malzemeye nanomalzeme demek doğru değildir

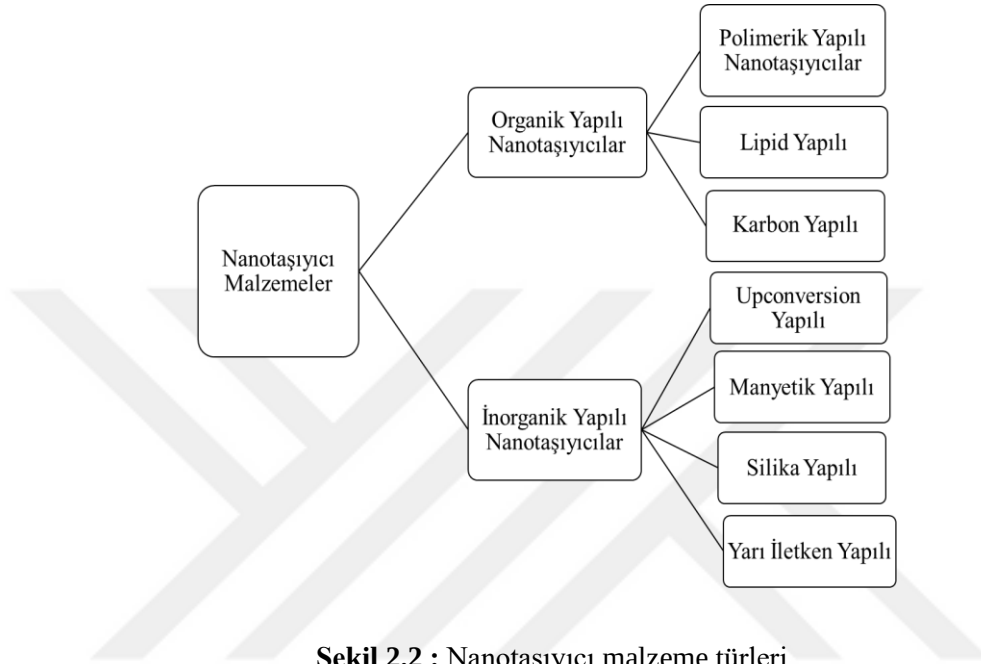
(Gürsoy, 2014). Çünkü bu malzemenin nanomalzemenin getirdiği yüksek yüzey hacim oranı, yüksek yüzey enerjisi, benzersiz mekanik, termal, elektriksel, manyetik ve optik özellikleri gibi avantajları taşıması gerekmektedir. Bu avantajlara sahip olmaları nano malzemelerin elektronikten depolamaya, iletişimden biyolojik ve medikal uygulamalara kadar yaygın bir şekilde kullanılmasını sağlar.

Nanotaşıyıcı malzemeler görüntüleme problemleri terapötik ajanlar ve biyolojik materyalleri belirli bir doku organ ve hatta hücre gibi hedeflenen bölgelere verimli bir şekilde taşıyıp dağıtılabildikleri için biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle enzim immobilizasyonları ve ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaları oldukça ilgi görmektedir. Bu alanlarda kullanılan nanotaşıyıcı malzemeler vücutta bulunan çeşitli doğal nanomalzemelerden ilham almaktadır. Bunlar vücuttaki doğal işleyişi düzenleyen ve aktif moleküllerin taşıyıcıları olarak hareket edebilen çeşitli nanoboyutlu veziküller, lipidler, proteinler ve karmaşık biyomakromolekülleri içerir. Nanotaşıyıcı malzemelerin biyomedikal uygulamadaki avantajlarını aşağıdaki gibi sıralayabiliriz.

- ❖ Nanotaşıyıcı malzemeler boyutlarının getirmiş oldukları avantajlar sebebiyle damarlardan kolayca kan dolaşımına karışabilirler.
- ❖ Yüzey alanı artışı için çözünürlükleri de artmaktadır.
- ❖ Nanotaşıyıcı malzemeler istenildiği bölgeye ya da belirlenen dokuya hedeflendirilebilirler.
- ❖ Biyouyumlu bir polimerle kaplanarak *in vivo* koşullara da daha uzun süre kalması sağlanılabilir ve toksik etkileri düşürülebilir.
- ❖ Nanotaşıyıcı malzemeler hem etki maddesini hem de görüntüleme maddesini aynı anda içerebilirler. Bunlara teranostikler denir. Teranostikler sayesinde ilacın veya enzimin istenilen bölgeye ulaşp ulaşmadığı ve tedavinin etkinliği izlenilebilir.
- ❖ Nanotaşıyıcı sistemlerde aynı anda çok sayıda etkin maddeyi bağlayabilir (Sayiner ve Çomoğlu, 2014; Gürsoy, 2014)

2.4.Nanotaşıyıcı Malzemeler

Nanotaşıyıcı malzemelerin çeşitli türleri mevcuttur. Hangi nanotaşıyıcı malzemenin nerede kullanılacağı etkin maddenin türü, kullanım amacı ve uygulama alanlarına bağlı olarak değişir. Verilmiş olan Şekil 2.2’de nanotaşıyıcı malzemelerin sınıflandırılması şematize edilmiştir.



Şekil 2.2 : Nanotaşıyıcı malzeme türleri

2.4.1. Organik yapıli nanotaşıyıcılar

Organik yapıli nanotaşıyıcılar diğér taşıyıcılara kıyasla daha iyi biyoyumluluk özellikleri gösterdikleri için biyomedikal alanlar tarafından ilgi görmektedir. Organik nanotaşıyıcılar; polimerik yapıli nanotaşıyıcılar, karbon yapıli nanotaşıyıcılar, lipid yapıli nanotaşıyıcılar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar (Chen ve diğ, 2016).

2.4.1.1.Polimer yapıli nanotaşıyıcılar

Polimer yapıli nanotaşıyıcılar kimyasal bileşenlerinin, boyutlarının, biyolojik olarak bozunurluklarının ve yüzey morfolojilerinin uyarlanmasında büyük bir kolaylık sunar. Biyo-algılama görüntüleme ve terapötiklerde, ilaç taşıyıcı sistemlerde ve bir dizi enzim immobilizasyon yöntemlerinde kullanımları mükemmel bir şekilde düzenlenebilir. Ayrıca PEG, kitosan ve dekstran gibi biyoyumlu polimerler diğér nanopartiküllerin üzerinde bir kaplama ajanı olarakta kullanılabilmektedir (Uhrich ve diğ,1999; Bae ve diğ, 2007; Wei ve diğ, 2009).

2.4.1.2.Lipid yapılı nanotaşıyıcılar

Lipid yapılı nanotaşıyıcılar 3 ana gruba ayrılır; (a) fosfolipid-polimer nanomiselleri (b) lipid-iki tabakalı veziküler nanotaşıyıcılar (lipozomlar) ve (c) katı-lipid nanopartiküllerdir. İlk iki sınıfta bileşen olarak digliseridler kullanılırken, üçüncü sınıf trigliseridlerden oluşmaktadır. Genel olarak fosfolipidleri kullanan lipozomal nanotaşıyıcılar bir polar sulu çekirdek, bir lipofilik çift katmanlı bölme ve hidrofilik dış yüzeyden oluşmaktadır. Sulu iç kısım suda çözünebilen etkin maddeleri içerebilirken, lipofilik yükler iki tabakalı bölgeye dahil edilebilir (Mulder ve diğ, 2009; Chen ve diğ, 2016).

2.4.1.3.Karbon yapılı nanotaşıyıcılar

Karbon nanotaşıyıcılar fulluerenler, karbon noktaları (CD), karbon nanotüpler (CDT) ve grafen noktaları kapsamaktadır. Karbon yapılı nanotaşıyıcılar benzersiz elektriksel ve gerilme özelliklerine sahiptirler. Özellikle CDT'ler algılama, görüntüleme ve ilaç salınımı gibi biyomedikal alanlar tarafından kullanılmaktadır (Wang ve diğ, 2009).

2.4.2. İnorganik nanotaşıyıcılar

İnorganik yapılı nanotaşıyıcılar, son derece sağlam, çok kararlı ve enzimatik bozulmalara karşı oldukça kararlıdır. Böbrek veya fetal yoldan atılabilen ultra büyük boyutlarda hazırlanabilirler. Ayrıca elektronik, optik, manyetik, kristal fazlarının, boyutlarının ve şekillerinin kontrol edilebilmesi ile özellikleri geliştirilebilir. Geliştirilebilir bu özelliklere sahip nanotaşıyıcı malzemeler görüntüleme ve terapi alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Chen ve diğ, 2016).

2.4.2.1.Yarı iletken nanotaşıyıcı sistemler

Nanotaşıyıcıların önemli bir sınıfı olan kuantum noktaları (QD) adı verilen inorganik yarı iletken nanopartiküllerdir. Kuantum noktaları genellikle bir eksitonun Bohr yarıçapının uzunluk ölçeğinden ya da 3-10 nm boyutları arasında sentezlenebilir (Harris ve diğ, 2011).

2.4.2.2.Silika yapılı nanotaşıyıcı sistemler

Silika yapılı nanotaşıyıcılar, yüksek biyoyumluluk ve ayarlanabilir bir çapın yanı sıra kontrol edilebilir gözenek boyutuna sahip olma gibi avantajlar sunar. Görüntüleme ve kemoterapi için ilaçlar ve organik boyalar gibi suda çözünmeyen bileşikler

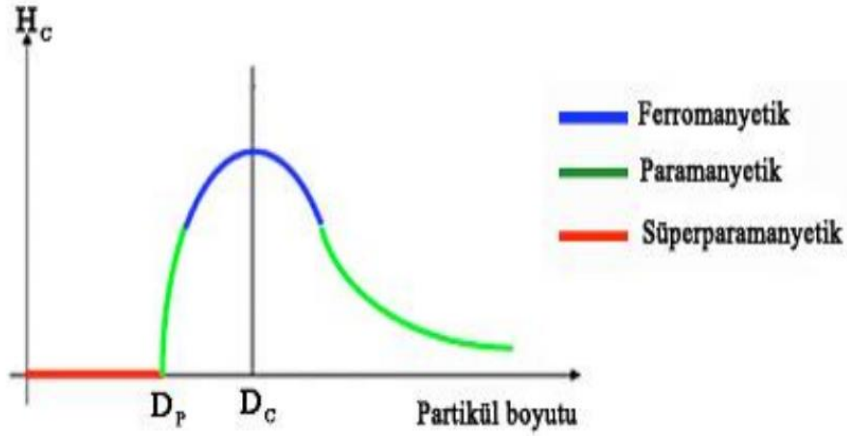
kapsülleyebilirler. Ayrıca silika yapılı nanotaşıyıcılar üzerine mezo gözenekli bir silika, kabuk olarak kaplanabilir ve kaplandığı malzemenin özelliklerinin geliştirilmesine yardımcı olurlar (Yang ve diğ, 2012; Ow ve diğ, 2005).

2.4.2.3.Upconversion nanotaşıyıcı sistemler

Upconversion nanotaşıyıcılar üç değerlikli lantanid iyonlarının (Er^{3+} , Ho^{3+} , Yb^{3+} , Tm^{3+}) en az bir boyutu 100 nm'den küçük olan uygun bir di-elektrik konak kafesinde konuk olarak dağıtıldığı seyreltik konuk-konak taşıyıcılardır. Upconversion yöntemi iki veya daha fazla düşük enerjili bir fotonun daha yüksek enerjili bir foton yaymak için uzun ömürlü elektronik durum vasıtasıyla ardışık olarak emildiği stokes karşıtı bir işlemdir. Upconversion nanotaşıyıcılar yüksek fotostabilite, düşük toksik etki, oto-floresansın olmaması ve derin dokuya nüfus eden yakın kızılötesi (NIR) ışığı sayesinde etken maddelerin aktive edilebilmesi gibi üstün avantajlara sahiptir (Chen ve diğ, 2013; Chen ve diğ, 2014; Chen ve diğ, 2015).

2.4.2.4.Manyetik nanotaşıyıcılar

Manyetik nanotaşıyıcılar geniş bir çalışma yelpazesine sahip olmasının yanı sıra bileşenlerinin yeni ve büyüleyici işlevlere sahip olması ve yapısal özelliklerinin geliştirilebilmesi gibi avantajlara sahiptirler. Manyetik nanotaşıyıcılar diğer nanotaşıyıcılar gibi birçok farklı formda bulunabilirler. En yaygın olarak kullanılan formu ise nanopartikülleridir. Nano boyuttan mikron boyuta kadar sentezlenebilen manyetik nanopartiküller 10-20 nm boyutları arasında biyomedikal uygulamalar için avantajlı hale getirirler (Jun ve diğ, 2008). Manyetik nanopartiküllerin partikül boyutları değiştikçe uygulanan manyetik alan gösterdikleri davranışlarda değişmektedir ve de Tc sıcaklığının üzerinde süper paramanyetik özellik gösterirler. Bu değişiklikleri 3 grupta toparlayabiliriz; Ferromanyetizma, paramanyetizma ve süperparamanyetizma. Şekil 2.3'te bu değişikliklerin grafikleri gösterilmektedir.



Şekil 2.3 : Manyetik değerlere ait grafikler

- ❖ Ferromanyetizma; maddelerin kolay bir şekilde mıknatıslanabilme özelliğidir. Ferromanyetik elementler Fe, Co, Ni' dir. Zayıf alanlarda bile manyetik doygunluğa ulaşılır. Ferromanyetik malzemelerde histerizis olayı meydana gelir. Bu malzemeye dışardan bir manyetik alan uygulandığında atomik dipollerde bazı değişimler meydana gelir. Bunun sonucunda manyetik alan ortadan kaldırılrsa bile malzeme manyetik özellik göstermeye devam eder. Belirli bir sıcaklık değerinin üzerinde ise ferromanyetizma paramanyetizmaya dönüşür.
- ❖ Paramanyetizma; bazı atomların dış elektron katmanlarının tam dolu olmaması sebebiyle ortaklanmamış elektrona sahiptirler ve bundan dolayı sıfırdan farklı bir momente sahiptirler. Bu malzemeler manyetik alan varlığına maruz bırakılırsa malzemenin manyetik momenti değişir. Bu tür malzemelere paramanyetik malzemeler denir.
- ❖ Süper paramanyetizma; malzeme eğer 1-20 nm çaplarından oluşuyorsa Süper paramanyetizma durumunda kalıcı manyetizasyon ve koersivite değerleri sıfırdır (Sakallıoğlu, 2013).

Manyetik nanopartiküller toksik olmamaları, küçük partikül boyutları nedeniyle *in vivo* uygulamalardaki kolaylığı, istenilen bölgelere hedeflendirilebilmesi ve kontrol edilebilen manyetik özellikleri gibi avantajlara sahip olmasına rağmen manyetik doğası gereği bir süre sonra kolloidal olarak toplanıp çökmesi klinik uygulamalar için bir dezavantaj oluşturmaktadır. Manyetik nanopartiküllerin bu toplanıp çökme eğilimi iki şekilde açıklanabilir. Birincisi streik etkileşimleri, ikincisi partiküller arası *Van der waals* etkileşimleridir (Tüylek, 2017). Bu dezavantajların önüne geçebilmek için manyetik

nanopartikülün dış katmanı genellikle uygun bir polimerle kaplanır. Aşağıda vermiş olduğumuz Çizelge 2.1’de çeşitli polimerler sınıfları gösterilmektedir.

Çizelge 2.1 : Polimerlerin sınıflandırılması (Fung ve Saltzman, 1997)

Polimerler	Polimer Grupları	Numuneler
Doğal Polimerler	Polisakkaritler Proteinler	Albumin, Kolojen, Jelatin, Nişasta, Selüloz, Poliamino asit
Sentetik ve Biyolojik Olarak Parçalanabilen Polimerler	Polyesterler Polianhidritler Poliortoesterler Polifosfoesterler	Polilaktik asit Poliglikolik asit Polikaprolakton
Sentetik ve Biyolojik Olarak Parçalanamayan Polimerler	Silikon elastomerler Poliakrilatlar	Polimetil metakrilat

Polimerlerin kullanımı manyetik nanopartiküllerin etkileşim kuvvetlerinin kontrolünün sağlanması, biyoyumluluk, nanopartiküllerin çökme eğiliminin engellenmesi ve çok işlevsellik sağlamaktadır. Özellikle manyetik nanopartiküllerin sağlık alanında kullanılması sırasında biyoyumlu bir polimerin seçimi *in vivo* çalışmalar için, toksik etki göstermeyecek manyetik nanopartiküllerin damar içerisinde toplanıp çökmesini engelleyebilecek ve de kolaylıkla çözünebilmesini sağlayacaktır (Tüylek, 2017)

2.5. Manyetik Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

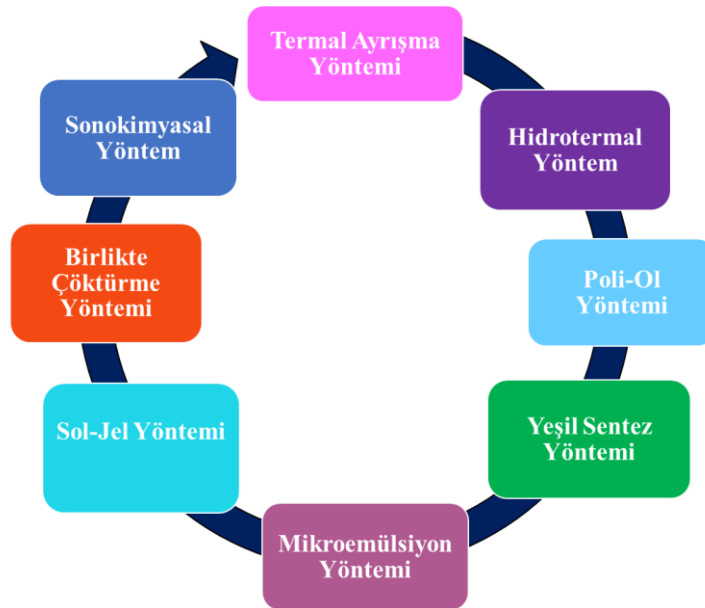
Manyetik nanopartiküllerin kullanımına 1900’lü yıllarda başlanmış ve günümüzde de birçok farklı alan tarafından kullanılmaya devam edilmektedir. Manyetik nanopartiküllerin kullanım alanları; veri depolama ortamı, spin bağımlı elektron taşıma cihazları, *in vitro* tanı için biyosensör uygulamaları, manyetik rezonans görüntüleme, ilaç salınımı, hasarlı doku veya organ yenilenmesi gibi çok geniş bir yelpazeye sahiptir. Özellikle tıbbi tanı ve tedavide manyetik alan tedavisi diğer bir deyişle magnetoterapi oldukça önemli bir yöntemdir. İnsan vücudundaki her hücrenin kendine ait bir elektrik devresinin olduğunu ek olarak sinir sistemini de düşünürsek bedenimiz mükemmel bir elektromanyetik cihazdır. İnsan vücudundaki manyetik alan biyoelektrik yüklerin hareketinden meydana gelir. Tüm bu

bilgiler göz önüne alındığında, manyetik nanopartiküllerin medikal ve biyolojik uygulamalarda son derece avantajlı olduğunu söyleyebiliriz (Özkan, 2015). Son yıllarda özellikle kanser tanı ve tedavilerinde manyetik nanopartiküller biyomoleküllerle konjuge edilerek kan veya lenfotik damar yoluyla istenilen bölgeye manyetik alanın etkisiyle doğrudan yönlendirilebilir (Tüylek, 2017).

Tüm bu yararlı etkilerinin yanı sıra araştırmacılar tarafından manyetik alanın zararlı etkileri tartışma konusudur. Çevremizdeki telefondan bilgisayara kadar çok fazla elektromanyetik dalga yayan cihazın olduğu düşünülürse yeni bir kirlilik türü oluştuğu kabul edilebilir. Bu kirliliğe verilen isim elektrosmog'dur. Araştırmacılar manyetik alanın organizma ile rezonansa girdiğini, rezonansın bozulduğu hallerde ise dengelerin değiştirerek elektrosmog etkisinden bahsetmişlerdir (Nazlıkul, 2013) Ayrıca çeşitli biyokimyasal çalışmalarda birçok enzimin yapılarının ve fonksiyonlarının, bazı hücre organellerinin fonksiyonlarının fazla manyetik alandan olumsuz etkilendiği bildirilmiştir.

2.6. Manyetik Nanopartikül Sentez Yöntemleri

Manyetik nanopartiküllerin kullanım alanları, manyetik özellikleri morfolojilerine ve yapılarına bağlıdır. Bu sebeple hazırlanmaları için kullanılan prosedürlerin bilinmesi manyetik nanopartiküllerin etkinliğinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesi için birçok farklı prosedür vardır. Bunlardan bazıları Şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4 : Manyetik nanopartikül sentez yöntemleri

2.6.1. Yeşil sentez yöntemi

Çevreye zararı en aza indirmek için toksik maddeleri azaltan veya toksik maddelerin kullanımını tamamen ortadan kaldıran bir manyetik nanopartikül sentez yöntemidir. Bu yöntemde sentez için çevre dostu, toksik olmayan ve güvenli bileşenler kullanılır (Majidi ve diğ, 2016). Bu tip bileşenlerin kullanılması özellikle biyomedikal uygulamalar için son derece önemlidir. Manyetik nanopartikül hazırlamak için bu yöntemde mikroorganizmalar (Klaus ve diğ, 1999; Nair ve Pradeep, 2002; Abbasi ve diğ, 2014), enzimler (Willner ve diğ, 2006), mantarlar (Vigneshwaran ve diğ, 2007), bitkiler veya bitki özütleri (Chandran ve diğ, 2006; Song ve diğ, 2009) gibi biyolojik moleküller bilinen kimyasal veya fiziksel prosedürlerin yerine alternatif olarak düşünülebilirler. Hatta biyosentez için bitki örneklerinin seçimi diğerlerine göre farklı avantajlar sağlamaktadır. Bunun sebebi bitkilerin yapısında sitrik asit, askorbik asit, flavanoidler, redüktazlar, dehidrogenazlar ve hücre dışı elektron servisleri gibi indirgeyici ajanların bulunmasıdır (Pandey ve diğ, 2012).

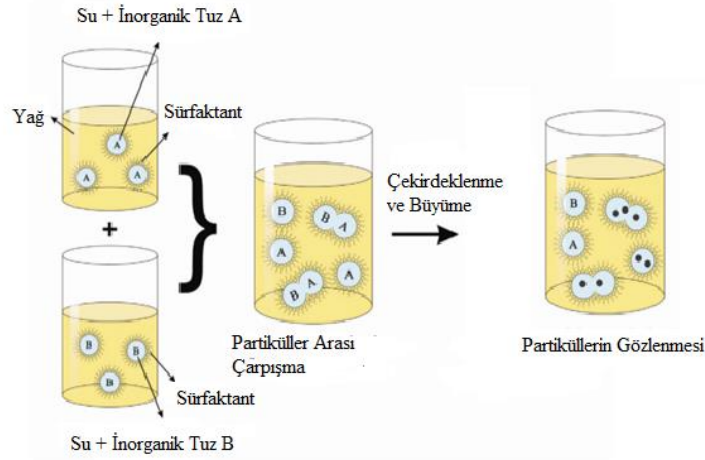
Özet olarak yeşil sentez yöntemi, ekonomik olması, çevre dostu olması ve toksik olmaması gibi avantajları vardır. Bunlara ek olarak biyolojik moleküllerin sentez aşamasında kullanımı bu yöntemi özellikle biyomedikal uygulamalar için cazip hale getirmektedir..

2.6.2. Mikroemülsiyon yöntemi

Mikroemülsiyon bir yüzey aktif madde varlığında birbirine karışmayan su ve yağ fazının termodinamik olarak kararlı izotropik dağılımıdır (Majidi ve diğ, 2016). Bu yöntemin diğer yöntemlerle kıyaslandığında basit ekipman kullanımı, parçacık boyutu ve nanopartikül bileşimi üzerinde büyük oranda kontrol, çok fazla türde malzemenin sentezlenmesi, kristal yapıya sahip manyetik nanopartiküllerin hazırlanması, oda koşullarında hazırlanabilirliği, yüksek spesifik yüzey alanına sahip olması gibi birçok farklı avantajları vardır (Woo ve diğ, 2004). Mikroemülsiyon yöntemi ile üretilen manyetik nanopartiküllerin boyutunun düşük, mıknatıslanma değerinin yüksek oluşu ise dikkat çekicidir (Wu ve diğ, 2008; Chin ve Yaacob, 2007).

Mikroemülsiyon yöntemi ile hazırlanan manyetik nanopartiküllerin özellikleri genellikle yüzey aktif maddenin yapısına bağlıdır (Sánchez ve diğ, 2014). Yüzey aktif madde ara yüzey gerilimini azaltan ve şeffaf bir çözelti oluşumu ile sonuçlanan amfifilik bir moleküldür (Faraji ve diğ, 2010). Yüzey aktif moleküllerin seçimi ise sistemin

fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Aşağıda verilmiş olan Şekil 2.5'te mikroemülsiyon yöntemi ile manyetik nanopartikül sentezi gösterilmektedir.



Şekil 2.5 : Mikroemülsiyon yöntemi ile manyetik nanopartikül sentezi (Chaudhary ve Chaudhary, 2018)

Bu yöntemin ana yararı uygun, çok amaçlı kullanılabilmesi ve partikül boyutunun sulu damlacık parametrelerinin değiştirilerek kolayca kontrol edilebilmesidir. Bununla birlikte ölçek büyütme prosedüründeki zorluklar, kalan yüzey aktif maddelerin nanopartikül özellikleri üzerindeki olumsuz etkileri, yüzey aktif maddelerin varlığına rağmen manyetik nanopartiküllerin aglomerasyonu bu yöntemin dezavantajlarıdır.

2.6.3. Sol-Jel yöntemi

Sol-jel yöntemi nano yapıli manyetik nanopartiküllerin hazırlanması için oldukça uygun bir yöntemdir. Bu yöntem nano boyuttaki parçacıkları bir solunu başlatarak çözeltideki moleküler öncüllerin hidroksilasyon ve yoğunlaşması temeline dayanır. Bu yöntem genellikle ayrı nanopartiküller veya polimerler için bir öncü görevi gören kolloidal çözelti ile başlar tipik olarak bir solün, bir çözücü içinde kolloidal nanopartiküllerin kararlı bir dispersiyonudur. Benzer şekilde kolloidal jel kolloidal nanopartiküllerin aglomerasyonundan oluşturulan bir ağ veya nanopartiküllerin alt kolloidal nanopartiküllerin bir araya toplanmasıyla yapılan polimerik bir jel olabilir. Sol aşaması bu yaklaşımla yapılan nanopartiküllerin kalitesinde kritik bir rol oynar çünkü partiküllerin boyutu ve manyetizasyonu bu aşamaya bağlıdır (Dippong ve diğ, 2017). Sol-jel yöntemi, katkısız, stokiometrik olarak düzgün ve çeşitli boyutlarda manyetik nanopartiküller üretilmesinde kullanılabilir. Bu yöntemin manyetik nanopartikül sentezinde kullanılması yapısının

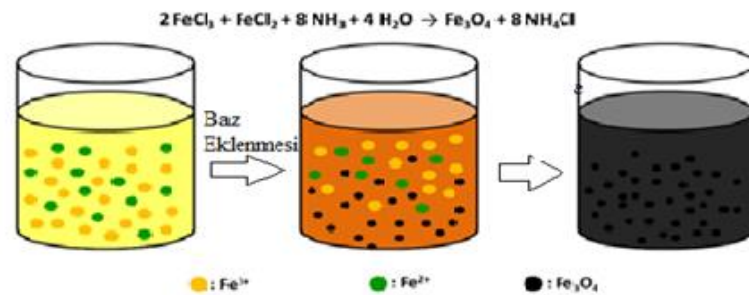
önceden belirlenebilmesi, mükemmel boyut kontrolü ve saf amorf fazlara sahip nanopartiküllere ulaşılması avantajları nedeniyle önemlidir (Salunkhe ve diğ, 2014).

2.6.4. Poli-ol yöntemi

Sol-jel yöntemi bir okdidasyon reaksiyonuyken poli-ol yöntemi bir indirgenme reaksiyonudur. Poli-ol yönteminde poli-oller hem çözücü hem de indirgenme ajanı olarak görev yapar ve nanopartiküllerin büyümesini kontrol ederken nanopartikül aglomerasyonunu önlemek için stabile ederler. Poli-ol yöntemi, çözeltinin kaynama sıcaklığından yüksek sıcaklıklarda yapılır ancak yüksek basınçta yapılmasına gerek yoktur (Wu ve diğ, 2015).

2.6.5. Birlikte çöktürme yöntemi

Birlikte çöktürme yöntemi kontrollü boyutlarda manyetik nanopartiküllerin sentezi için en yaygın kullanılan yöntem olarak bilinir. Uygulama kolaylığı ve toksik maddelere daha az ihtiyaç duyulması nedeniyle biyomedikal uygulamalar için elverişli bir yöntemdir. En geleneksel yöntem olarak bilinen birlikte çöktürme yöntemi genellikle demir ve demir iyonlarının oda sıcaklığında veya yüksek sıcaklıklarda bir baz ilave edilerek 1:2 molar (M) oranında karıştırılmasını içerir (Sandeep Kumar, 2013; Wu ve diğ, 2015). Bu yöntemle ait reaksiyon Şekil 2.6’da gösterilmektedir. Demir oksit nanopartiküllerinin boyutu ve de şekli; klorürler, sülfatlar, nitratlar, perkloratlar, gibi iyonların oranına, pH değerine, reaksiyon sıcaklığına ve iyonik mukavemet gibi özelliklerine bağlıdır (Wu ve Jiang , 2008).



Şekil 2.6 : Birlikte çöktürme yöntemi ile Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezi (Wulandari ve diğ, 2017)

2.6.6. Termal ayrışma yöntemi

Demir öncüllerinin sıcak organik yüzey aktif cisimlerinin varlığında ayrışması, iyi boyut kontrolü, dar boyut dağılımı, bireysel ve iyi dağılabilir manyetik nanopartiküllerin iyi kristallliği ile gelişmiş örnekler vermiştir. Reaksiyonlarının çoğunun birlikte çöktürmede oda sıcaklığında gerçekleştirilmesi nedeniyle, elde edilen manyetik nanopartiküller genellikle düşük kristal özellik gösterir. Termal ayrıştırma yönteminde ise bunların aksine daha iyi boyut dağılımına sahip ve kristal özellik gösteren manyetik nanopartiküller elde edilir (Sun ve Zeng, 2002; Li ve diğ, 2008). Bu yöntemle ait görsel Şekil 2.7’de sunulmuştur.



Şekil 2.7 : Manyetik nanopartiküllerin termal ayrışma yöntemi ile sentezlenmesi (Chaudhary ve Chaudhary, 2018)

Kontrollü boyutta manyetik nanopartiküllerin termal ayrışma yöntemi ile hazırlanmasının yanı sıra bu sistem yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyar (Shokrollahi, 2013). Termal ayrıştırma yöntemi ile elde edilen manyetik nanopartiküller genellikle manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için kontrast maddesi olarak kullanılırlar. Bu yöntemin en önemli dezavantajı ise, hazırlanan manyetik nanopartiküllerin sadece polar olmayan çözücüler içinde çözülmüş olmasıdır.

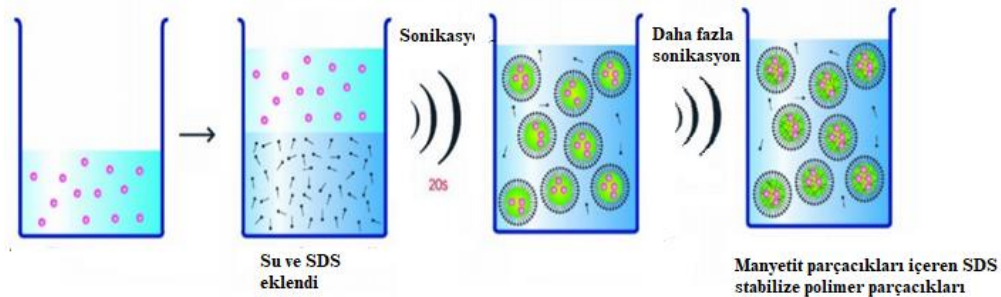
2.6.7. Hidrotermal sentez yöntemi

Solvotermal yöntem olarak da adlandırılan hidrotermal yöntem manyetik nanopartiküllerin sentezi için elverişli bir yöntemdir (Butter ve diğ, 2005). Hidrotermal yöntemin temeli manyetik nanopartiküllerin oluşumunu gerçekleştirmek için yüksek sıcaklık ve yüksek basınç altında devam eden reaksiyonlar üzerine kurulmuştur. Bu yöntemde düzgün kristal yapısı elde edilmesinin yanı sıra nanopartikül morfolojisinin

kontrolü yönetimin tercih edilmesinin sebeplerinden biridir (Li ve diğ, 2013; Li ve diğ, 2014). Manyetik nanopartiküllerin hidrotermal yöntemle sentezlenmesi ve yüzey fonksiyonelleştirilmesi üzerine yapılmış çalışmalar, üretilen manyetik nanopartiküllerin özellikle MRI uygulamalarında büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Lai S. Ve ark., 2012).

2.6.8. Sonokimyasal yöntem

Sonoliz ve sonokimyasal yöntemler yeni manyetik nanopartikülleri oluşturmak için akustik kaviteasyonun neden olduğu kimyasal etkilerden yararlanıp yüksek yoğunluklu ultrasonik ışınlama kullanır (Jain ve diğ, 2005). Ultrasonik ışınlama kabarcıkların salınımına yol açan sürekli sıkıştırma ve genişlemeye maruz kalan kabarcıklar oluşturur. Salınan kabarcıklar çökmeye neden olana ve kabarcıklarda depolanan enerjiyi serbest bırakana kadar ultrasonik enerjiyi biriktirir. Kabarcıklar çöktüğünde son derece kısa sürede sıcaklığı ve basıncı önemli ölçüde arttıran oldukça lokalize bir enerji patlaması salınır. Genel olarak ultrasonik ışınlama, indirgenmiş grafen oksitlerde dağılmış manyetik nanopartiküller veya manyetik nanopartikül yüklü lateks boncuklar gibi nanokompozitler üretmek için mükemmel bir tekniktir (Veisheh ve diğ, 2010). Sonokimyasal yöntem istenen boyutlarda ve mükemmel manyetik doygunluk özelliklerine sahip manyetik nanopartiküllerin sentezi için ümit verici olsa da manyetik nanopartiküllerin dağılımı ve kontrol edilebilirliği bu yöntem için bir sorundur. Bu yöntemle sentezlenen manyetik nanopartiküller amorf, gözenekli ve kümeleşmiştir (Corot ve diğ, 2006). Şekil 2.8’de sonokimyasal sentez yöntemine bir örnek gösterilmektedir.



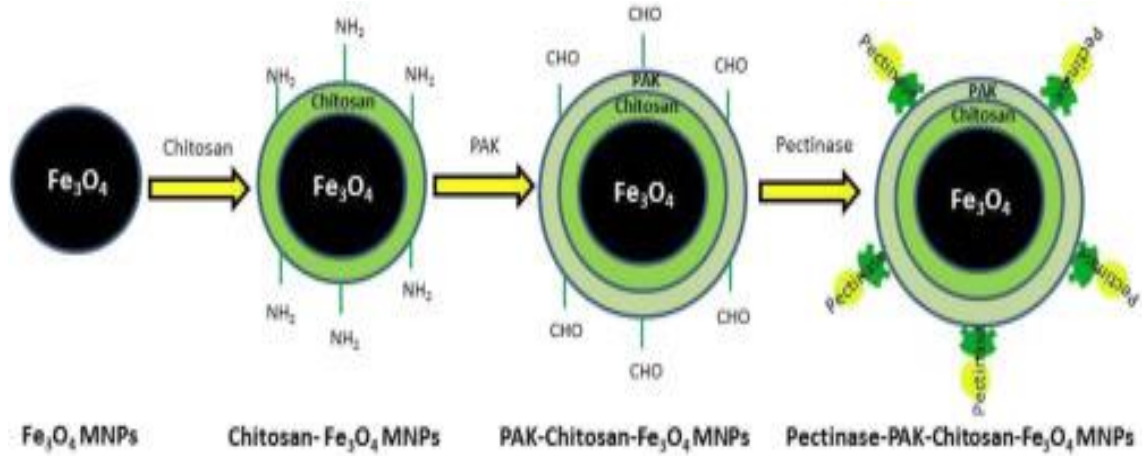
Şekil 2.8 : Manyetik nanopartiküllerin sonokimyasal yöntemle sentezlenmesi (Teo ve diğ, 2009)

3. LİTERATÜR ÖZETİ

Enzimler endüstri, gıda, tarım, tekstil ve biyomedikal alanlar başta olmak üzere farklı alanlar tarafından kullanılmaktadırlar. Yaygın kullanımlarına rağmen çevre koşullarından çabuk etkilenebilmeleri, maliyetlerinin yüksek oluşu gibi kullanımlarını kısıtlayan bazı dezavantajları da vardır. Son yıllarda bu dezavantajların önüne geçebilmek için enzimler çeşitli taşıyıcı matriksler üzerine immobilize edilmişlerdir. Çalışmamızın temelini oluşturan manyetik nanopartiküller bu taşıyıcı matrikslerin başında gelmektedir. Bu bölümde manyetik nanopartiküller üzerine çeşitli enzimlerin immobilizasyonu ve manyetik alanın enzim aktivitesi üzerindeki etkisinin araştırılmasına dair yapılmış olan çalışmalar sunulacaktır.

Jedrzejczak-Silicka ve diğ. (2019), yapmış oldukları çalışmada mantardan ekstrakte edilen lakkaz enzimi aktivitesinin dönen manyetik alan tedavisi altında incelemiştir. Bu çalışmada 10 Hz, 40 Hz ve 50 Hz'de sırasıyla %11 ve %9'luk faaliyetlerde önemli bir artış gözlenmiştir. Lakkazın dönen manyetik alana maruz kalması, daha geniş pH aralığında artmış aktivitesine ve dönen manyetik alan altında 20 Hz frekans uygulanmasından sonra optimum pH'da 4.0'den 4.5'e hafif bir kaymaya neden olmuştur. Sonuçlar, enzim aktivitesinin, stabilitesinin ve optimum pH'ın, uygulanan dönen manyetik alanın özelliğine bağlı olarak önemli ölçüde değiştirilebileceğini göstermektedir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, dönen manyetik alanın lakkaz aktivitesini olumlu yönde değiştirebileceğinin göstergesidir. Dönen manyetik alanın uygulanması, enzim bazlı biyo işlemenin kontrolü için yeni bir tedavi yöntemi olarak kabul edilebilir.

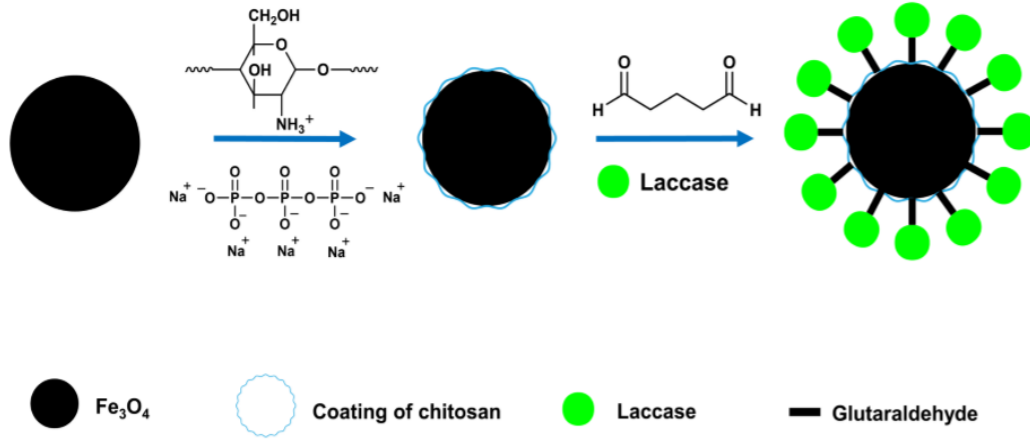
Nouri ve diğ. (2020), yaptıkları çalışmada pektinaz enzimini kefiran polisakkaridini çapraz bağlayıcı olarak kullanarak kitosan kaplı Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerine immobilize etmişlerdir. Şekil 3.1' de gösterildiği gibi işlem 4 aşamada gerçekleşmiştir; (1) Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerin üretimi (2) Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerin kitosan ile kaplanması, (3) kefiran polisakkaridinin nispi oksidasyonu ve çapraz bağlayıcı olarak uygulanması ve (4) oksitlenmiş kefiran çapraz bağlayıcı ile hazırlanan substrat üzerinde enzim immobilizasyonu. Sentezlenen nanomalzemenin FTIR, DLS, XRD, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve VSM analizleri yapılmıştır. Ayrıca aktivitesi, biyokimyasal özellikleri, enzimin tekrar kullanılabilirliği ve serbest/immobilize pektinaz aktivitesinin kinetiği de değerlendirilmiştir.



Şekil 3.1 : Pektinaz enziminin kitosan kaplı manyetik nanopartiküllere immobilizasyonu (Nouri ve diğ, 2020)

Çalışmadan elde sonuçlar manyetik kitosan nanopartiküllerinin poli-aldehit kefiran çapraz bağlayıcı ile uygulanmasının pektinaz enziminin özelliklerini iyileştirmek için etkili, pratik ve çevreci bir yöntem olduğunu göstermiştir. Pektinaz enzimi immobilizasyonunun sonuçları, gıda endüstrisindeki endüstriyel uygulamalar için manyetik pektinaz nano biyokatalizörünün manyetik bir potansiyeline işaret ederek, enzimin biyokimyasal özelliklerini (termal stabilite, zaman ve pH) ve kinetik parametrelerini iyileştirdiği gözlenmiştir.

Zhang ve diğ. (2020), yapmış oldukları çalışmada, lakkazı manyetik nanopartiküller üzerinde immobilize ederek klorofenolün ayrıştırılmasında kullanmışlardır. Enzim immobilize etmek için $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ kitosan ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ CS) kompozit nanopartiküller kendi kendine montaj yöntemi ile hazırlanmıştır. Lakkaz, kovalent bağlama yoluyla $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ CS kompozit nanopartiküller üzerinde başarıyla immobilize edilmiştir ve klorofenolü sudan etkili bir şekilde uzaklaştırdığı gözlenmiştir. İmmobilize lakkazın spesifik aktivitesi 112.4 IREBU'ya ulaşmıştır, aktivite geri kazanımı ise %51,8 olarak bulunuştur. Depolama stabilitesi, operasyonel stabilite, pH stabilitesi ve termostabilite gibi parametreler, serbest lakkaz'a kıyasla iyileştirilmiştir. Yapmış olunan çalışmaya ait görsel Şekil 3.2'de sunulmuştur.

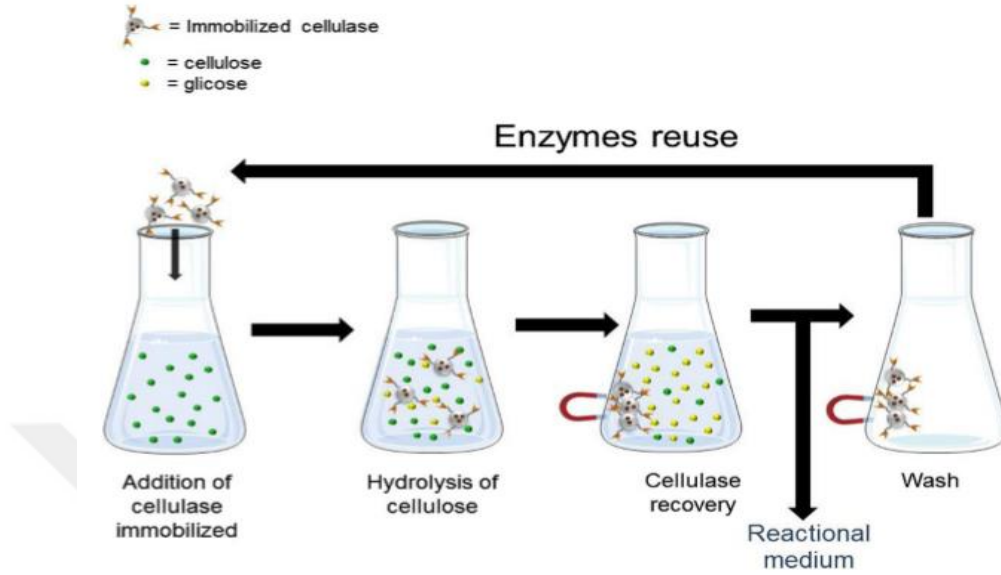


Şekil 3.2 : Kitosan kaplı manyetik nanopartiküllere lakkaz immobilizasyonu ve klorofenolün uzaklaştırılmasında kullanımı (Zhang ve diğ, 2020)

Kalkan ve diğ. (2012), yaptıkları çalışmada, lakkaz enziminin manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküller üzerinde immobilize ederek enzimin tekrar tekrar kullanılabilmesi sağlamışlardır. Bu amaçla, Fe_3O_4 nanopartikülleri, CS ile kaplanmış ve işlevselleştirilmiştir ve *Trametes versicolor*'dan saflaştırılan lakkaz, CS'nin hidroksil grupları karbodiimid (EDC) veya siyanürik ile aktive edildikten sonra adsorpsiyon/kovalent bağlanma yoluyla CS kaplamalı manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4 -CS) üzerine immobilize edilmiştir. Serbest lakkaz ve immobilize lakkaz sistemleri için optimum pH, sıcaklık ve kinetik parametreleri araştırılmıştır ve immobilize sistemlerin tekrarlanan kullanımına karşı başlangıç aktivitesindeki değişim incelenmiştir. Sonuçlar, tüm immobilize sistemlerin 30 toplu kullanımın sonunda başlangıç etkinliklerinin %71'inden fazlasını koruduğunu göstermiştir.

Lima ve diğ. (2017), yapmış oldukları çalışmada selülazın manyetik nanopartiküller üzerinde immobilizasyonunu incelemişlerdir. Selülazların manyetik nanopartiküller, özellikle manyetit nanopartiküller üzerinde immobilize edilmesi, bu enzimi ekonomik ve endüstriyel olarak daha çekici hale getirmek için incelenen ana yaklaşım olmuştur. Bununla birlikte, manyetik nanopartiküller topaklanma eğilimindedir, çok reaktiftir ve havada kolayca oksitlenir, bu da kullanım ömürleri üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Belirtilen sorunların önüne geçmek için uygun yüzey kaplaması sağlamak çok önemlidir. Bu sebeple manyetik nanopartiküller sentezlenip poli (metil metakrilat) nanopartiküller içinde kapsüllenmiştir. Elde edilen bu malzeme, morfoloji, ortalama çap, manyetik davranış ve termal ayrışma analizleri açısından karakterize edilmiştir. Kapsüllenmiş manyetik nanopartiküller içeren, süperparamanyetik davranış sergilemiş ve yaklaşık 150 nm yoğunluk ortalama çap göstermişlerdir. Immobilize selülaz, serbest formdakinden daha geniş sıcaklık

stabilitesi ve büyük yeniden kullanılabilirlik kapasitesi sergileyip, ilk enzim aktivitesinin %69'unu sekiz kullanım döngüsünden sonra bile korumuştur. Verilmiş çalışmaya ait görsel Şekil 3.3'te sunulmuştur.

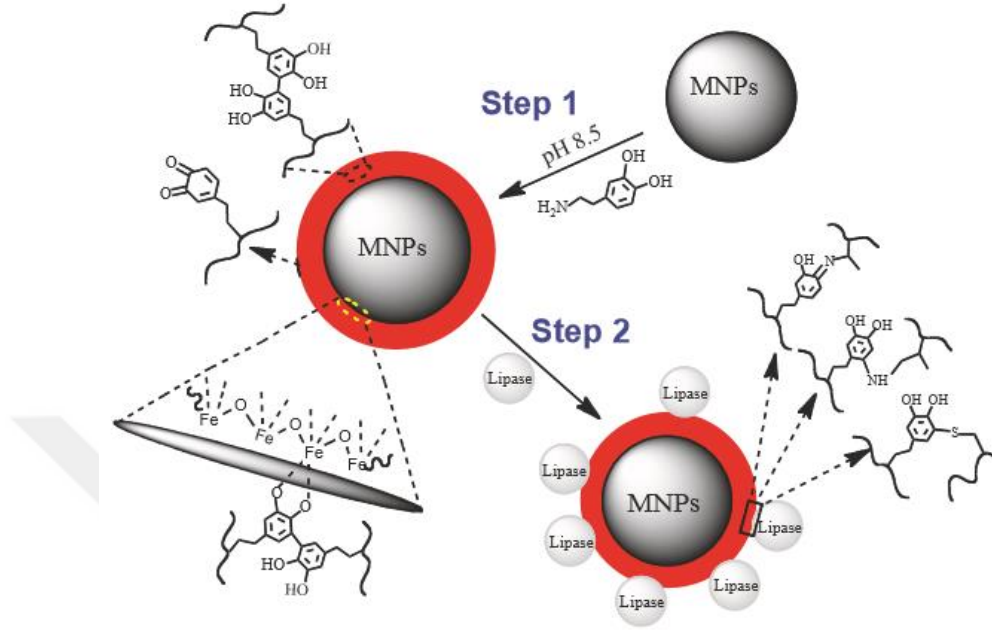


Şekil 3.3 : Manyetik nanopartiküller üzerine selüloz immobilizasyonu (Lima ve diğ. 2017)

Mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar, selüloz, glutaraldehit aktivasyonu yoluyla polimerik nanosferlerde kapsüllenmiş manyetik nanopartiküller üzerinde başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermektedir. Immobilize selüloz, serbest formuna göre sıcaklık değişimlerine göre daha yüksek stabilite sergilemiştir, bu da endüstriyel hidroliz için önemli bir avantaj olan operasyonel esnekliği yansıtır. Bu çalışma protokolünün, enzimlerin immobilizasyonu ve enzimatik hidroliz ile ilgili çalışmalara katkıda bulunan diğer enzimlerin immobilizasyonu için kolayca uyarlanabileceğini düşünmekteyiz.

Ren ve diğ. (2011), yapmış oldukları çalışmada lipaz enzimini polidopamin (PD) ile modifiye edilmiş olan manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri üzerine immobilize etmişlerdir. Dopamine bulunan orto-dihidroksifenil (katekol) fonksiyonel grubu, midye yapışkan proteinlerinde de DOPA amino asit formunda bulunur, burada oksit yüzeylere oldukça yapışkındır ve alkali koşullar altında kinon oluşturmak için okside olurlar. Hem katekol hem de birincil amin içeren dopaminin, daha önce biyomolekülleri immobilize edebilen kendi kendine polimerizasyon yoluyla yüzeylerde uyumlu kaplamalar ürettiği bulunmuştur. Burada açıklanan yöntemde, PD, manyetik nanopartiküller üzerinde lipaz immobilizasyonu için uyumlu bir kaplama görevi görmüştür. Şekil 3.4'te sentez aşamaları gösterilmektedir. Enzim deneyleri sonucunda PD- Fe_3O_4 üzerinde immobilize lipazın, serbest lipaza kıyasla artmış pH ve termal stabilite sergilediğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, PD- Fe_3O_4 üzerinde

immobilize lipaz, manyetik ayırma ile reaksiyon ortamından kolayca izole edilmiş ve 21. kez tekrarlanan kullanım döngüsünden sonra manyetik ayırmanın ardından başlangıç aktivitesinin %70'inden fazlasını koruduğu gözlenmiştir.



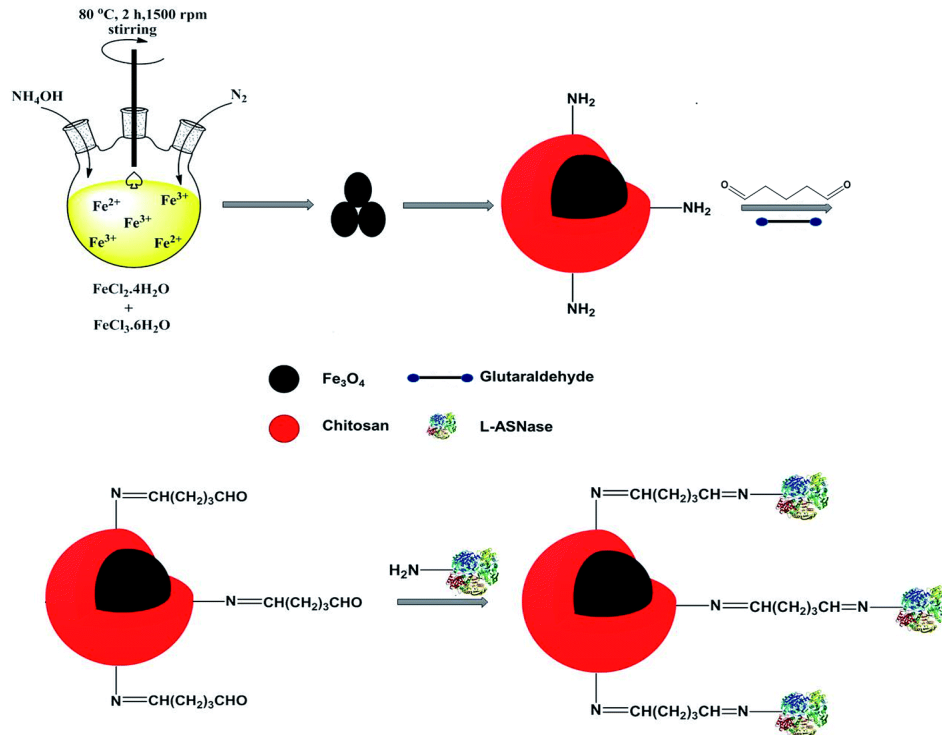
Şekil 3.4 : PD modifiyeli Fe_3O_4 nanopartikülleri üzerine lipaz immobilizasyonu (Ren ve diğ., 2011)

Sonuçlardan yola çıkılarak, PD- Fe_3O_4 'lerin sulu koşullar altında lipaz immobilizasyonu için yüksek verimlilik sergilediğini göstermektedir. Bu çalışmada, PD kaplı manyetik nanopartiküller kullanılarak kolay bir lipaz immobilizasyon yöntemi geliştirilmiştir ve diğer enzimlerin immobilizasyonunda PD- Fe_3O_4 'lerin kullanılması için yeni bir yol açmıştır.

Ulu ve diğ. (2019), yapmış oldukları çalışmada *T. troglia*'den saflaştırılan lakkazı birlikte çöktürme yöntemi ile sentezledikleri manyetik Fe_3O_4 -TCS hibrit kompozit nanopartikül üzerine immobilize etmişlerdir. Sentezlenen malzemenin FTIR, TGA, XRD, VSM, SEM ve EDX karakterizasyonlarından elde edilen sonuçlar, Fe_3O_4 partiküllerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini ve TCS ile modifiye edildiğini ortaya koymaktadır. Fe_3O_4 -TCS hibrit kompozit nanopartiküller üzerinde immobilize edilen lakkaz, yalnızca daha geniş bir pH ve sıcaklık değerine karşı daha iyi direnç sergilemekle kalmayıp, aynı zamanda dikkate değer ölçüde daha yüksek termal stabilite, depolama stabilitesi ve yeniden kullanılabilirlik sergilemiştir. Ayrıca, yapmış oldukları çalışmalar sırasında Fe_3O_4 -TCS-lakkazın, tekstil boyası olan Reactive Blue 171 ve Acid Blue 74 rengini giderebildiği ve tekrarlanan kullanım sırasında yüksek renk giderme aktivitesini koruyabildiği tespit

edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak Fe_3O_4 -TCS-lakkazın katalitik aktivite ve kararlılık açısından biyoteknolojik ve endüstriyel uygulamalarda umut verici bir aday olabileceği düşünülebilir.

Ateş ve diğ. (2018), yapmış oldukları çalışmada L-ASNaz aktivitesi üzerinde manyetik alan etkisini tayin etmek için manyetik Fe_3O_4 -kitosan nanopartikülleri içeren manyetik güdümlü taşıyıcılara L-ASNaz immobilize etmişlerdir. Enzim, zayıf bir manyetik alanda arttırılmış katalitik aktivite, termal ve pH kararlılıkları göstermiştir. Konjüge edilmiş L-ASNaz'ın, serbest L-ASNaz'lara kıyasla daha yüksek termostabilite ve daha geniş pH stabilitesi aralığı sunduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, konjüge L-ASNaz'ın tekrar kullanılabilirliği, immobilizasyondan sonra önemli ölçüde iyileşmiş ve 16 döngüden sonra bile başlangıç aktivitesinin %60,5'ini korumuştur. Konjüge L-ASNaz, 4 hafta süreyle $+4^\circ\text{C}$ ve $+25^\circ\text{C}$ 'de sırasıyla %50 ve %48'den fazla başlangıç aktivitesini korumuştur. Bunlara ek olarak, konjüge L-ASNaz'ın manyetik Fe_3O_4 -kitosan parçacıkları üzerindeki aktivitesinin, serbest L-ASNaz'ınkine kıyasla belirli frekanslarda ve zayıf manyetik alanda yaklaşık 3 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu özellikler göz önüne alındığında, L-ASNaz'ın taşınması ve aktivasyonundaki manyetik indüksiyonlu mekanizma, tıbbi biyoteknoloji için hayati çıkarımlarda katalitik aktivitenin, stabilitenin ve verimliliğin arttırılmasıyla kullanılabilir. Bu çalışmaya ait görsel Şekil 3.5'te sunulmuştur.



Şekil 3.5 : Fe_3O_4 -kitosan nanopartiküllerine L-ASNaz immobilizasyonu (Ateş ve diğ, 2018)

Ulu ve diğ. (2018), yapmış oldukları çalışmada L-ASNaz immobilizasyonu için taşıyıcı matris olarak Fe_3O_4 -Mobil Composition of Matter No. 41 (MCM-41) kullanmışlardır. Fe_3O_4 -MCM-41 nanopartiküllerini daha sonra 3-merkaptopropil trimetoksisilan (MPTMS) ile işlevselleştirmişlerdir. Tiyol işlevli Fe_3O_4 -MCM-41 manyetik nanoparçacıklarının kimyasal, termal özellikleri, manyetik ve morfolojisi FTIR termogravimetrik (TGA), diferansiyel termal analiz (DTA), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC), VSM, SEM, EDX, ve DLS ile karakterize edilmiştir. L-ASNaz immobilizasyonu kovalent immobilizasyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İmmobilize enzimin optimum pH, sıcaklık, kinetik parametreler, termal stabilite, yeniden kullanılabilirlik ve depolama stabilitesi gibi özellikleri araştırılmış ve serbest enzim ile karşılaştırılmıştır. İmmobilize enzimin, serbest enzime göre geniş bir pH ve sıcaklık aralığında stabil olduğu bulunmuştur. İmmobilize enzimin ayrıca, 50°C'de 180 dakikalık inkübasyondan sonra bile serbest enzime kıyasla daha yüksek termal stabilite gösterdiği tespit edilmiştir. İmmobilize enzimin, 16 kez yeniden kullanımdan sonra hala başlangıç aktivitesinin %63'ünü koruduğu gözlenmiştir. İmmobilize enzim için K_m değeri, substrat için artan afiniteyi gösteren serbest enzimden 1.15 kat daha düşük olarak tespit edilmiştir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak işlevselleştirilmiş manyetik matrisin, biyomedikal ve endüstriyel uygulamalarda L-ASNaz'ın'nin immobilizasyonu için umut verici bir malzeme olabileceği düşünülebilir.

Tarhan ve diğ. (2020), yapmış oldukları çalışmada maltoz işlevli manyetik çekirdek/kabuk Fe_3O_4 @Au-MS nanopartikülleri hazırlayarak L-ASNaz immobilizasyonu için taşıyıcı matris olarak kullanmışlardır. Yapısal ve morfolojik özellikleri AFM, SEM, VSM, ve TEM ile karakterize edilmiştir. Yapılan testler sonucunda immobilize enzimin serbest enzime kıyasla daha iyi asit-baz stabilitesi gösterdiği, ayrıca yeniden kullanılabilirlik testleri sonucunda 13 kez kullanımdan sonra bile başlangıç aktivitesinin %50'sini koruduğu tespit edilmiştir. Yaklaşımın başarısına ve elde edilen umut verici sonuçlara dayanarak, sentezlenen Fe_3O_4 @Au-MS nanopartiküllerin biyokimya, biyoteknoloji ve biyomedikal alanlardaki uygulamalar için yeni fırsatlara rehberlik edeceği düşünülebilir.

Noma ve diğ. (2020), yaptıkları çalışmada L-ASNaz'ı tannik asitle modifiye edilen mezogözenekli manyetik nanopartiküller üzerine immobilize etmişlerdir. İlk olarak Fe_3O_4 /SBA-15/tannik asit manyetik partikülleri sentezlenmiş ve yapısal ve morfolojik olarak çeşitli yöntemler kullanılarak tam olarak karakterize edilmiştir. Serbest ve immobilize enzimin özellikleri pH, sıcaklık, termal stabilite, depolama stabilitesi ve tekrar

kullanılabilirlik açısından incelenmiştir. Ayrıca immobilize enzim aktivitesi üzerine metal iyonları, inhibitörler ve organik çözücülerin etkisi araştırılmıştır. Serbest enzime kıyasla immobilize enzimin sıcaklık ve pH daha iyi tolerasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Yeniden kullanılabilirlik testlerinde ise immobilize enzimin 16 kullanım döngüsünden sonra bile %70 aktivite sergilediği gözlenmiştir. Ayrıca iki farklı sıcaklık olarak +4 ve 25 °C’de depolama kararlılığı incelenmiş ve 28 gün sonra bile sırasıyla başlangıç aktivitesinin sırasıyla %71 ve %63’ünü koruduğu tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlara bakılarak L-ASNaz’ın geliştirilen taşıyıcı sistem üzerine başarılı bir şekilde immobilize edildiği söylenilebilir. Bu sonuçlara dayanarak Fe₃O₄/SBA-15/tannik asit’in ilerleyen uygulamalar için büyük bir öneme sahip olduğunu söyleyebiliriz.

Ulu ve diğ. (2018), yaptıkları çalışmada Fe₃O₄-MCM-41 sentezleyip L-ASNaz immobilize etmiş ve pH, sıcaklık termal stabilite, kinetik parametre, yeniden kullanılabilirlik, depolama stabilitesi gibi deneyleri gerçekleştirmişlerdir. Bu deneyde kullanılan Fe₃O₄ nanopartikülleri birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenmiş ve MCM-41 ile kaplanmıştır. Daha sonra, Fe₃O₄-MCM-41 manyetik nanopartikülleri, organosilan bileşiği olarak (3-glisidiloksipropil) trimetoksisilan (GPTMS) ile işlevselleştirilmiştir. Son olarak sonra, L-ASNaz epoksi ile işlevselleştirilmiş Fe₃O₄-MCM-41 manyetik nanopartiküller üzerinde kovalent olarak immobilize edilmiştir. Immobilize edilen L-ASNaz’ın serbest enzime kıyasla, yüksek pH ve sıcaklık değerlerinde daha fazla aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca 55°C’de 3 saat inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin %92’sinden fazlasını korumuştur. Kinetik değerlerle ilgili olarak, immobilize L-ASNaz, serbest L-ASNaz ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir V_{max} ve daha düşük K_m göstermiştir. 4 ve 25 °C’de 30 günlük depolamadan sonra, immobilize L-ASNaz başlangıç aktivitelerinin %54’ünü ve %26’sını korurken, serbest L-ASNaz’ın başlangıç aktivitesinin sırasıyla yaklaşık %68 ve %84’ünü kaybettiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak geliştirilen taşıyıcı matriksin L-ASNaz immobilizasyonu için avantajlı olduğu söylenilebilir.

Noma ve diğ. (2020), yaptıkları çalışmada L-ASNaz immobilizasyonu için Fe₃O₄/SiO₂/NH₂ ve Fe₃O₄/SiO₂/COOH nanopartiküllerinin sentezlemişlerdir. Hazırlanan modifiye nanopartiküllerin FTIR, XRD, VSM, EDAX, ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullar altında immobilize enzimlerin serbest enzime kıyasla daha kararlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 55 °C’de 3 saat inkübasyondan sonra bile serbest enzime kıyasla daha yüksek termal stabilite göstermiştir.

Depolama kararlılığı deneylerinde serbest enzim 4 °C’de başlangıç aktivitesinin %30’unu korurken aynı koşullar altında $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{COOH}$ başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %78,9 ve %56,5’inden fazlasını korumuştur. Ayrıca her iki immobiliz enzimde 17 kullanım döngüsünden sonra bile mükemmel operasyonel stabilite göstermiştir. Bunlara ek olarak $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2$ ’lar immobilize L-ASNaz, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{COOH}$ üzerine immobilize edilen L-ASNaz’a göre tüm parametrelerde daha yüksek kararlılık sergilemiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında sentezlenen taşıyıcı matrislerin L-ASNaz immobilizasyonu için oldukça elverişli olduğunu söyleyebiliriz



4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1.Kullanılan Kimyasallar ve Markaları

Yapılan araştırmada kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Kullanılan kimyasalları şu şekilde sıralayabiliriz; L-asparajinaz (Leunase), L-asparajin (Sigma), Tri-kloro asetik asit (Riedel de Haen), Sodyum asetat (Merck), Hidroklorik asit (Merck), Toluen (Merck) Potasyum İyodür (Merck), Civa(II) İyodür (Merck), Sodyum Hidroksit (Merck), Etil Alkol (Sigma), Demir (II) Sülfat. 7H₂O, (Carlo Erba), Demir (III) Klorür. 6H₂O (Boston Usa Chemistry), AIBN (Sigma), 4-Vinilfenilboronik Asit (Sigma), 3-Aminopropil trimetoksi silan (Sigma), PEG 400 (Merck), Asetik asit (Merck), Sodyum dihidrojen Fosfat (Merck), Di-sodyum hidrojen Fosfat (Merck), Tris hidroksimetil aminometan (Merck).

4.2.Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Yapılan çalışmada kullanılan cihazlar; pH metre (Hanna), etüv (Nüve En 120), karıştırıcı (Wisd) , inkübatör (Nüve ES 252), su banyosu (Nüve NB 20) , santrifüj (Nüve NF 800 R), terazi (And), manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (Dathan), vorteks (Fisons), FTIR (Perkin Elmer), mikropilaka okuyucu (BioTek), ultrasonikatör (Bandelin), ultrasonik banyo (Wisd), manyetik alan indükleme sistemi (GMW magnet systems) olarak sıralanabilir.

4.3.Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

0,05 M pH:4 Asetat Tamponunun Hazırlanması: 0,05 M 1 L sodyum asetat çözeltisi hazırlamak için ilk olarak gerekli hesaplamalar yapıp kütle tayin edilmiştir. Bulunan kütle 4,101 g olup tartıldıktan sonra bir beher içerisine konulmuştur. Üzerine 900 ml olacak şekilde çift distile saf su eklenip çözünmesi sağlanmıştır. Çözündükten sonra pH metrede asetik asit ile pH'ı 4'e ayarlanmıştır. Son olarak balon joje içerisine eklenerek son hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

0,05 M pH:5 Asetat Tamponunun Hazırlanması: Sodyum asetat 4,101 g tartılıp bir behere eklenmiştir. Üzerine 900 ml olacak şekilde çift distile saf su eklenip çözünmesi sağlanmıştır. Çözündükten sonra pH metrede asetik asit ile pH'ı 5'e ayarlanmıştır. Son olarak balon joje içerisine eklenerek son hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

0,05 M pH:6 Asetat Tamponunun Hazırlanması: Yukarıda belirttiğimiz gibi sodyum asetatın belirlenen kütleye tartılıp bir beher içerisinde 900 ml çift distile saf su ile çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra pH metre yardımıyla pH'ı 6'ya ayarlanmıştır. Son olarak balon joje içerisine eklenerek son hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

0,05 M pH:7 Fosfat Tamponunun Hazırlanması: Bu çözeltiden 1 L hazırlamak için Na_2HPO_4 ve NaH_2PO_4 'den sırasıyla belirtilen miktarlarda tartılıp bir behere eklenmiştir. Üzerine 900 ml çift distile saf su eklendikten sonra çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra pH metre yardımıyla pH'ı 7'ye ayarlanmıştır. 1 L'lik balon joje içerisine eklenerek son hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

0,05 M pH:7,5 Fosfat Tamponunun Hazırlanması: Bu çözeltiden 0,05 M 1 L hazırlamak için Na_2HPO_4 ve NaH_2PO_4 'den sırasıyla g tartılmış ve 900 ml çift distile saf su içerisinde çözünmüştür. Çözünme işleminin ardından pH'ı NaOH ve HCL kullanılarak 7,5'e ayarlanmıştır. Son olarak hacmi balon joje içerisinde 1 L'ye tamamlanmıştır.

0,05 M pH:8 Fosfat Tamponunun Hazırlanması: Bu çözeltiden 0,05 M 1 L hazırlamak için Na_2HPO_4 ve NaH_2PO_4 'den sırasıyla g tartılmış ve 900 ml çift distile saf su içerisinde çözünmüştür. Çözünme işlemi bittikten sonra pH'ı NaOH ve HCL kullanılarak 8'e ayarlanmıştır. Son olarak hacmi balon joje içerisinde 1 L'ye tamamlanmıştır.

0,05 M pH:8,5 Tris-HCL Tamponunun Hazırlanması: 0,05 M 1 L Tris-HCL tampon çözeltisi hazırlamak için ilk olarak gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen 6,057 g tris(hidroksimetil)aminometan tartılarak behere aktarılmış ve üzerine 900 ml çift distile saf su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminin ardından NaOH ve HCL kullanılarak pH'ı 8,5'e ayarlanmıştır. Son olarak son hacmi balon joje yardımıyla 1 L'ye tamamlanmıştır.

0,05 M pH:9 Tris-HCL Tamponunun Hazırlanması: 0,05 M 1 L Tris-HCL tampon çözeltisi hazırlamak için ilk olarak gerekli hesaplamalar yapılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen 6,057 g tris(hidroksimetil)aminometan tartılarak behere aktarılmış ve üzerine 900 ml çift distile saf su eklenerek çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işlemi tamamlandıktan sonra NaOH ve HCL kullanılarak pH'ı 9'e ayarlanmıştır. Son olarak son hacmi balon joje yardımıyla 1 L'ye tamamlanmıştır.

0,05 M pH:10 Tris-HCL Tamponunun Hazırlanması: 6,057 g tris (hidroksimetil)aminometan tartılarak behere aktarılmış ve üzerine 900 ml çift distile saf su eklenerek

çözünmesi sağlanmıştır. Çözünme işleminin ardından NaOH ve HCL kullanılarak pH'ı 8,5'e ayarlanmıştır. Son olarak son hacmi balon joje yardımıyla 1 L'ye tamamlanmıştır.

1,5 M 50 mL TCA Çözeltisinin Hazırlanması: Tartılan 12,25 trikloro asetik asit 50 ml'lik falkon tüp içerisine konulmuştur. Üzerine 50 ml çift distile saf su eklenip, çalkalayarak çözünmesi sağlanmıştır.

3,5 M 40 ml NaOH Çözeltisinin Hazırlanması: Manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesinde bazik ortam olarak kullanmak istediğimiz bu çözeltiyi hazırlamak için 5,6 g NaOH tartılmış ve 40 ml çift distile saf su ile çözünmüştür. Ayrıca bu çözeltiyi hazırlarken dikkat edilen diğer bir nokta ise, çözeltinin sıcaklığının 70 °C olmasına dikkat etmemizdir.

0,01 M L-asparajin Çözeltisinin Hazırlanması: Enzim aktivitesi ölçmede substrat olarak kullandığımız bu çözeltiyi hazırlamak için ilk olarak 0,0132 g L-asparajin çözeltisinden tartılıp cam tüp içerisine konulmuştur. Daha sonra üzerine pH'ı 8,6 olan Tris-HCL çözeltisinden 10 ml eklenerek ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmıştır.

4.4.Nessler Reaktifinin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanacağımız Nessler Reaktifi aşağıda anlatılacağı gibi iki farklı çözelti hazırlanıp karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Nessler Reaktifi için ilk olarak:

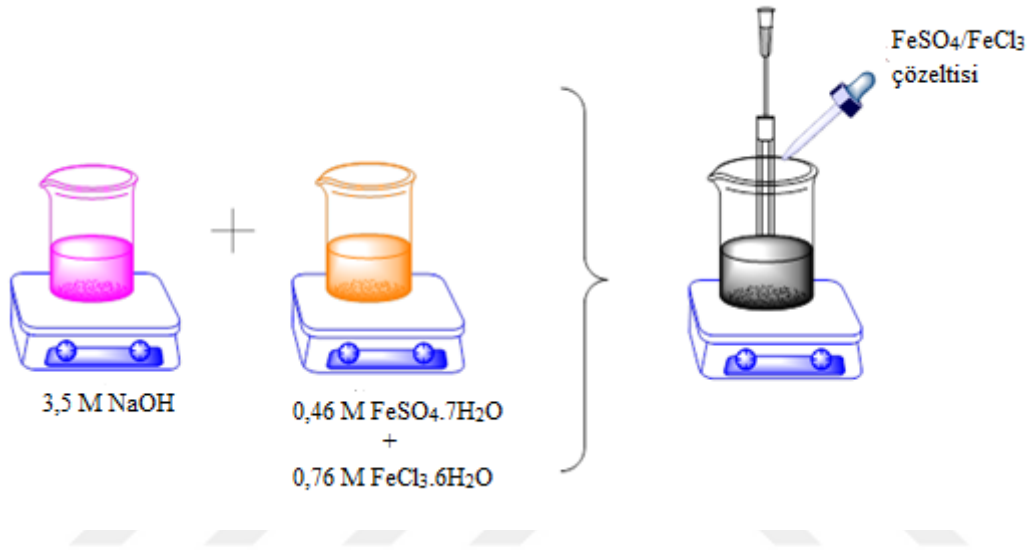
1. Çözelti: 35 g KI ve 50 g HgI₂ alınıp çift distile su içerisinde çözünmüştür. Daha sonra çözeltinin hacmi 200 ml tamamlanmıştır.
2. Çözelti: 50 g NaOH alınmış ve 250 ml çift distile su içerisinde çözünmüştür.

Çözeltilerin hazırlanmasından sonra 2. Çözelti süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek 1. Çözelti üzerine eklenmiştir. Daha sonrasında bu karışım 1 hafta süre boyunca presipitasyon sağlanmış ve alüminyum folyoyle kaplanıp karanlıkta saklanmıştır. Kullanılmak istenildiğinde, kullanılacak miktar santrifüjlenerek, çözelti içerisindeki kirlilikler giderilip kullanılmaktadır.

4.5.Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Bu tez çalışmasında manyetik Fe₃O₄ nanopartikülleri elde etmek için sentez yöntemi olarak birlikte çöktürme yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntem dahilinde ilk olarak 3,5 M NaOH 40 ml için kütle hesaplanıp çift distile saf su eklenerek, manyetik karıştırıcıda karıştırılarak sıcaklığı 75 °C'ye ayarlanmıştır. Sonrasında 0,46 M FeSO₄.7H₂O ve 0,76 M

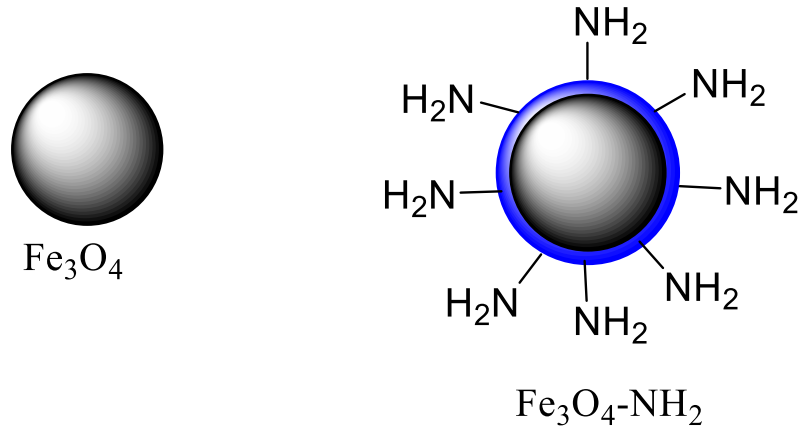
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 ml saf su içerisinde beraber çözünmüştür. Çözünen demir iyonları, NaOH istenilen sıcaklığa geldikten sonra ultrasonikatör eşliğinde 30 dk boyunca damla damla olacak şekilde bu çözeltinin üzerine eklenmiştir. Bu işlem bittikten sonra ayrıca 1 saat boyunca ultrasonik banyoya bırakılmıştır. Ultrasonik banyodaki süre bittikten sonra elde edilen manyetik nanopartiküller 3 kez saf su 1 kez de etil alkolle yıkanıp santrifüj edilerek toplanmıştır. Son olarak kuruması için $80\text{ }^\circ\text{C}$ 'lik etüvde 24 saat bırakılmıştır. Bu yöntemle ait prosedür aşağıdaki Şekil 4.1'de şematize edilmiştir (Li ve diğ, 2015).



Şekil 4.1 : Manyetik nanopartiküllerin birlikte çöktürme yöntemi ile hazırlanması

4.5.1. Manyetik nanopartiküllerin 3- Aminopropil Trimetoksi Silan'la fonksiyonelleştirilmesi

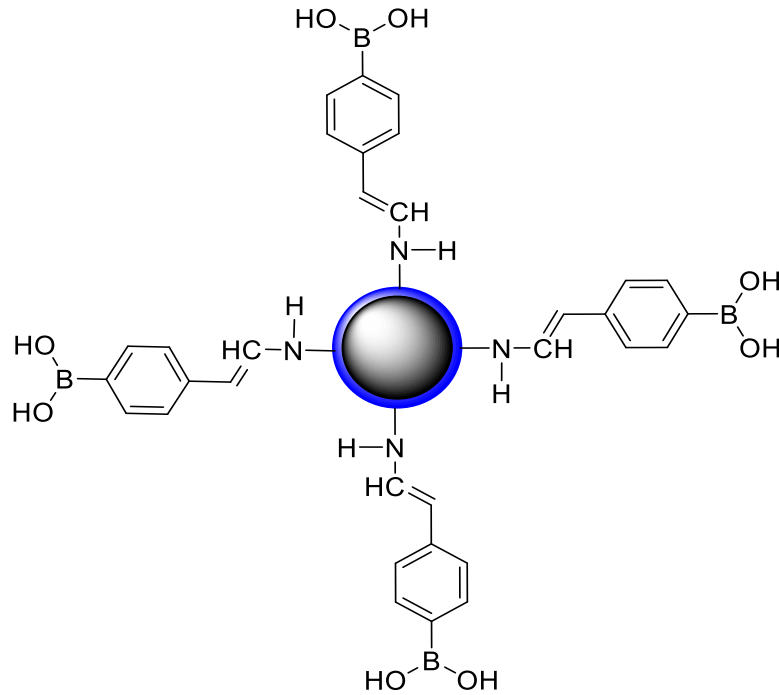
Kuruma işlemi bittikten sonra elde edilen manyetik nanopartiküllerden 2 g tartılıp bir balon içerisine bırakılarak ve üzerine 20 ml Toluen eklenmiştir. Bu karışım ultrasonikatörde 10 dk disperse edilmiştir. Bu işlemden sonra üzerine 20 ml daha tolue eklenmiştir. Son olarak 3 g 3-aminopropil trimetoksi silan (APTMS) eklenip hazırlanan karışım reflaks yardımıyla inert (N_2) bir ortam sağlanarak manyetik karıştırıcıda 24 saat süreyle karıştırılmıştır. Karıştırılma süresi dolduktan sonra elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ nanopartiküller faz oluşumunu engellemek için ilk olarak 3 kez etil alkolle yıkanıp santrifüjlenmiş ve daha sonra 3 kez de çift distile saf su ile yıkanıp santrifüjlenerek $80\text{ }^\circ\text{C}$ 'lik etüvde 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Bu deneye ait şema Şekil 4.2'de gösterilmektedir (Li ve diğ, 2015).



Şekil 4.2 : Fe_3O_4 'ün APTMS ile fonksiyonelleştirilmesi

4.5.2. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ Nanopartiküllerin 4-Vinilfenil Boronik Asit ile Modifiye Edilmesi

Elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ manyetik nanopartiküllerine 4 Vinilfenil boronik asit bağlamak için, bu nanopartiküllerden 1 g tartılmıştır. Üzerine 10 mg AIBN, 0,05 g 4-vinilfenilboronik asit ve 40 ml mutlak etil alkol eklenip 4 saat süreyle oda koşullarında karıştırılması sağlanmıştır. Reaksiyon süresi bittikten sonra 3 kez çift distile saf su, 1 kez de etil alkolle yıkanp santrifüjlenerek 80 °C'lik etüvde 24 saat kurumaya bırakılmıştır. Bu deneye ait adımlar Şekil 4.3'te gösterilmektedir (Bi ve diğ, 2018).



Şekil 4.3 : 4-Vinilfenil boronik asit türevli manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesi

4.5.3. Fe₃O₄-NH₂-4VPBA Nanopartiküllerin PEG ile Modifikasyonu

Sentez ve modifikasyonun son basamağı olan pegilasyonda, reaksiyon ortamına PEG 400 eklenerek elde edilen Fe₃O₄-NH₂-4VPBA nanopartiküllerinin sudaki çözünürlüklerinin artırılması amaçlanmıştır. Bu işlem için 0,9 g Fe₃O₄-NH₂-4VPBA nanopartiküllerinden tartılıp üzerine 40 ml mutlak etil alkol ve 0,450 ml PEG 400 eklenip manyetik karıştırıcıda oda koşullarında 24 saat karıştırılması sağlanmıştır. Reaksiyon bittikten sonra bu karışım 3 kez çift distile saf su ve 1 kez de etil alkolle yıkanıp santrifüjlenerek 80 °C'lik etüvde 24 saat kurumaya bırakılmıştır.

4.6. Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG Nanopartiküllere Enzim İmmobilizasyonu

Elde edilen Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG'den 0,1 g tartılmış ve üzerlerine 800 µl çift distile saf su eklenmiştir. Bu işlemden sonra ultrasonikatörde iyice disperse edilip üzerlerine 200 IU L-ASNaz enzimi eklenmiştir. Daha sonra karıştırıcı +4 °C'de 24 saat boyunca karıştırılması sağlanmıştır. 24 saat sonunda santrifüj edilerek süpernatant ayrılıp sonraki deneyler için saklanmış, manyetik nanopartiküller ise 1 kez saf su ile yıkanarak +25 °C'de kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan örneklerden 1 mg alınarak enzim aktivitesi deneyleri gerçekleştirilmiştir.

4.7. Serbest L-ASNaz Aktivitesinin Tayini

Serbest enzimin aktivitesini ölçerken Nesslerizasyon yöntemi kullanılmıştır. L-ASNaz L-asparajini L-aspartik asit ve amonyağa parçalamaktadır. Nessler reaktifi açığa çıkan amonyak ile tepkimeye girerek aktivite hakkında bilgi vermektedir. Yaptığımız çalışmada substrat olarak L-asparajin 0,01 M 10 ml pH:8,6 Tris-HCL tamponunda ultrasonik banyoya bırakılarak çözülmüştür. serbest L-ASNaz enziminden (0,053 IU) 20 µl alınarak ependorf tüplere bırakılmış ve üzerlerine 1 ml hazırlanmış olduğumuz substrat çözeltisinden eklenmiştir. Daha sonra su banyosunda 40 °C'de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra serbest enzimin aktivitesini durdurmak için üzerine 1,5 M 100 µl TCA çözeltisi eklenip karıştırılmıştır. Son olarak mikrotelatlere 100 µl enzim çözeltilerinden 100 µl'de Nessler reaktifinden eklenip 480 nm'de absorbanları ölçülmüştür.

4.8 Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-LASNaz Aktivitesinin Tayini

İlk olarak pH:7,5 Fosfat tamponunda 10 ml L-asparajin substrat olarak hazırlanmıştır. İmmobilize edilen Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-LASNaz örneklerinden 1 mg tartılmış ve üzerlerine 1 ml substrat çözeltisinden eklenip 3 sn ultrasonikatörde disperse edilmiştir. Sonrasında 40 °C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra nanopartikülleri reaksiyon ortamından çöktürerek uzaklaştırmak için 5000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatandan 100 µl mikrotelatlere eklenip üzerlerine 100 µl Nessler reaktifi eklenmiştir. Son olarak 480 nm’de absorpsanları ölçülmüştür.

4.9. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Çalışma kapsamında immolizasyonunun başarısını doğrulamak için örneklerdeki toplam protein miktarı Bradford Reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. İmmobilizasyon verimi (İ.V) ve aktivite verimi (A.V) aşağıda verilmiş olan formüllerden hesaplanmıştır.

$$\text{İ.V (\%)} = \frac{A_t - A_s}{A_t} \times 100$$

Burdaki A_t total protein miktarını temsil ederken, A_s süpernatandaki bağlanmayan proteinleri göstermektedir.

$$\text{A.V (\%)} = \frac{A_i}{A_s} \times 100$$

Aktivite verimini hesaplamak için verilmiş olan formülde A_s serbest enzimin aktivitesini, A_i immobilize enzimin aktivitesini göstermektedir.

4.10. Optimum pH’nın Belirlenmesi

Enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri belirli pH değerleri vardır. Bu pH değerlerine optimum pH denir. Serbest enzim ve immobilize enzim için bu değerleri belirlemek için, pH: 4- 5- 6 (Asetat Tamponu) pH: 7-7,5-8 (Fosfat Tamponu) pH: 8,5 -9 -10 (Tris-HCL) gibi farklı pH’larda 0,01 M L-asparajin substart olarak hazırlanmıştır. Daha sonra 0,053 IU serbest enzimden epondorf tüplere 20 µl eklenmiş ve 1 ml’de farklı pH’larla hazırlanmış olan substrat çözeltilerinden eklenip 40 °C’de 15 dk su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra serbest enzim örneklerine 100 µl TCA eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Son olarak serbest enzim örneklerinden mikrotelatlere

100 µl eklenmiş, Nessler reaktifinden de 100 µl eklenerek 480 nm’de absorbansları ölçülmüştür. İmmobilize $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4-VPBA-PEG-L-Asnaz}$ için ise bu malzemeden ependorf tüplere 1 mg tartılmış farklı pH’larla hazırlanan substrat çözeltilerinden 1 ml eklenerek 40 °C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 5000 rpm’de 5 dk santrifüjlenerek üstte kalan süpernatandan 100 alnıp mikrolatelere eklenmiş ve 100 µl Nessler eklenerek absorbansları 480 nm’de ölçülmüştür.

4.11. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Enzimlerin aktivitelerini etkileyen başlıca etmenlerden biri de sıcaklıktır. Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği belirli bir sıcaklık vardır. Bu sıcaklık değerine optimum sıcaklık denir. Yaptığımız çalışmada optimum sıcaklık değerlerini belirlemek için ilk olarak her iki enziminde kendi optimum pH değerlerinde substrat çözeltileri hazırlanmıştır. Sonrasında serbest enzimin optimum sıcaklığını ölçmek için 0,053 IU serbest enzimden ependorf tüplere 20 µl eklenmiştir. Daha sonra ise pH:8,5 Tris-HCL Tamponu ile hazırlanmış 0,01 M L-asparajin çözeltisinden enzim örneklerine 1 ml eklenerek belirtilen tüm sıcaklıklarda 15 dk boyunca inkübe edilmiştir. Son olarak 100 µl 1,5 M TCA çözeltisi eklenerek aktiviteleri durdurulmuş ve mikrolatelere 100 µl süpernatant eklenip, 100 µl Nessler reaktifi eklenerek 480 nm’de absorbansları ölçülmüştür. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4-VPBA-PEG-L-ASNaz}$ için ise nanopartiküllerden 1 mg tartılmış ve üzerlerine pH:7,5 Fosfat Tamponu ile hazırlanan 0,01 M L-asparajin çözeltisinden 1 ml eklenerek belirtmiş olduğumuz tüm sıcaklıklarda 15 dk inkübe edilmiştir. Tüm örnekler inkübasyondan sonra 5000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatandan 100 µl, Nessler reaktifinden 100 µl eklenerek 480 nm’de absorbansları ölçülmüştür.

4.12. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Bu aşamada serbest enzim ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4-VPBA-PEG-L-ASNaz}$ ’ın kinetik parametreleri belirlenmiştir. İlk olarak serbest enzim için 8-6 4-2-1-0,75-0,50-0,25-0,1-0,05 mM pH: 8,5 ile L-asparajin çözeltileri hazırlanmıştır. 0,053 IU serbest enzim örneklerinden her ependorfa 20 µl konulmuştur üzerlerine her derişim çözeltisinden iki tekrarlı olacak şekilde 1 ml bırakılmış ve 45 °C’de 15 dk su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra üzerlerine 100 µl TCA çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. 480 nm’de absorbansları ölçülmüştür. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4-VPBA-PEG-L-ASNaz}$

örneklerinden 2 mg tartılmış ve üzerlerine iki tekrarlı olacak şekilde farklı derişimlerde hazırlanan substrat çözeltilerinden 1 ml eklenmiştir. Daha sonra 40 °C’de 15 dk inkübe edilmesi sağlanmıştır. İnkübasyon işleminden sonra 5000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş ve üstte kalan süpernatandan alınarak 480 nm’de absorbansları Nesslerizasyon yöntemi ile ölçülmüştür.

4.13. Termal Kararlılığın Belirlenmesi

Bu aşamada her iki enzim formunun termal kararlılıkları belirlenmiştir. İlk olarak serbest L-ASNaz için 0,01 M pH: 8,5 olan substrat çözeltileri hazırlanmış ve farklı zaman aralıklarıyla (15-120 dk) inkübe edilmiştir. Daha sonrasında kendi optimum sıcaklığında da 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 500 rpm’de santrifüj edilerek üstte kalan süpernatanın Nesslerizasyon yöntemi ile 480 nm’de absorbasansı ölçülmüştür. Ayrıca Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz için 0,01 M pH: 7,5 olan substrat çözeltisi hazırlanmış ve farklı zaman aralıklarıyla (15-120 dk) inkübe edilmiştir. Buna ek olarak kendi optimum sıcaklığında da 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemlerinden sonra santrifüj edilerek üstte kalan süpernatanın absorbansı 480 nm’de ölçülmüştür.

4.14. Yeniden Kullanılabilirliğin Belirlenmesi

İmmobilizasyon işleminin en önemli avantajlarından biri de immobilize enzimlerin tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Serbest enzimler sadece bir kez kullanıldıktan sonra denatüre olurken, immobilize enzimler reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılarak defalarca kullanılabilirler. Bu deneyde ilk olarak Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz’dan 2 mg tartılarak ependorf tüplere konulmuştur. Üzerlerine pH:7,5 Fosfat Tamponu ile hazırlanmış olan 0,01 M L-asparajin substrat çözeltisi eklenerek 40 °C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra 5000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra üstte bulunan süpernatandan mikrolakalara 100 µl eklenip, üzerlerine 100 µl Nessler reaktifi eklenerek 480 nm’de absorbansları ölçülmüştür. Süpernatan ve nanopartiküller birbirinden ayrılıp nanopartiküller 1 ml çift distile saf su ile bir kez yıkanarak 5000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan saf su atılmış ve aktivite ölçümü için aynı işlemler immobilize enzim başlangıç aktivitesinin yaklaşık %50’sini kaybedene kadar tekrar edilmiştir.

4.15. Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

Enzimlerin çevre koşullarına duyarlı oluşları uzun süre saklanmalarını zorlaştırmaktadır. Bu zorluğun önüne geçmek için yapılmış olan immobilizasyon işlemi enzimleri çevre koşullarına karşı daha dayanıklı hale getirerek başlangıç aktivitelerinin büyük bir kısmını haftalar sonra bile korumalarını sağlamaktadır. Bu aşamada ilk olarak 0,053 IU serbest enzimden ependorf tüplere 20 µl eklenmiştir. Üzerine pH:8,5 Tris-HCl tamponuyla hazırlanmış olan 0,01 M L-asparajin çözeltisinden 1 ml eklenerek, kendi optimum sıcaklığı olan 45 °C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra reaksiyonu durdurmak amacıyla 1,5 M TCA çözeltisinden 100 µl eklenmiş ve mikrolatelere 100 µl eklenmiştir. 100 µl’de Nessler reaktifi eklenerek 480 nm’de absorbansları ölçülmüştür. Fe₃O₄-NH₂-4-VPBA-PEG-L-ASNaz için ise 3 mg örnek tartılarak ependorf tüplere konulmuştur. Üzerlerine pH:7,5 Fosfat Tamponu ile hazırlanan 0,01 M L-asparajin çözeltisi eklenerek kendi optimum sıcaklığı olan 40 °C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra 5000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan süpernatandan 100 µl alınarak mikrolatelere eklenmiş ve üzerlerine 100 µl Nessler Reaktifi eklenerek 480 nm’de absorbansları ölçülmüştür.

4.16. Manyetik Alan Etkisinin İncelenmesi

Bu deney aşamasında manyetik alanın enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenecektir. İlk olarak optimum manyetik alan frekansını tayin etmek için Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz örneklerinden 2 mg tartılıp üzerine 1ml pH: 7,5 fosfat tamponuyla hazırlanan L-asparajin çözeltisinden eklenmiştir. Sonrasında manyetik alan cihazının içerisinde 15 dk boyunca manyetik alana maruz bırakılarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 5000 rpm’de 5 dk santrifüj edilerek üstte kalan süpernatanın Nesslerizasyon yöntemi ile 480 nm’de absorbansı ölçülmüştür.

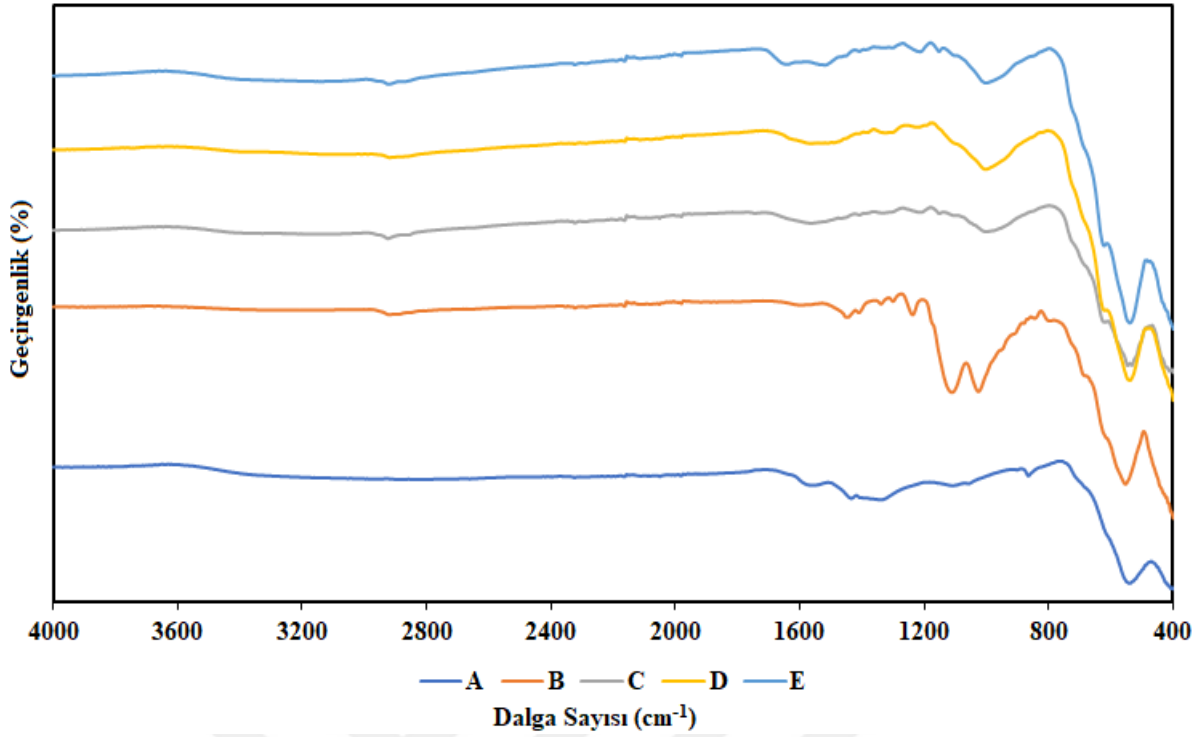
Manyetik alanın optimum akı yoğunluğunu tespit etmek amacıyla yukarda anlatılan prosedür aynen uygulanmıştır. Tartılan ve üzerine substrat çözeltisi eklenen Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz’lar 15 dk boyunca sırasıyla farklı akı şiddetleri (5-10-15-20-25-30-35 mT) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra 5000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiş ve üstteki süpernatanın Nesslerizasyon yöntemiyle 480 nm’de absorbansı ölçülmüştür.

5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

5.1. Manyetik Nanopartiküllerin Fizikokimyasal Karakterizasyonları

5.1.1. Manyetik nanopartiküllerin FTIR karakterizasyonları

Hazırlanan Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-4VPBA}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ların moleküler arası etkileşimleri FTIR spektroskopisi ile incelenmiştir. Şekil 5.1'de hazırlanan manyetik nanopartiküllerin FTIR spektrumları gösterilmektedir. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin FTIR spektrumu, 540 cm^{-1} 'de güçlü bir bant göstermiştir, bu band Fe-O bağının karakteristik bandıdır (Yang ve diğ, 2018). Diğer bandlar ise şu şekildedir; 2933 cm^{-1} 'de N-H titreşim bandı, 13253 cm^{-1} 'de C-C germe titreşimi, 1135 cm^{-1} 'de esterik C-O bandı ve 1126 cm^{-1} 'de Si-O bandı. Tüm bu pikler Fe_3O_4 nanopartiküllerinin ve gerçekleştirilen modifikasyonların başarıyla modifiye edildiğini göstermektedir (Karimzadeh ve diğ, 2017). Boronik asitin başarılı bir şekilde modifiye edildiğine dair B-O pikleri 1600 cm^{-1} dalga boylarında gözlenmiştir (Shawgi ve diğ, 2017). L-ASNaz'ın varlığına dair bilgi veren amid pikleri 1300 cm^{-1} ve 1600 cm^{-1} dalga boyları arasında gözlenmektedir (Riaz ve diğ 2018). Kook ve diğ. (2019) yaptıkları çalışmada $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-COOH}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-APBA}$ nanopartiküllerini sentezlemiş ve FTIR spektrumlarını analiz etmişlerdir. Si-O-Si bandını 1250 cm^{-1} , Fe-O bandı 540 cm^{-1} , B-O bandı 1390 cm^{-1} , COOH bandı 1560 cm^{-1} , NH_2 bantlarını 1500 cm^{-1} de elde etmişlerdir. Yapılan çalışma ve bu tez çalışmasının FTIR spektrumları birbirleriyle paralellik göstermektedir. Burdan yola çıkarak çalışmamızın literatürle uyum içinde olduğunu söyleyebiliriz.

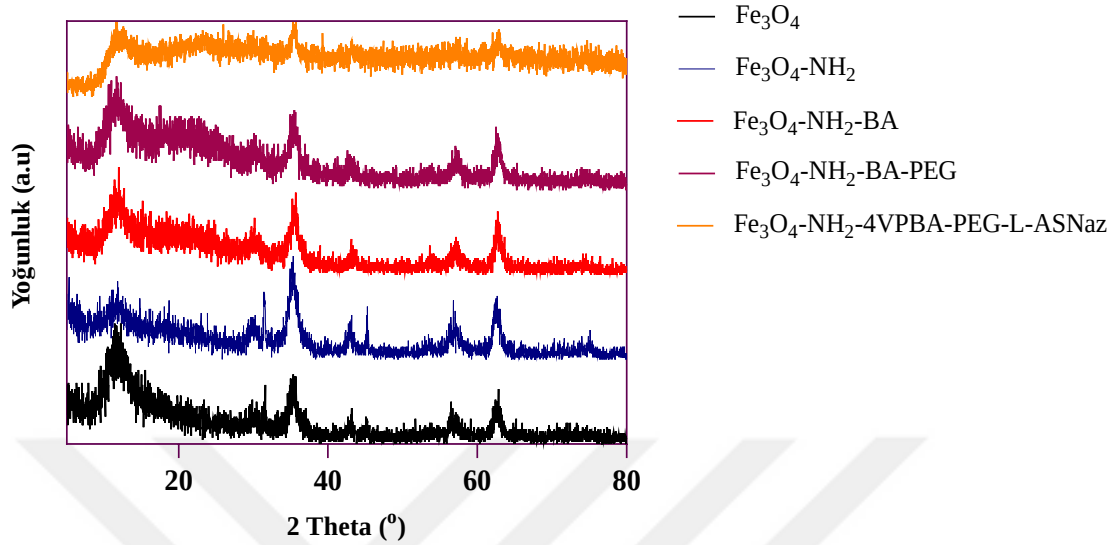


Şekil 5.1 : (A) Fe_3O_4 (B) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ (C) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-4VPBA}$ (D) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ (E) $\text{NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ nanopartiküllerinin FTIR karakterizasyonu

5.1.2. Manyetik nanopartiküllerin XRD karakterizasyonları

Hazırlanan manyetik nanopartiküllerin manyetik fazın yapısı ve kristalizasyonu XRD ile tanımlanmıştır (Şekil 5.2). Saf Fe_3O_4 XRD spektrumunda, 31.5, 35.4, 43.1, 57.3 ve 62.9 2θ değerlerinde pikler görülmüştür. Bu noktalar sırasıyla (220), (311), (400), (511) ve (440) 'nın düzlemlerine karşılık gelmektedir. Elde edilen bu XRD spektrumu hazırlanan nanopartiküllerin kristalin yüz merkezli kübik Fe_3O_4 nanopartiküller (JCPDS-19-0629) olduğunu kanıtlamaktadır (Gong ve Lin, 2003; Liao ve Chen, 2001). Yapılan diğer modifikasyonların XRD sonucu da Fe_3O_4 nanopartiküllerinin benzer karakteristik piklerine sahiptir. **Xu ve diğ. (2013)** yaptıkları çalışmada Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin XRD spektrumlarını incelemiş ve modifikasyon sonucunda benzer karakteristik pikler elde etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada benzer şekilde yüzey modifikasyonlarının Fe_3O_4 'ün kristalin yapısında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. Ancak L-ASNaz immobilize edilen örnekte net bir şekilde pik şiddetinin düştüğü gözlenmektedir. Bu L-ASNaz'ın başarılı bir şekilde immobilize edildiğinin göstergesidir. Literatürde L-ASNaz immobilizasyonundan sonra XRD piklerindeki değişikliğin gözlemlendiği başka çalışmalarda mevcuttur. **Baskar ve diğ. (2015)** yaptıkları

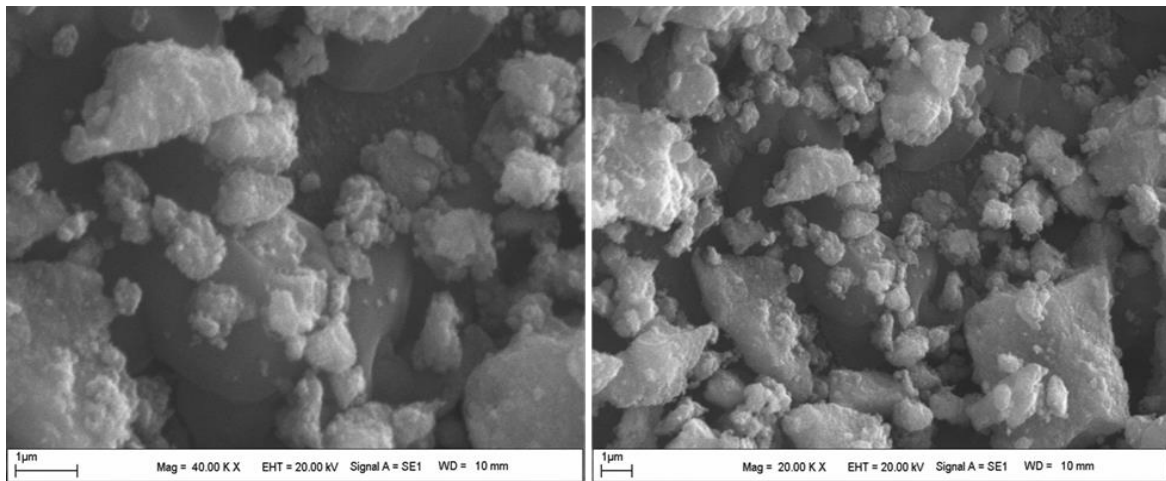
çalışmada çinko oksit nanopartikülleri sentezleyerek L-ASNaz immobilize etmiş ve XRD piklerinde belirgin bir şekilde kayma gözlemlemiştir.



Şekil 5.2 : Manyetik nanopartiküllerinin XRD karakterizasyonu

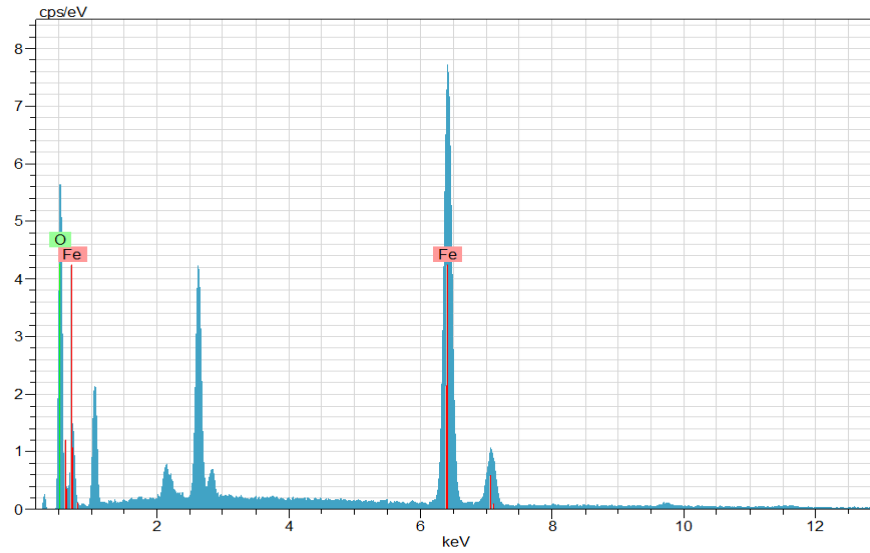
5.1.3. Manyetik nanopartiküllerin SEM ve EDX karakterizasyonları

Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin morfolojik analizi SEM ile karakterize edilmiştir. Şekil 5.3'te iki farklı büyütmeye sahip Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin SEM görüntülerini göstermektedir. Elde edilen SEM görüntüleri, hazırlanan nanopartiküllerin farklı şekil ve boyutlara sahip olduğunu göstermektedir. Bu homojen olmayan yüzeyin sebebinin hazırlanan nanopartiküllerin manyetik özelliğinden dolayı topaklanma (agregasyon) eğilimlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Costa ve diğ., 2019).

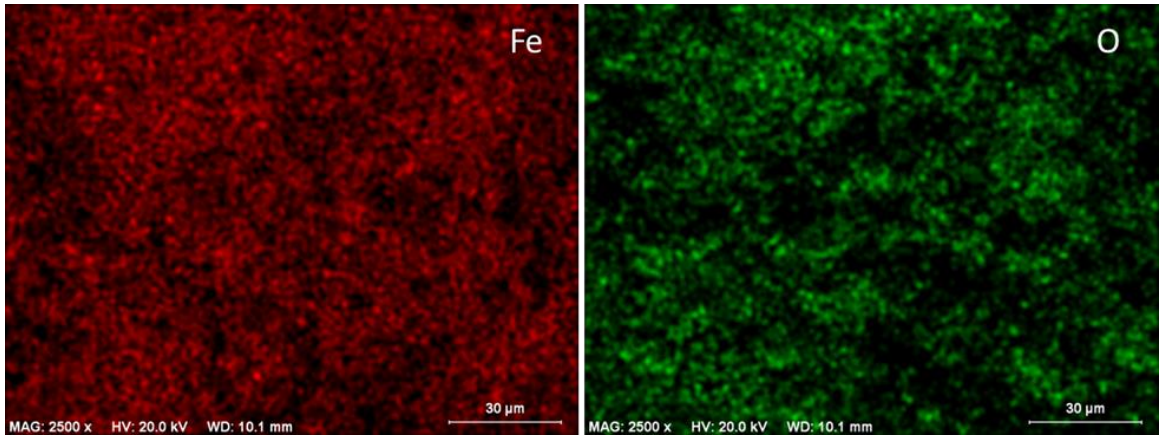


Şekil 5.3 : Fe_3O_4 nanopartiküllerinin SEM karakterizasyonu

Hazırlanan manyetik nanopartiküllerin elementel bileşimi EDAX ve EDAX-haritalama ile doğrulanmıştır. Şekil 5.4 hazırlanan manyetik nanopartiküllerin EDAX spektrumunu göstermektedir. Elde edilen spektrumda demir (Fe) ve oksijen (O) elementlerine ait pikler bariz bir şekilde görülmektedir. Ayrıca, Şekil 5.5'te gösterilen EDAX-haritalama sonuçları da bu verileri doğrulamaktadır.

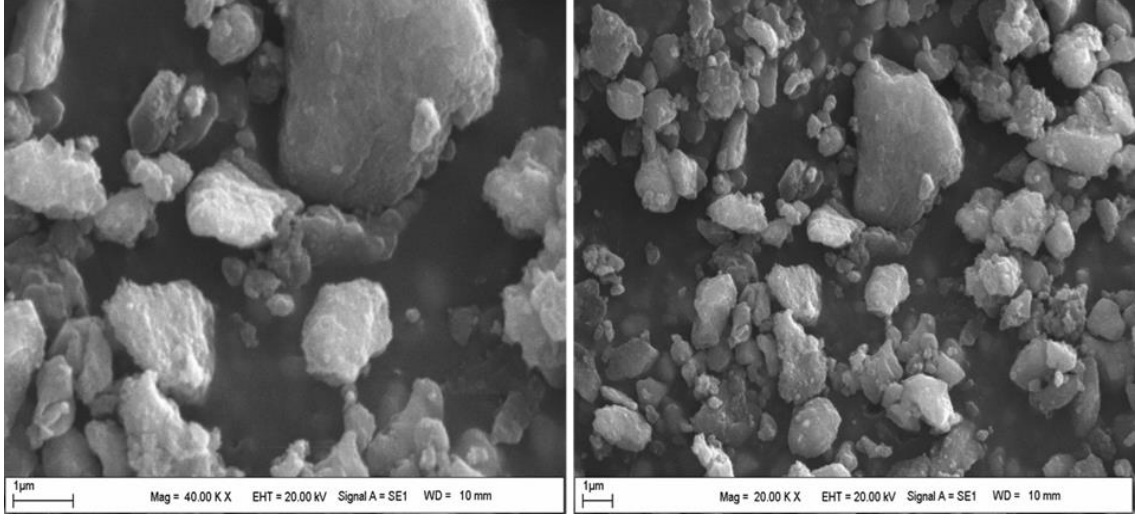


Şekil 5.4 : Fe₃O₄ nanopartiküllerinin EDAX spektrumu



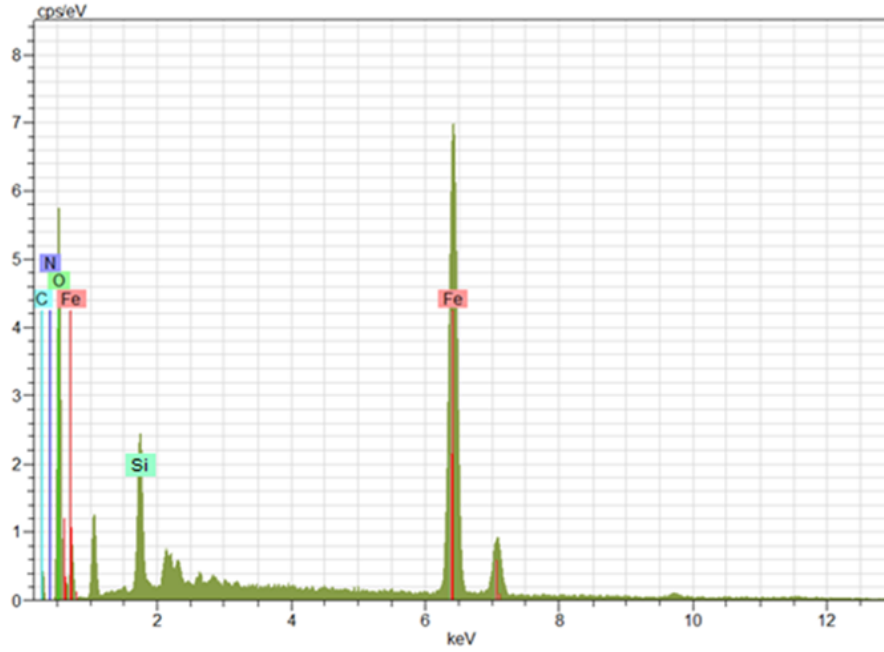
Şekil 5.5 : Fe₃O₄ nanopartiküllerinin EDAX-elementel haritalama görüntüleri

Şekil 5.6 iki farklı büyütmeye sahip Fe₃O₄ manyetik nanopartiküllerinin SEM görüntülerini göstermektedir. Elde edilen SEM görüntüleri, yüzeyi modifiye edilmiş Fe₃O₄-NH₂ nanopartiküllerinin Fe₃O₄ nanopartiküllerine göre daha kararlı ve daha az aglomerasyona sahip olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni modifikasyondan sonra manyetizasyon değerinin azalmasından dolayıdır (Baghani ve diğ, 2016).

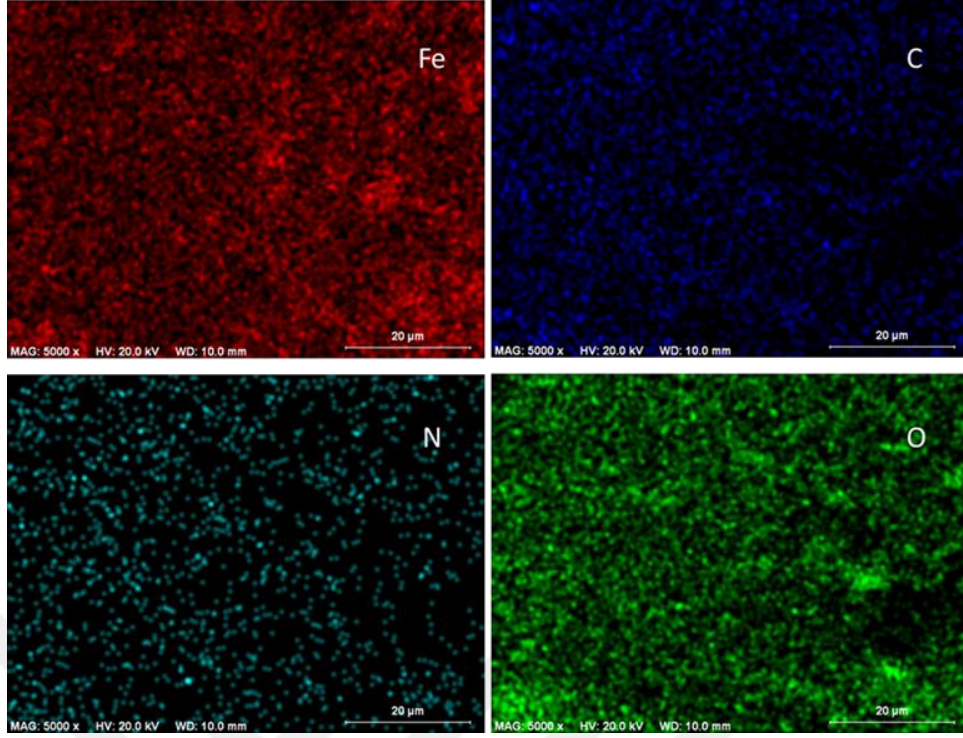


Şekil 5.6 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin SEM görüntüleri

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin elementel bileşimi Şekil 5.7’de gösterilmiştir. Fe, O, C, N ve Si elementleri görülmüştür. Si, N ve C elementlerinin bulunması Fe_3O_4 nanopartiküllerinin APTMS ile başarıyla modifiye edildiğini göstermektedir. EDAX-haritalama sonuçları da bunu kanıtlamaktadır (Şekil 5.8).

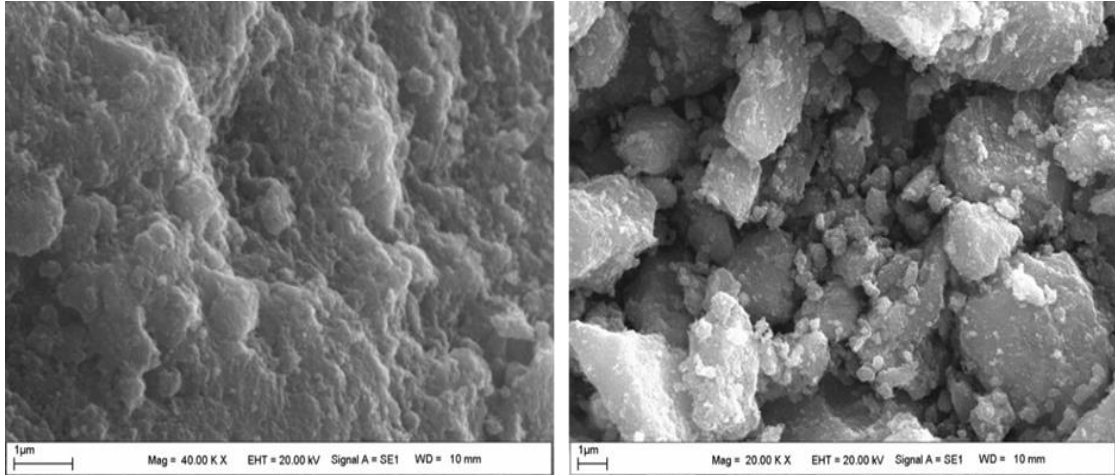


Şekil 5.7 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin EDAX spektrumu



Şekil 5.8 : Fe₃O₄-NH₂ nanopartiküllerinin EDAX- elementel haritalama görüntüleri.

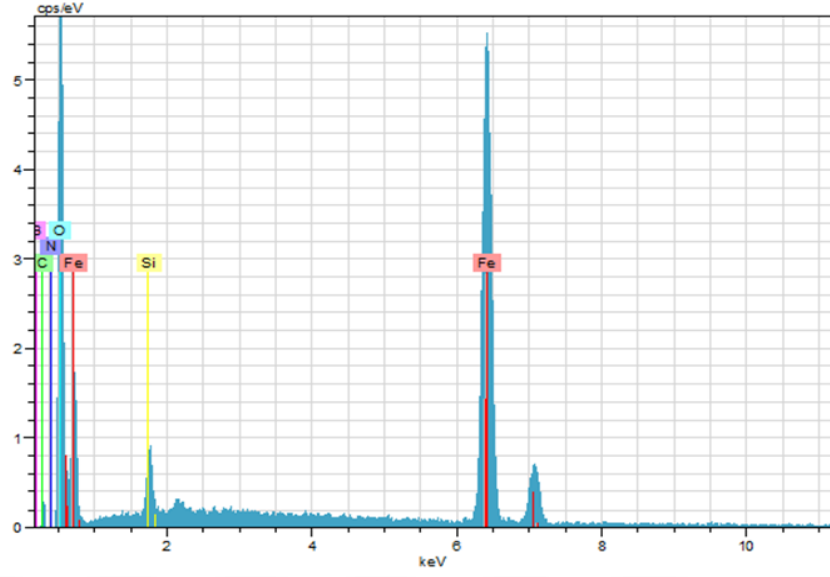
Şekil 5.9 Fe₃O₄-NH₂-4VPBA manyetik nanopartiküllerinin SEM görüntülerini göstermektedir. Elde edilen SEM görüntüleri, yüzeyi modifiye edilmiş Fe₃O₄-NH₂-4VPBA nanopartiküllerinin Fe₃O₄ nanopartiküllerine göre daha kararlı ve daha az aglomerasyona sahiptir.



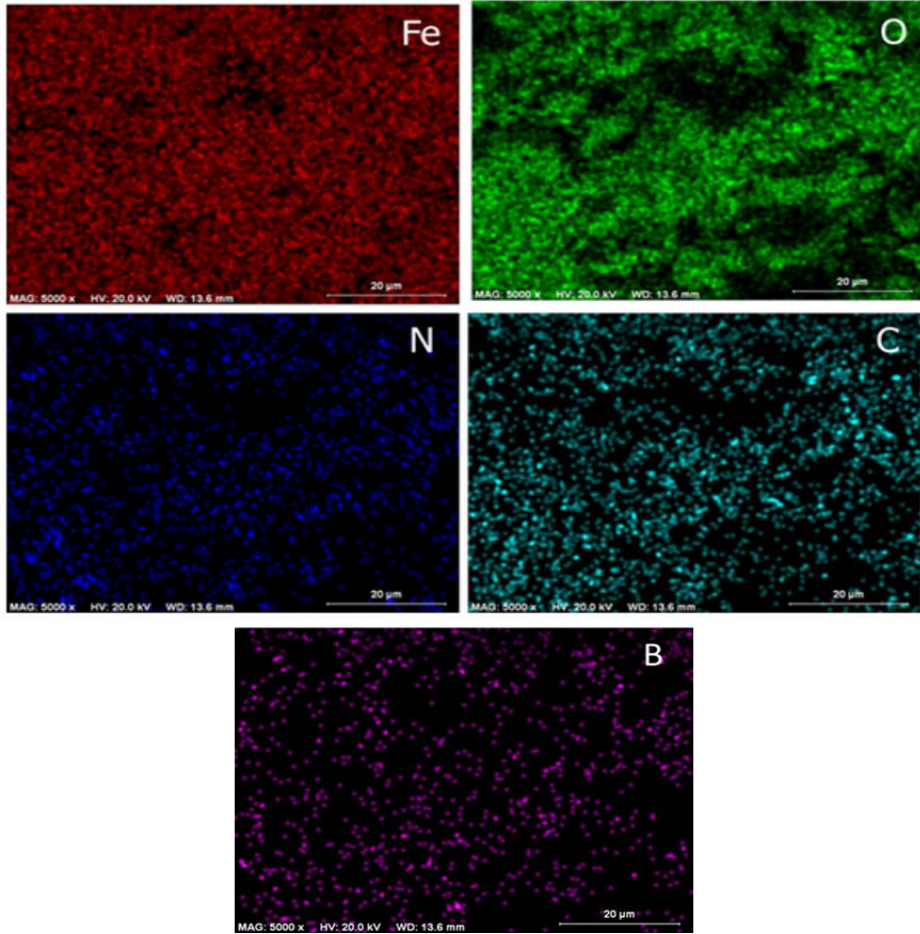
Şekil 5.9 : Fe₃O₄-NH₂-4VPBA nanopartiküllerinin SEM görüntüleri

Fe₃O₄-NH₂-4-VPBA nanopartiküllerinin elementel bileşimi Şekil 5.10'da gösterilmiştir. Fe, O, C, N, Si ve B elementleri görülmüştür. Yapıdaki B elementinin varlığı Fe₃O₄-NH₂ nanopartiküllerinin 4VPBA ile başarılı bir şekilde modifiye edildiğini

göstermektedir. EDAX-haritalama sonuçlarındaki B elementinin varlığı bunu kanıtlamaktadır (Şekil 5.11).

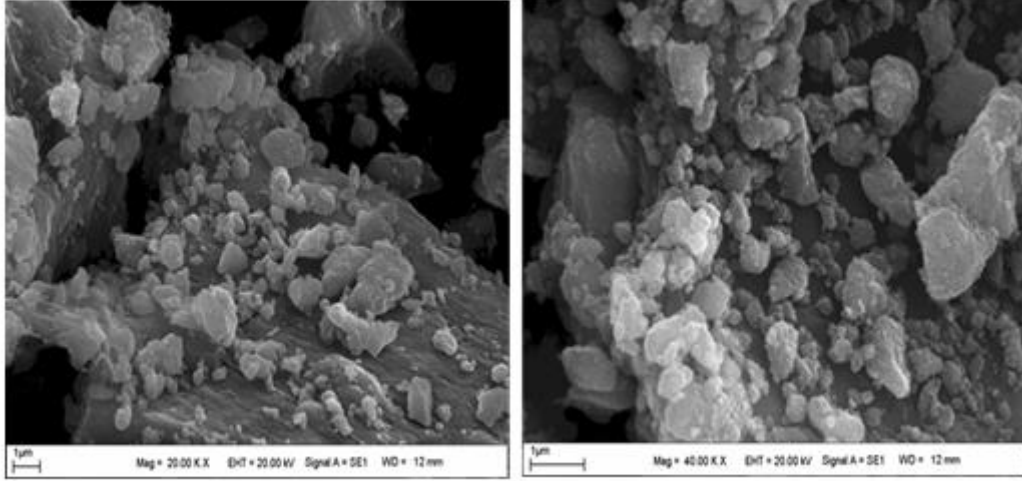


Şekil 5.10 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA}$ nanopartiküllerinin EDAX spektrumları



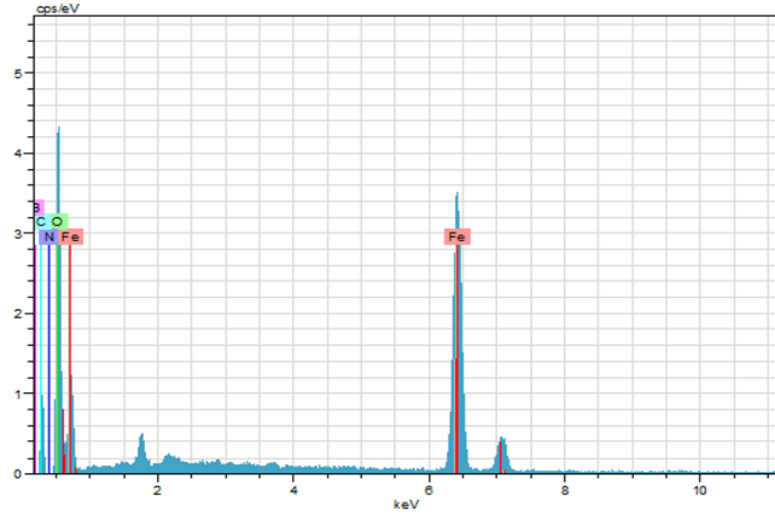
Şekil 5.11 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA}$ nanopartiküllerinin EDAX- elementel haritalama görüntüleri

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ nanopartiküllerinin morfolojik analizi SEM ile karakterize edilmiştir. Şekil 5.12 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ 'in SEM görüntülerini göstermektedir. Elde edilen SEM görüntüleri, yüzeyi modifiye edilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ nanopartiküllerinin morfolojik iyilişetiğini göstermektedir. PEG eklenmesinin amacı nanopartiküllerin aglomerasyonunu en aza indirebilmektir. Bu nedenle manyetizasyon değerinin düşerek aglomerasyonun azalmasıyla birlikte yüzey morfolojisi özellikleri korunmuştur.

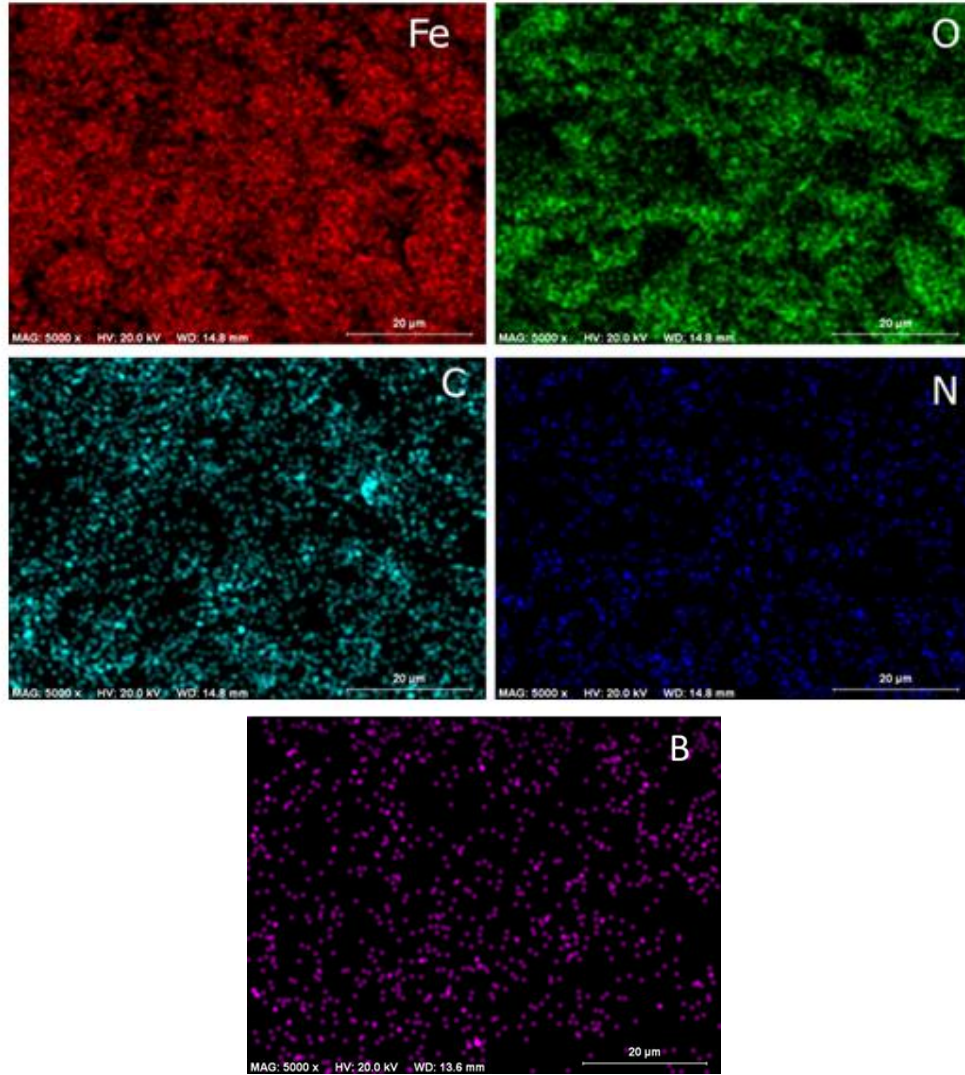


Şekil 5.12 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-BA-PEG}$ nanopartiküllerinin SEM görüntüleri

Şekil 5.13'te $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ nanopartiküllerinin elementel bileşimi gösterilmektedir. Önceki modifikasyonlara bağlı olarak Fe, O, C, N, Si ve B elementleri görülmüştür. Yapıdaki C ve O elementlerindeki artış PEG bağlama işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. EDAX-haritalama sonuçları da bunu kanıtlamaktadır (Şekil 5.14).

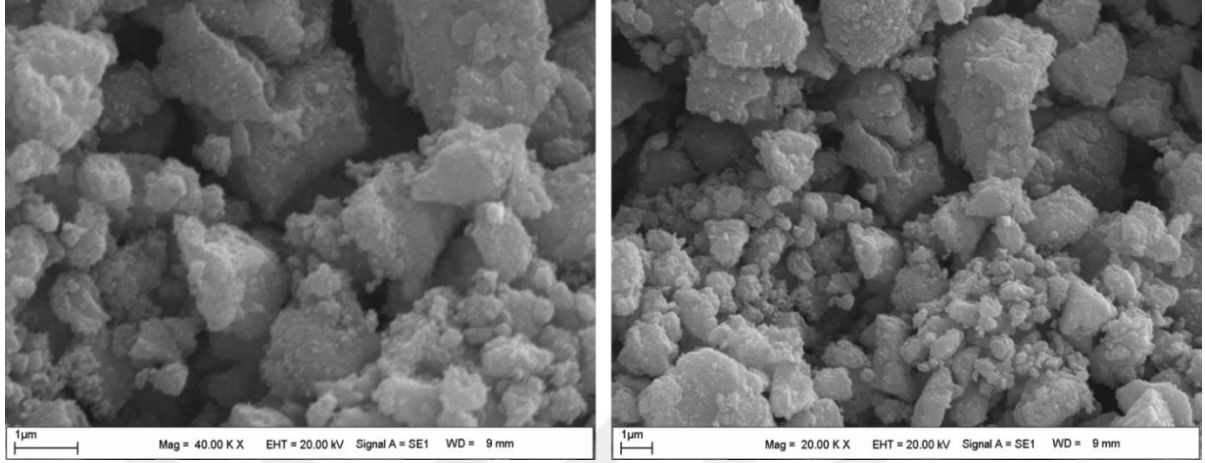


Şekil 5.13 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ nanopartiküllerinin EDAX spektrumları



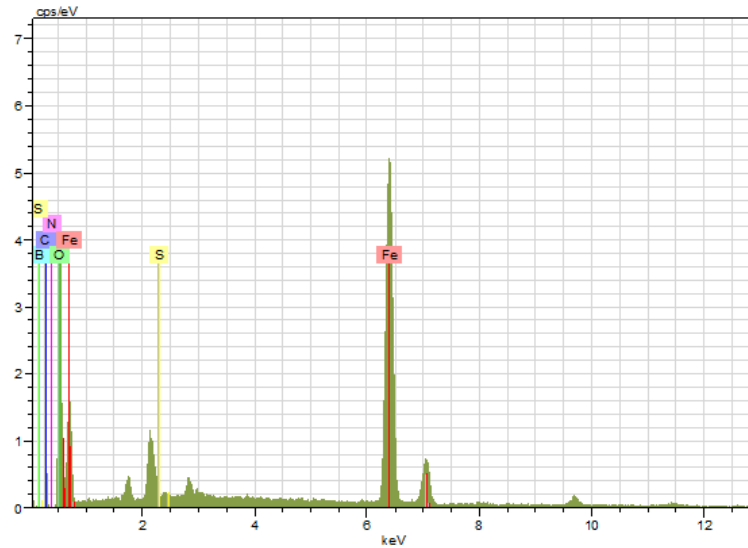
Şekil 5.14 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ nanopartiküllerinin EDAX- elementel haritalama görüntüleri

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ nanopartiküllerinin morfolojik analizi SEM ile karakterize edilmiştir. Şekil 5.15 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın SEM görüntülerini göstermektedir. Elde edilen SEM görüntüleri, yüzeyi modifiye edilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ nanopartiküllerinin morfolojik özelliklerini koruduğunu göstermektedir.

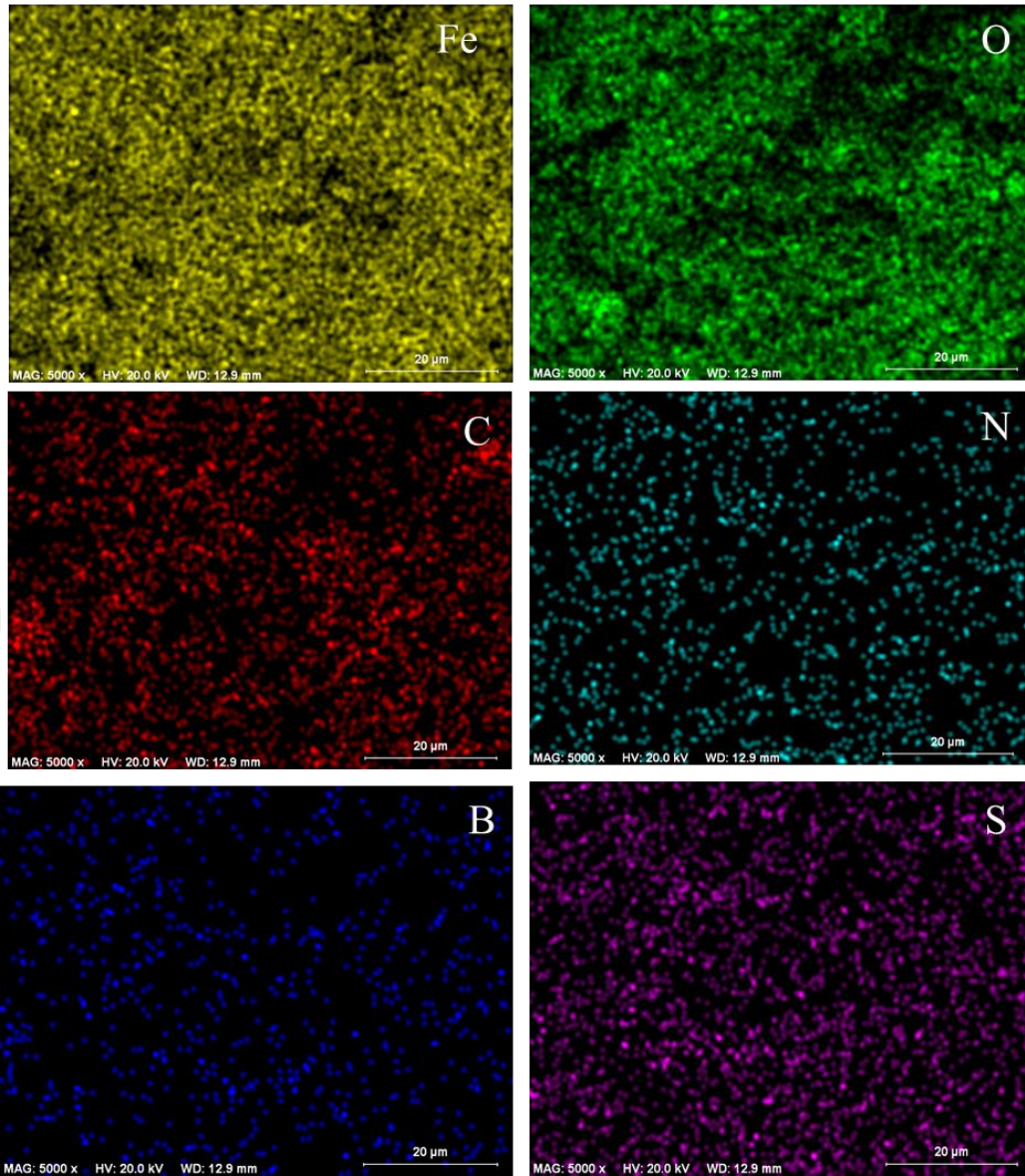


Şekil 5.15 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ nanopartiküllerinin SEM görüntüleri

Şekil 5.16'da $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ nanopartiküllerinin elementel bileşimi gösterilmektedir. Önceki modifikasyonlara bağlı olarak Fe, O, C, N, Si ve B elementleri görülmüştür. Yapıdaki N ve S elementlerinin varlığı L-ASNaz bağlanmasının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. EDAX-haritalama sonuçları da bunu kanıtlamaktadır (Şekil 5.14).



Şekil 5.16 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ nanopartiküllerinin EDAX spektrumları



Şekil 5.17 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-LASNa}$ nanopartiküllerinin EDAX- elementel haritalama görüntüleri

5.1.4. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin partikül boyutlarının ve zeta potansiyellerinin incelenmesi

Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri DLS ile analiz edilmiştir. Zeta potansiyeli partiküller arası itme ve çekme kuvvetleri hakkında bilgi sağlaması nedeniyle önemlidir. Fe_3O_4 nanopartikülleri için zeta potansiyeli değeri -30,53 mV olarak bulunmuştur. Yüzey APTMS ile modifiye edildikten sonra NH grupları nanopartiküllere pozitif yük kazandırmıştır. 4VPBA bağlandıktan sonra teke -23,91 mV'ye düştüğü gözlemlenmiştir. Son olarak PEG modifikasyonundan sonra nanopartikül

yükünün -26,23 mV olduğu bulunmuştur. Zeta potansiyeli değerlerinin fonksiyonel grupların ve yüzey modifikasyonlarının değişmesi ile değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. Aşağıda verilmiş olan sonuçlardan da anlaşılabileceği üzere yüzey modifikasyonları başarılı bir şekilde sağlanmıştır. Hidrodinamik çap ise modifikasyon basamağı ile orantılı olarak artış göstermiştir. Bunun nedeni olarak NH₂ ile fonksiyonelleştirme işlemi ve 4VPBA ile fonksiyonelleştirme işlemi sonrasında amino ve hidroksil gruplarının etkileşimlerinin artması olduğu düşünülebilir. Ayrıca PEG modifiye edilmesinden sonra partikül boyutunun artması PEG'in molekül yapısı ile ilişkilidir. Son olarak enzim molekülleri immobilize edildikten sonra partikül boyutunda literatürle uyum içerisinde bir artış gözlenmiştir. Bu analizlere ait sonuçlar Çizelge 5.1'de gösterilmektedir. **Jiang ve diğ. (2016)** Fe₃O₄-SiO₂-NH-NH₂ nanopartikülleri sentezlemiş ve dokürobisin'in taşınmasında kullanmışlardır. Zeta potansiyeli sonuçlarına bakıldığında negatif yüklü olan Fe₃O₄-SiO₂ nanopartikülleri NH ile modifiye edildikten sonra pozitif yük kazanmıştır. Yapılmış olan çalışma bizim çalışmamızla bu yönde paralellik göstermiştir. Ayrıca yüzey modifikasyonları yapılmaya devam ettikçe yük miktarında değişiklik gözlenmiştir.

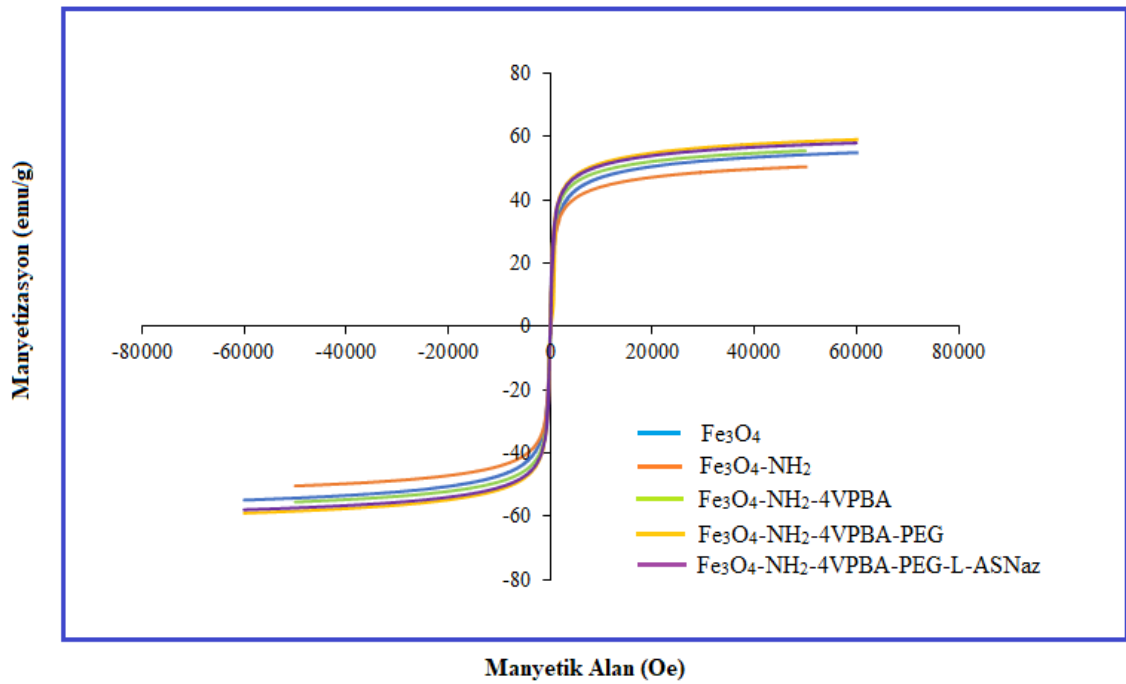
Çizelge 5.1 : Elde edilen manyetik nanopartiküllerin zeta potansiyelleri ve hidrodinamik çapları

Nanopartikül	Zeta Potansiyeli (mV)	Hidrodinamik Çap (nm)
Fe ₃ O ₄	-30,53 ± 1,28	79,37 ± 11,64
Fe ₃ O ₄ -NH ₂	1,82 ± 0,05	116,82 ± 9,64
Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -4VPBA	-23,91 ± 0,37	317,37 ± 26,52
Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -4VPBA-PEG	-26,23 ± 1,19	506,94 ± 41,81
Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -4VPBA-PEG-L-ASNaz	-22,90 ± 6,50	768,62 ± 79,01

5.1.5. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin VSM karakterizasyonlarının incelenmesi

Manyetik nanopartiküllerinin manyetik özellikleri VSM ile oda sıcaklığında analiz edilmiştir. Şekil 5.18 elde edilen nanopartiküllerin manyetik VSM analizlerini göstermektedir. Fe₃O₄ nanopartikülleri için doygunluk mıknatıslanma değeri 57, Fe₃O₄-NH₂'nin 50, Fe₃O₄-NH₂-4VPBA'nin 53, Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG'in 58 ve Fe₃O₄-NH₂-

4VPBA-PEG-L-ASNaz'ın 57 emu/g manyetizasyon değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. Genel olarak yüzey modifikasyon işlemleri manyetizasyon değerlerini önemli ölçüde değiştirmemiştir. Bu yüksek doymuş mıknatıslanma değerleri partiküllerinin manyetik alanda hızlı ve kolay bir şekilde reaksiyon ortamından ayrılmasını sağlamaktadır. Ayrıca, mıknatıslanmada histerezis görülmemiştir bu da manyetik nanopartiküllerinin süperparamanyetik olduğunu kanıtlamaktadır (Ateş ve diğ, 2018). **Alemi-Tameh ve diğ. (2016)** sentezledikleri $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-SO}_3\text{H}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2$ nanopartiküllerinin VSM karakterizasyonları incelendiğinde yüzey modifikasyonları ile beraber manyetizasyon değerlerinin düştüğü gözlenmektedir.



Şekil 5.18 : Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin VSM karakterizasyonu

5.2. Sentezlenen Manyetik Nanopartiküllerin Biyokimyasal Sonuçlarının İncelenmesi

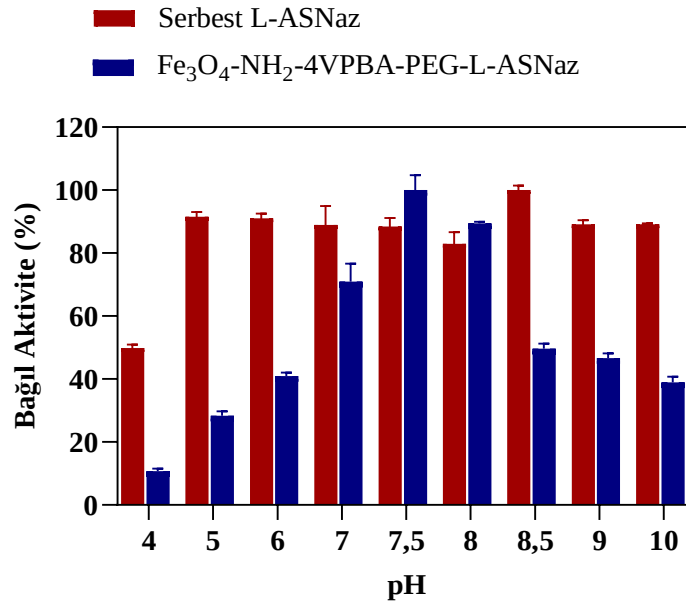
5.2.1. İmmobilizasyon verimi ve aktivite verimi

Enzimin immobilizasyonunu gerçekleştirmek için optimum enzim ünite miktarının tespiti oldukça önemlidir. Bu nedenle aşamasında 200 µl enzim 0,1 g nanopartikül üzerine eklenerek +4 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra yukarıda verilmiş olan

denklemeler kullanılarak İ.V ve A.V gibi parameteler belirlenmiştir. İ.V %94 , A.V %71 olarak hesaplanmıştır. Burada İ.V enzim moleküllerinin ne kadarlık bir kısmının taşıyıcı matrikse bağlandığı hakkında bilgi vermektedir. Yine aynı şekilde A.V süpernatanda kalan enzim miktarının ölçülmesiyle belirlenir ne kadar düşük aktivite sergilerse süpernatandadaki enzim miktarı da o kadar düşüktür. **Ulu ve diğ. (2018)**, yaptıkları çalışmada Fe_3O_4 -MCM-41-Cl nanopartiküllerine L-ASNaz immobilize etmiş ve %63 İ.V gözlemlemiştir. Yaptığımız çalışma ve literatür sonuçlarına dayanarak immobilizasyon veriminin, taşıyıcı matriks ve enzim molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimlerinden kaynaklandığını düşünebiliriz.

5.2.2. Optimum pH değerinin belirlenmesi

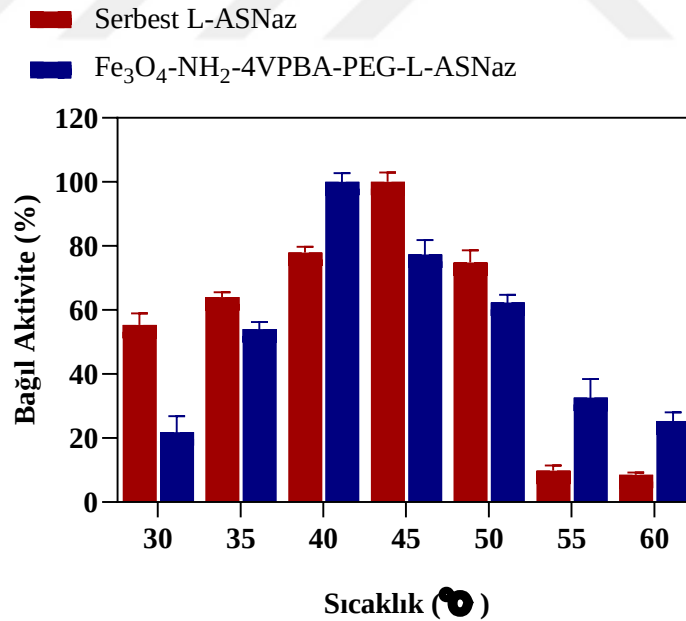
Bu deney aşamasında serbest L-ASNaz ve Fe_3O_4 -NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz nanopartiküllerinin optimum aktivite gösterdiği pH değeri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu deneye ait sonuçlar aşağıda verilmiş olan Şekil 5.19’da gösterilmektedir. Şekil 5.19’dan da görüleceği üzere serbest L-ASNaz için pH:8,5 olarak bulunurken, Fe_3O_4 -NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz için optimum pH değeri 7,5 olarak bulunmuştur. Optimum pH değerindeki bu kaymanın, enzim ile immobilize edilen taşıyıcı matris arasındaki hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler gibi etmenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Ateş ve diğ, 2018).



Şekil 5.19 : Serbest L-ASNaz ve Fe_3O_4 -NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz’ın optimum pH değeri

5.2.3. Optimum sıcaklık değerin belirlenmesi

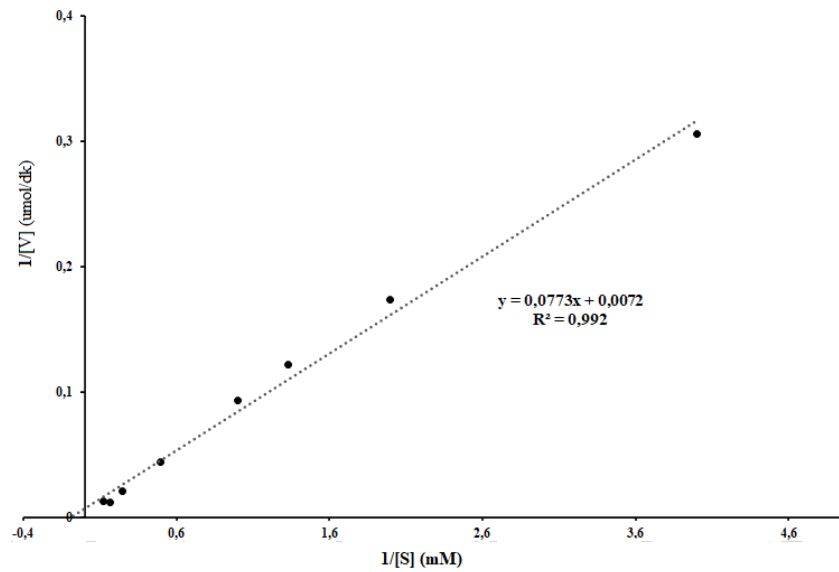
Burada serbest L-ASNaz ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın aktiviteleri üzerinde sıcaklığın incelemesi ve optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu sebeple her iki enzim kendi optimum pH değerlerinde hazırlanmış substratlar eklenerek 30-35-40-45-50-55-60 °C gibi farklı sıcaklıklarda, 15 dk boyunca inkübe edilmiştir. Yapılan deneye ait sonuçlar Şekil 5.20'de gösterilmektedir. Verilmiş olan sonuçlardan da anlaşılacağı üzere serbest L-ASNaz için optimum sıcaklık değeri 45 °C olarak bulunurken, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ için bu değer 40 °C olarak bulunmuştur. Ayrıca serbest L-ASNaz yüksek sıcaklıklarda aktivitesini tamamen kaybederken $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın aktivitesinin %30'luk bir bölümünü koruduğu gözlenmektedir. Sıcaklık değişimi üzerindeki bu etkinin immobilizasyon işleminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Immobilizasyon işlemi genellikle enzimleri yüksek sıcaklıklarda bile denatürasyondan koruyarak, serbest formlarına kıyasla daha iyi aktivite göstermelerini sağlamaktadır. Bu immobilizasyon işleminin en önemli avantajlarından biridir (Ulu ve diğ., 2019). Ayrıca immobilizasyondan sonra gözlenen sıcaklık değerindeki kaymanın taşıyıcı matriksin özellikleri ve taşıyıcı matriksle enzim arası etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.



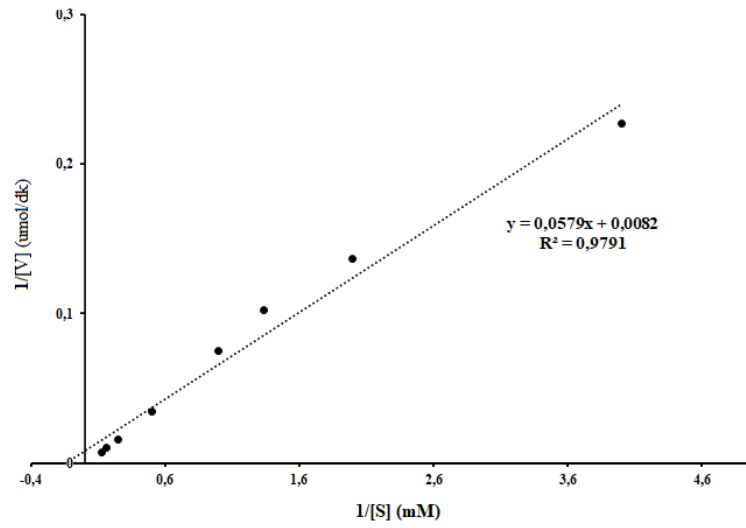
Şekil 5.20 : Serbest L-ASNaz ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın optimum sıcaklık değerlerinin belirlenmesi

5.2.4. Kinetik parametrelerin belirlenmesi

Önceki bölümlerde de belirttiğimiz üzere serbest L-ASNaz ve Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz'ın kinetik parametrelerinin belirlemek için farklı derişimlerde substart çözeltileriyle çalışılmıştır. Daha sonra Lineweaver-Burk denklemi kullanılarak kinetik parametreler belirlenmiştir. Kinetik parametre değerleri olan Km değeri enzim substrata olan ilgisi hakkında bilgi vermektedir. Km değerinin düşük olması demek enzimin substrata karşı yüksek affinite göstermesi anlamına gelmektedir. Vmax'da reaksiyonun gerçekleşme hızı hakkında bilgi vermektedir. Yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar Şekil 5.21 (A) ve (B)'de gösterilmekle beraber Çizelge 2'de de sunulmuştur. Serbest L-ASNaz ve Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz için Km değerleri sırasıyla 10,736 ve 7,06 mM olarak bulunmuştur. Vmax değerleri serbest enzim ve Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz için ise 138,88 ve 121,95 µmol/dk olarak bulunmuştur. Km'de gözlenen düşüş, immobilizasyon işleminden sonra enzimin substrata olan affinitesinin arttığı şeklinde yorumlanabilir. Vmax'da gözlenen düşüşün ise, immobilizasyon işleminden sonra substratın difuzyonunun yüzey modifikasyonları nedeniyle sınırlandırılmasından kaynaklandığı düşünülebilir.



Şekil 5.21 (A) : Serbest L-ASNaz için Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 5.21 (B) : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın Lineweaver-Burk grafiği

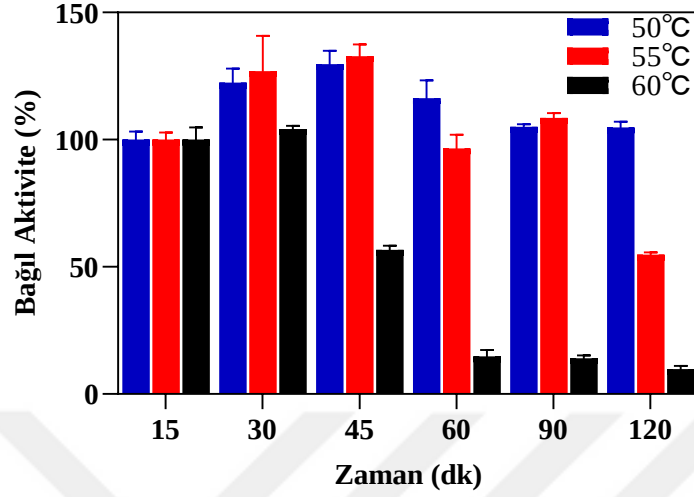
Çizelge 5.2: Serbest L-ASNaz ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın kinetik parametreleri

Enzim	K_m (mM)	$V_{max}(\mu\text{mol/dk})$	R^2
Serbest L-ASNaz	$10,37 \pm 0,57$	$138,88 \pm 2,64$	0,9920
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$	$7,06 \pm 0,29$	$121,95 \pm 1,070$	0,9791

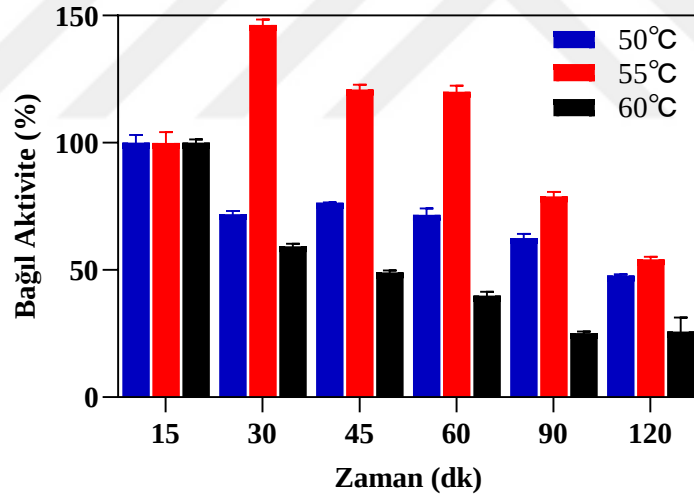
5.2.5. Termal kararlılığının belirlenmesi

Önceden bahsedildiği üzere termal stabilite iki enzim formu için 15-120 dk aralığında farklı sıcaklarla incelenmiştir. Yapılmış olan deneye ait sonuçlar Şekil 5.22 A ve B'de gösterilmektedir. Sonuçlardan görüldüğü üzere her iki enzim de 50 ve 55 °C'de termal kararlılık göstermiştir. Ancak 60 °C gibi yüksek bir sıcaklığa gelindiğinde $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ başlangıç aktivitesinin %25'lik bir bölümünü korurken serbest L-ASNaz %9'luk bir kısmını koruyabilmiştir. Enzimler protein yapılı olması nedeniyle bir süre sonra yüksek sıcaklıklarda denatüre olurlar. Denatürasyon gerçekleştiğinden dolayı da aktivite gözlenemez. İmmobilizasyon işlemi genellikle enzimleri çevre koşullarına daha

dayanıklı hale getirmektedir. İmmobilize enzimler, serbest enzimlere göre genellikle yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklılık gösterirler.



Şekil 5.22 (A) : Serbest L-ASNaz'ın termal kararlılığının belirlenmesi

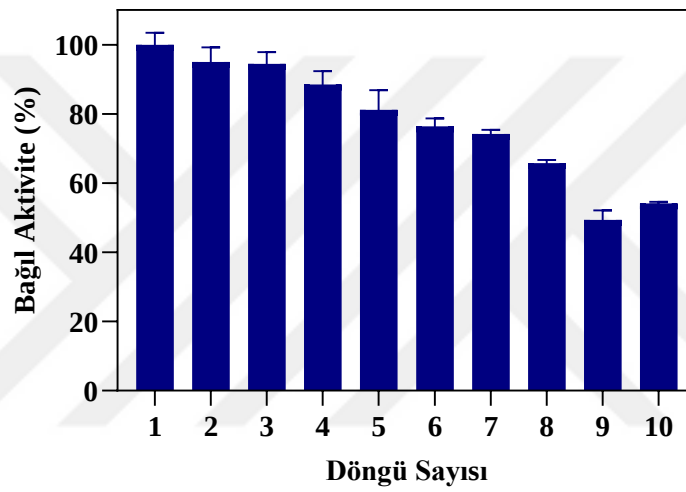


Şekil 5.22 (B) : Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz'ın termal kararlılığı

5.2.6. Yeniden kullanılabilirlik

Bu deney aşamasında Fe₃O₄-NH₂-4-VPBA-PEG-L-ASNaz'ın yeniden kullanılabilirliği incelenmiştir. Yaptığımız bu çalışmaya ait sonuçlar Şekil 5.23'te gösterilmektedir. Sonuçlardan da görülebileceği gibi immobilize enzim 10. kullanımda bile başlangıç aktivitesinin yaklaşık %54'ünü korumaktadır. Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak yeniden kullanılabilirliğin immobilize enzimleri serbest enzimlere kıyasla daha

avantajlı hale getiren en önemli parametrelerden biri olduğunu söyleyebiliriz. Serbest enzimler sadece bir kez kullanılırken, immobilize enzimler reaksiyon ortamından kolayca ayrıştırılarak defalarca kez kullanılabilirler. Aslında $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4-VPBA-PEG-L-ASNaz}$ manyetik özelliği nedeniyle reaksiyon ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilir ve tekrar tekrar kullanılabilir de denilebilir. Serbest enzimlerde ise enzim reaksiyon ortamından uzaklaştırılmaz ve bir kez kullanıldıktan sonra denatüre olarak aktivitelerini kaybederler. Bunların yanı sıra yeniden kullanılabilirliği immobilize enzimlere maliyetleri düşürme, hatta ilaç olarak kullanılabilen enzim formlarının yan etkilerinin azaltılması gibi avantajlar da sağladığı bilinmektedir (Ulu ve diğ., 2018).

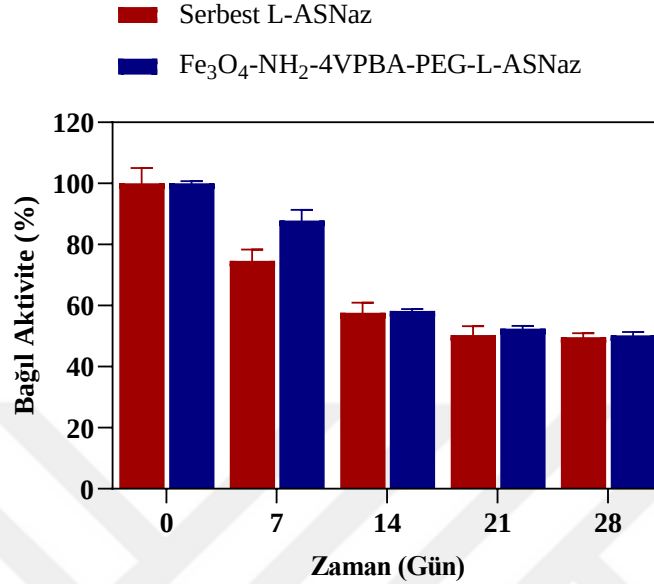


Şekil 5.23 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın yeniden kullanılabilirliği

5.2.7. Depolama kararlılığının belirlenmesi

Serbest L-ASNaz ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın depolama kararlılıklarının belirlenmesi için her iki enzimde 25 °C oda koşullarında 28 gün süreyle saklanmıştır. Daha sonra belirlenen günlerde düzenli periyotlarla her iki enzim formunun aktiviteleri ölçülüp 28 gün sonunda sonunda başlangıç aktiviteleri ile kıyaslanmıştır. Bu deneye ait sonuçlar Şekil 5.24'te gösterilmektedir. Şekil 5.24'ten de görüldüğü üzere serbest L-ASNaz zamanla daha kararlı bir düşüme eğilimi göstermiştir Bunun nedeni olarak serbest enzimleri sıcaklık, pH gibi çevresel etmenlerden kolaylıkla etkilenebilmeleri söylenilebilir. Şöyle de diyebiliriz ki; enzimler protein yapılı moleküller olduklarında ani çevresel faktörlerin değişimine adapte olamayıp denatüre olabilirler. Fakat immobilize enzimler daha güçlü bir konformasyonel duruma sahip olmaları ve taşıyıcı matriks ile güçlü etkileşimleri sayesinde serbest enzimlere

kıyasla genellikle çevresel koşullara daha iyi adapte olurlar (Noma ve diğ, 2020). Bu immobilizasyon işleminin, enzimlerin uzun süreler boyunca aktivite kayıplarını en aza indirerek saklanması/depolanması için sağladığı önemli bir avantajdır.

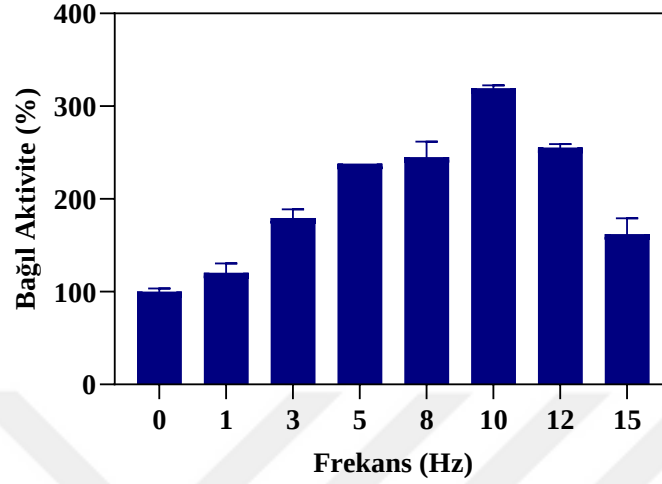


Şekil 5.24 : Serbest L-ASNaz ve Fe₃O₄-NH₂-4VPBA-PEG-L-ASNaz'ın depolama kararlılığı

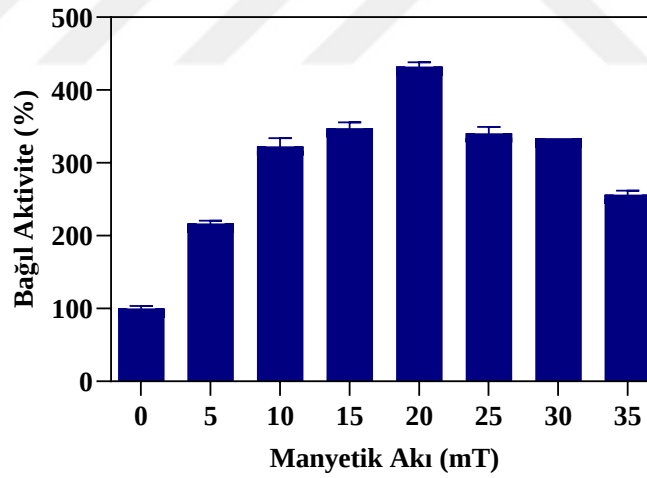
5.2.8. Manyetik alan etkisi

Enzim aktivitelerinin NIR, ultrasonik alan, elektrik alan ve manyetik alan gibi bir harici bir kuvvetle arttırılmasına yönelik literatürde çalışmalar mevcuttur. Yapmış olduğumuz çalışmada manyetik alanın enzim aktivitesini nasıl etkilediği incellenmiştir. Bu deney aşamasında ilk olarak optimum frekans değeri belirlenmiştir (Şekil 5.25). Şekil 5.25'ten de görüldüğü üzere 10 Hz'e kadar artan manyetik alanla birlikte enzim aktivitesinde artış gözlenmiş ve 10 Hz'de aktivite manyetik alan olamayan kontrole göre 3,2 kat artarak maksimuma ulaşmıştır. Bununla birlikte manyetik akı yoğunluğunun genellikle 20 mT kadar artış gösterdiği ve 20 mT manyetik akı uygulanmayan kontrole göre aktivitenin yaklaşık 4,3 kat arttığı gözlemlenmiştir. Bu deneye ait sonuçlar Şekil 5.26'da gösterilmektedir. Fakat akı yoğunlu giderek arttıkça enzim aktivitesinde kayıplar gözlenmiştir. Manyetik alanın enzim aktivitesi üzerindeki bu etkilerini değerlendirecek olursak, enzim aktivitesinin arttırmasının sebebi olarak manyetik alanın nanopartikülleri hareket ettirerek substratla etkileşime daha hızlı girmesini sağlaması ve yine manyetik alanın etkisi sayesinde nanopartiküllerin çökme eğiliminin önüne geçilmesi olduğunu söyleyebiliriz (Ateş ve diğ, 2018).. Biyogörüntüleme ajanı olarak kullanılan manyetik

malzemelerle (MRI), çalışmamızda elde ettiğimiz malzeme karşılaştırıldığında daha düşük bir manyetik alana ihtiyaç duyması nedeniyle manyetik alanın zararlı etkilerinin en az indirilebileceğini söyleyebiliriz.



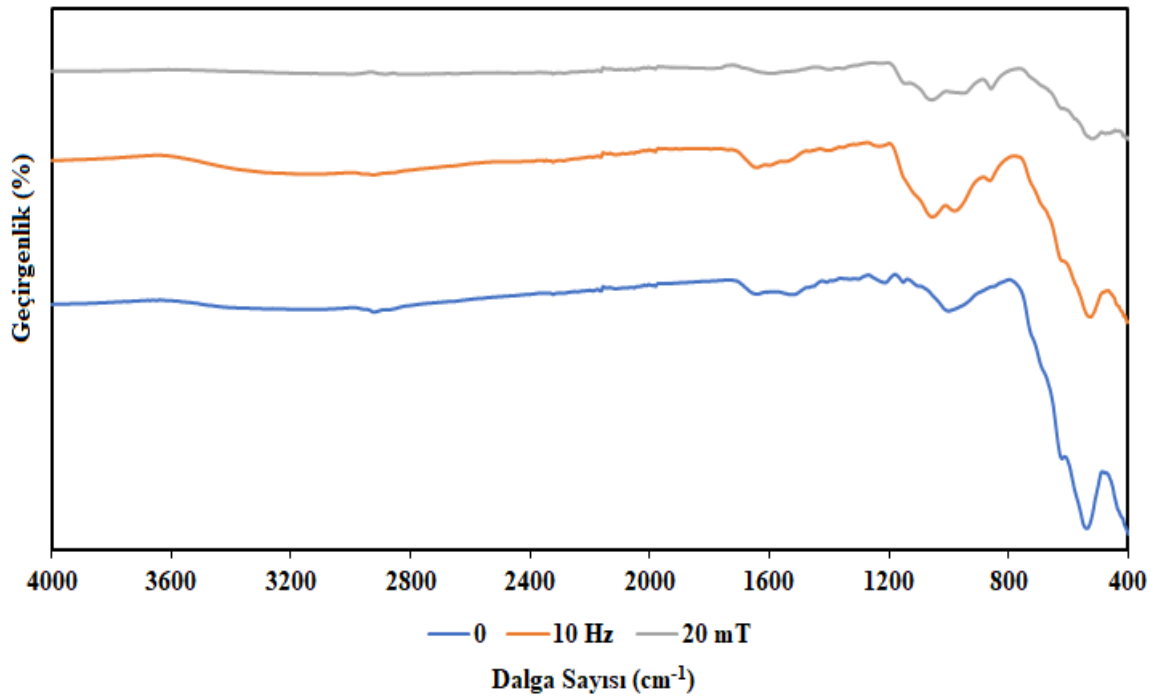
Şekil 5.25 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ için uygulanacak olan optimum frekans değerinin belirlenmesi



Şekil 5.26 : $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ için uygulanacak olan optimum frekans değerinin belirlenmesi

Aşağıda verilmiş olan Şekil 5.27’de manyetik alan uygulanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ ’ın optimum aktivite gösterdiği değerlerden sonraki moleküler arası etkileşimleri FTIR ile incelenmiştir. Şekilden de görülebileceği üzere herhangi bir manyetik alan uygulanmayan örnekte N-H bağlarına ait pikler 1100 cm^{-1} ’de gözlenmiştir. Daha sonrasında 10 Hz bir manyetik alan uygulandığında bu pik değerinde hafif bir kayma olduğu

gözlenmiştir. 20 mT manyetik akı uygulandığında ise bu pik değerlerinin şiddetlerinin düştüğü ve manyetik alana bağlı olarak titreşim gösterdiği açıkça gözlenmektedir. Yine benzer olarak 1296 cm^{-1} 'de gözlenen C-O bandı uygulanan manyetik güç ve akıya bağlı olarak giderek kaybolmuştur. Bunlara ek olarak 3400 cm^{-1} 'de gözlenen O-H bandının da manyetik alan uygulanmasıyla beraber değiştiği gözlenmiştir. Bunlardan yola çıkarak manyetik alan uygulanmasının moleküler arası etkileşimleri önemli ölçüde etkileyerek, enzim aktivitesinin artmasına neden olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 27. Manyetik alan uygulanan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ nanopartiküllerinin FTIR karakterizasyonları

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

L-ASNaz, başta ALL olmak üzere farklı kanser türlerinin tedavisinde rol oynayan önemli bir enzimdir. Normal hücreler L-asparajin amino asidini sentezleyebilirken, kanser hücreleri bu amino asidi sentezleyememektedir. Bu nedenle kandaki L-asparajini kullanırlar. L-ASNaz kandaki L-asparajini süpürerek kanser hücrelerinin gelişmesi için gerekli besini ortadan kaldırır. Ancak L-ASNaz'ın ilaç olarak kullanılan formlarının bakteriyel kaynaklardan izole edilmesi bazı yan etkilere neden olmaktadır. Bu durumun önünü geçebilmek için L-asparajinaz'ın PEG'li formları geliştirilmiştir. Ancak bu tek başına yeterli değildir. Son yıllarda enzim immobilizasyonu için çeşitli taşıyıcı matriksler geliştirilmektedir. Uygun taşıyıcı matriks sayesinde enzimler daha biyoyumlu hale gelebilir, yarılanma ömrü uzar, aktiviteleri iyileştirilebilir ve hatta dışardan bir harici kuvvet ile aktivileri arttırılabilir. Bundan yola çıkarak yaptığımız çalışmada enzim immobilizasyonu için taşıyıcı matriks olarak suda çözünebilir fonksiyonel boronik asit türevli manyetik nanopartiküller sentezlenmiş, yapısal ve morfolojik özellikleri FTIR, XRD, SEM, EDAX, VSM ve DLS ile karakterize edilmiştir. Daha sonra optimum pH, optimum sıcaklık, kinetik parametreleri (K_m , V_{max}), termal kararlılık, depolama kapasitesi, yeniden kullanılabilirlik, ve manyetik alanın aktivite üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

Manyetik nanopartiküllerin L-ASNaz immobilizasyonu için hazır hale gelmesi dört aşamada gerçekleşmiştir. İlk olarak Fe_3O_4 nanopartikülleri sentezlenmiştir. Daha sonra Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyi APTMS ile modifiye edilmiş ardından da 4VPBA ile fonksiyonelleştirilmiştir. Son olarak PEG ile kaplanarak immobilizasyona hazır taşıyıcı matriks haline getirilmiştir. Gerçekleştirilen her adımın FTIR, XRD, DLS, VSM, SEM, EDAX karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. FTIR analizi için Fe_3O_4 karakteristik bandını 540 cm^{-1} 'de göstermektedir. Ayrıca diğer bantlar; 2933 cm^{-1} 'de C-H titreşim bandı, 1583 cm^{-1} 'de C-C germe titreşimi, 1135 cm^{-1} 'de esterik C-O bandı ve 1126 cm^{-1} 'de Si-O bandı olarak sıralanmaktadır (Karimzadeh ve diğ., 2017). Boronik asit varlığına dair pik ise 1600 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Son olarak L-ASNA-az immobilize edildikten sonra karakterize edilen örnekte amid piklerinin gözlenmesi enzim immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğinin göstergesidir. Sentezlenen her malzemenin XRD spektrumları ayrı ayrı incelenmiştir. Analizler sonucunda modifikasyon işlemlerinin nanopartiküllerin kristalin özellikleri üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir (Gong ve Lin, 2003; Liao ve Chen, 2001). Sentezlenen malzemelerin morfolojik özellikleri SEM ile karakterize edilmiştir. İlk olarak Fe_3O_4 'e ait SEM görüntülerini incelediğimizde homojen olmayan bir yapı ve aglomerasyon olduğunu görmekteyiz. Bunun nedeninin manyetik nanopartiküllerin

doğası gereği bir süresi sonra toplanıp çökme eğilimi olduğunu söyleyebiliriz. Sonra $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ 'in SEM karakterizasyonlarını incelediğimizde bu topaklanma eğiliminin daha az olduğunu görmekteyiz. Daha önce de belirttiğimiz gibi manyetik nanopartiküllerin toplanıp çökme eğiliminin önüne geçebilmek için nanopartiküllerin dış kısmı uygun bir polimerle kaplanır. Burdan yola çıkarak şöyle diyebiliriz ki, yapılan fonksiyonelleştirme işlemleri ve PEG ile modifikasyon başarılı bir şekilde gerçekleşmiş ve topaklanma eğiliminin azalmasını sağlamıştır. EDAX karakterizasyonları incelendiğinde her modifikasyon işleminden sonra, ilgili elementler haritalama yoluyla tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin hidrodinamik çapları ölçülmüş, Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-LASNa}$ 'ın sırasıyla 79,37, 116,82, 317,37, 506,94 ve 768,62 nm olarak bulunmuştur. Burdan yola çıkarak şunu söyleyebiliriz yapılan yüzey modifikasyonları hidrodinamik çapın artmasına neden olmuştur. VSM analizine gelecek olursak modifikasyon işleminin artmasıyla manyetizasyon değerinin azalması doğrudan ilişkilidir.

Çalışmaların devamında hem serbest enzim için hem de immobilize enzim için optimum pH değeri belirlenmiştir. Serbest L-ASNaz için optimum pH değeri 8,5 olarak bulunurken $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ için bu değer 7,5 olarak tespit edilmiştir. pH değerindeki bu kaymanın enzim ile taşıyıcı matriks arasında gerçekleşen ikincil etkileşimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. **Ulu ve diğ. (2018)**, yaptıkları çalışmada L-ASNaz immobilizasyonu için taşıyıcı matriks olarak $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MCM-41}$ sentezlemiştir. Yaptıkları çalışmada serbest L-ASNaz için optimum pH değeri 8,5 bulunurken immobilize enzim için bu değer 7,5'e bir kayma göstermiştir. Bu aşamadan sonra her iki enzim formu içinde optimum sıcaklık değeri belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda serbest L-ASNaz için optimum sıcaklık değeri 45 °C bulunurken, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ için ise bu değer 40 °C olarak bulunmuştur. Gözlenen bu sıcaklık değeri kaymasına benzer sonuçlar literatürde de mevcuttur. **Ulu ve diğ. (2018)**, yaptıkları aynı çalışmada serbest L-ASNaz için optimum sıcaklık değerini 50 °C olarak bulurken, immobilize L-ASNaz için bu değer 45 °C'ye bir kayma göstermiştir. Burdan yola çıkarak yaptığımız optimum sıcaklık ve optimum pH çalışmalarının literatürle uyum içerisinde olduğunu söyleyebiliriz.

Enzim aktivitesi deneylerinde K_m enzimin substrata olan affinitesini ifade eder. V_{max} ise reaksiyonun gerçekleşme hızını ifade eder. K_m değeri ne kadar düşük olursa enzimin substrata karşı o kadar yüksek ilgisi olduğunu düşünebiliriz. Yaptığımız çalışmada serbest L-ASNaz için K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 10,736 mM ve 138,88 $\mu\text{mol/dk}$ olarak bulunmuştur. $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ için K_m ve V_{max} değerleri ise 7,06

mMve 121,95 μ mol/dk olarak bulunmuştur. Yapılmış olan çalışmaya ait benzer sonuçlar literatürde mevcuttur.

İmmobilizasyon işleminden sonra enzimler genellikle olumsuz çevre koşullarında daha dayanıklı hale gelirler. Yaptığımız çalışmada serbest L-ASNaz ve $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ 'ın belirli sıcaklıklarda yaklaşık 15-120 dk arasında inkübe edilerek termal kararlılıkları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 60 °C gibi yüksek bir sıcaklıkta serbest L-ASNaz aktivitesinin neredeyse tamamını kaybederken, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ serbest L-ASNaz'a kıyasla aktivitesini önemli ölçüde korumuştur. **Ateş ve diğ. (2018)**, Fe_3O_4 -kitosan nanopartiküllerine L-ASNaz immobilize etmişlerdir. Immobilize edilen enzimin termal kararlılığını incelediğimizde inkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra, serbest enzim zamanla başlangıç aktivitesinin tamamını kaybederken immobilize enzim başlangıç aktivitesinin neredeyse %54'ünü korumuştur. Gözlenen bu sonuçlar yaptığımız çalışmanın literatür ile uyum içinde olduğunun bir kanıtıdır.

Enzimlerin depolama kararlılığı immobilize ve serbest enzimler arasında farklılık göstermektedir. Yaptığımız çalışmada immobilize enzimin başlangıç aktivitesinde zamanla daha kararlı bir düşüş gözlenirken serbest enzimin aktivitesinde immobilizeye kıyasla daha hızlı bir düşüş vardır. Bu immobilizasyon işleminin en önemli avantajlarından biridir. **Noma ve diğ. (2020)**, yaptıkları çalışmada L-ASNaz immobilizasyonu için amino ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{COOH}$) ve karboksil $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{COOH}$ nanopartiküllerin etkili olup olmadığını incelemişlerdir. Depolama kararlılığı deneyleri 4 °C'de gerçekleşmiş ve serbest enzim başlangıç aktivitesinin %30'unu korurken aynı koşullar altında $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{NH}_2$ ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{COOH}$ başlangıç aktivitelerinin sırasıyla %78,9 ve %56,5'inden fazlasını korumuştur.

İmmobilize enzimleri serbest enzimlerden ayıran en önemli farklardan biri immobilize enzimlerin reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılarak tekrar tekrar kullanılabilmesidir. Yaptığımız çalışmada $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG-L-ASNaz}$ kendi optimum koşullarında 10 tekrarlı kullanılmıştır ve başlangıç aktivitesinin %50'sinden fazlasını koruduğu gözlenmiştir. **Noma ve diğ. (2020)**, yaptıkları çalışmada L-ASNaz'ı tannik asitle modifiye edilen mezo gözenekli manyetik nanopartiküller üzerine immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin yeniden kullanılabilirlik testlerini incelediğimizde 16 kullanım döngüsünden sonra bile başlangıç aktivitesinin %70'ini koruduğunu görmekteyiz. Gözlemlediğimiz bu sonuçlar yaptığımız çalışmanın literatür ile uyum içinde olduğunu göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada dikkat çekici en önemli parametre ise enzim aktivitesinin manyetik alan etkisi ile iyileştirilmesidir. Literatürde enzim aktivitesini iyileştirmeye yönelik elektrik alan, NIR, ultrasonik alan, manyetik alan gibi farklı indükleme teknikleri vardır. Bizim çalışma presibimizin temelini oluşturan manyetik alanla indükleme deneyleri frekans ve akı olmak üzere farklı parametreler çalışılarak incelenmiştir. Manyetik alan enzim aktivitesi 10 Hz gibi bir frekans değerinde uygulanmayan enzim aktivitesine kıyasla yaklaşık 3,2 kat, manyetik akı yoğunluğu ise 20 mT olduğunda yaklaşık 4,3 kat artışı gözlenmiştir. Ayrıca yüksek frekans yoğunluğu ve akı yoğunluğunun enzim aktivitesini olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak akı yoğunluğunun ve frekans yoğunluğunun moleküler arası bağlara etkileri FTIR kullanılarak incelenmiştir. Literatürde manyetik alanla enzim aktivitesinin artırılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur. **Ateş ve diğ. (2018)** yaptıkları çalışmada Fe_3O_4 -kitosan nanopartikülleri sentezleyerek L-ASNaz immobilizasyonunda kullanmışlardır. Sentezlenen bu malzemenin FTIR, XRD, DLS, SEM, VSM gibi analizleri gerçekleştirilmiştir. Manyetik alanın enzim aktivitesi üzerinde etkisinin incelenmesi için farklı akı ve frekans değerleri test edilmiştir. Fe_3O_4 -kitosan nanopartiküllerinin manyetik alan etkisiyle 3 Hz kontrole kıyasla %175 artmıştır. 30 mT’da ise aktivitenin %300 artışı gözlenmiştir.

Sonuç olarak Fe_3O_4 nanopartikülleri başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve modifiye edilmiştir. En son modifikasyon ürünü olan $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2\text{-4VPBA-PEG}$ ’lere L-ASNaz başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. Elde ettiğimiz bu nanotaşıyıcı sistem L-ASNaz’ın kinetik parametrelerini iyileştirdiği gözlenmiştir. Ayrıca manyetik alanla indüksiyonuyla enzim aktivitesinin iyileştiği de belirlenmiştir. Bu çalışmanın L-ASNaz immobilizasyonu için yeni farklı bir bakış açısı sunduğunu, enzim indükleme yöntemleri bakımından sayılı çalışmalardan olduğunu ayrıca endüstriyel ve klinik uygulamalar için alternatif bir bakış açısı sunduğunu söyleyebiliriz. Bu sebeplerle yaptığımız çalışma oldukça önem arz etmektedir.

KAYNAKÇA

- Abbasi, E., Aval, S., Akbarzadeh, A., Milani, M., Nasrabadi, H. T., Joo, S. W., ... & Pashaei-Asl, R. (2014). Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Res Lett* 9: 247.
- Abuchowski, A., Van Es, T., Palczuk, N. C., McCoy, J. R., & Davis, F. F. (1979). Treatment of L5178Y tumor-bearing BDF1 mice with a nonimmunogenic L-glutaminase-L-asparaginase. *Cancer Treat Rep*, 63(6), 1127-1132.
- Afaq, S., & Iqbal, J. (2001). Immobilization and stabilization of papain on chelating sepharose: a metal chelate regenerable carrier. *Electronic Journal of Biotechnology*, 4(3), 1-2.
- Alam, S., Pranaw, K., Tiwari, R., & Khare, S. K. (2019). Recent development in the uses of asparaginase as food enzyme. In *Green Bio-Processes* (pp. 55-81). Springer, Singapore.
- Alemi-Tameh, F., Safaei-Ghomi, J., Mahmoudi-Hashemi, M., & Teymuri, R. (2016). A comparative study on the catalytic activity of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-SO}_3\text{H}$ and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ nanoparticles for the synthesis of spiro [chromeno [2,3-c] pyrazole-4, 3'-indoline]-diones under mild conditions. *Research on Chemical Intermediates*, 42(7), 6391-6406.
- Ali, U., Naveed, M., Ullah, A., Ali, K., Shah, S. A., Fahad, S., & Mumtaz, A. S. (2016). L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. *European journal of pharmacology*, 771, 199-210.
- Ashworth, L. A., & MacLennan, A. P. (1974). Comparison of the L-asparaginases from *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora* as immunosuppressants. *Cancer research*, 34(6), 1353-1359.
- Ates, B., Ulu, A., Köytepe, S., Noma, S. A. A., Kolat, V. S., & Izgi, T. (2018). Magnetic-propelled Fe_3O_4 -chitosan carriers enhance l-asparaginase catalytic activity: a promising strategy for enzyme immobilization. *RSC advances*, 8(63), 36063-36075.
- Avendano, K. A., Anguiano, M., Lopez, C. E., Montanez, L. E., Sifuentes, L., & Balagurusamy, N. (2016). Microbial enzymes applications in food processing. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 27(4), 63-67.
- Azmi, W., Narta, U. K., Singh, N., Gupta, V., Singh Kanwar, S., & Devi, S. (2017). An Antileukemic Glutaminase Free L-Asparaginase from *Bacillus brevis*. *Current Biotechnology*, 6(1), 58-68.
- Bae, Y., Nishiyama, N., & Kataoka, K. (2007). In vivo antitumor activity of the folate-conjugated pH-sensitive polymeric micelle selectively releasing adriamycin in the intracellular acidic compartments. *Bioconjugate chemistry*, 18(4), 1131-1139.
- Baghani, A. N., Mahvi, A. H., Gholami, M., Rastkari, N., & Delikhoon, M. (2016). One-Pot synthesis, characterization and adsorption studies of amine-functionalized magnetite nanoparticles for removal of Cr (VI) and Ni (II) ions from aqueous solution: Kinetic, isotherm and thermodynamic studies. *Journal of environmental health science and engineering*, 14(1), 1-12.
- Baskar, G., Chandhuru, J., Fahad, K. S., Praveen, A. S., Chamundeeswari, M., & Muthukumar, T. (2015). Anticancer activity of fungal L-asparaginase

- conjugated with zinc oxide nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(1), 43.
- Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Fernández-Lafuente, R., Huguet, J., & Guisán, J. M.** (1998). A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and bioengineering*, 58(5), 486-493.
- Bi, C., Zhang, S., Li, Y., He, X., Chen, L., & Zhang, Y.** (2018). Boronic acid-functionalized iron oxide magnetic nanoparticles via distillation–precipitation polymerization and thiol–yne click chemistry for the enrichment of glycoproteins. *New Journal of Chemistry*, 42(21), 17331-17338.
- Bilal, M., Iqbal, H. M., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X.** (2017). Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. *Journal of environmental management*, 188, 137-143.
- Bilal, M., Iqbal, H. M., Hu, H., Wang, W., & Zhang, X.** (2017). Development of horseradish peroxidase-based cross-linked enzyme aggregates and their environmental exploitation for bioremediation purposes. *Journal of environmental management*, 188, 137-143.
- Borek, D., & Jaskólski, M.** (2001). Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. *Acta Biochimica Polonica*, 48(4), 893-902.
- Brady, D., & Jordaan, J.** (2009). Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnology letters*, 31(11), 1639-1650..
- Brady, D., Jordaan, J., Simpson, C., Chetty, A., Arumugam, C., & Moolman, F. S.** (2008). Spherezymes: A novel structured self-immobilisation enzyme technology. *Bmc Biotechnology*, 8(1), 1-11.
- Broom, J. D.** (1963). Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible: for its antilymphoma effects. *07. exp. Med*, 118, 99.
- Bruneau, L., Chapman, R., & Marsolais, F.** (2006). Co-occurrence of both L-asparaginase subtypes in Arabidopsis: At3g16150 encodes a K⁺-dependent L-asparaginase. *Planta*, 224(3), 668-679.
- Butter, K., Kassapidou, K., Vroege, G. J., & Philipse, A. P.** (2005). Preparation and properties of colloidal iron dispersions. *Journal of colloid and interface science*, 287(2), 485-495.
- Cachumba, J. J. M., Antunes, F. A. F., Peres, G. F. D., Brumano, L. P., Dos Santos, J. C., & Da Silva, S. S.** (2016). Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. *brazilian journal of microbiology*, 47, 77-85.
- Campbell, H. A., Mashburn, L. T., Boyse, E. A., & Old, L. J.** (1967). Two L-asparaginases from Escherichia coli B. Their separation, purification, and antitumor activity. *Biochemistry*, 6(3), 721-730.
- Cappelletti, D., Chiarelli, L. R., Pasquetto, M. V., Stivala, S., Valentini, G., & Scotti, C.** (2008). Helicobacter pylori-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Biochemical and biophysical research communications*, 377(4), 1222-1226.
- Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M.** (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnology progress*, 22(2), 577-583.

- Chaudhary, V & Chaudhary, R (2018)** Magnetic Nanoparticles: Synthesis, functionalization and application. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, 28, 153-183
- Chen, G., Ågren, H., Ohulchanskyy, T. Y., & Prasad, P. N. (2015).** Light upconverting core-shell nanostructures: nanophotonic control for emerging applications. *Chemical Society Reviews*, 44(6), 1680-1713.
- Chen, G., Qiu, H., Prasad, P. N., & Chen, X. (2014).** Upconversion nanoparticles: design, nanochemistry, and applications in theranostics. *Chemical reviews*, 114(10), 5161-5214.
- Chen, G., Roy, I., Yang, C., & Prasad, P. N. (2016).** Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. *Chemical reviews*, 116(5), 2826-2885.
- Chen, G., Yang, C., & Prasad, P. N. (2013).** Nanophotonics and nanochemistry: controlling the excitation dynamics for frequency up-and down-conversion in lanthanide-doped nanoparticles. *Accounts of chemical research*, 46(7), 1474-1486.
- Chin, A. B., & Yaacob, I. I. (2007).** Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. *Journal of materials processing technology*, 191(1-3), 235-237.
- Cho, C., Lee, H., Chung, E., Kim, K. M., Heo, J. E., Kim, J., ... & Lee, J. H. (2007).** Molecular characterization of the soybean L-asparaginase gene induced by low temperature stress. *Molecules and cells*, 23(3), 280.
- Clementi, A. (1922).** La désamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physio logique de sa presence dans l'organisme. *Archives Internationales de Physiologie*, 19(4), 369-398.
- Corot, C., Robert, P., Idée, J. M., & Port, M. (2006).** Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), 1471-1504.
- Costa, T. R. D., Baldi, E., Figueiró, A., Colpani, G. L., Silva, L. L., Zanetti, M., ... & Fiori, M. A. (2019).** Fe₃O₄@C core-shell nanoparticles as adsorbent of ionic zinc: evaluating of the adsorptive capacity. *Materials Research*, 22.
- Das, N., Kayastha, A. M., & Malhotra, O. P. (1998).** Immobilization of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) in polyacrylamide gels and calcium alginate beads. *Biotechnology and applied biochemistry*, 27(1), 25-29.
- Das, N., Kayastha, A. M., & Malhotra, O. P. (1998).** Immobilization of urease from pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) in polyacrylamide gels and calcium alginate beads. *Biotechnology and applied biochemistry*, 27(1), 25-29.
- 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.
- Dippong, T., Cadar, O., Levei, E. A., Bibicu, I., Diamandescu, L., Leostean, C., ... & Tudoran, L. B. (2017).** Structure and magnetic properties of CoFe₂O₄/SiO₂ nanocomposites obtained by sol-gel and post annealing pathways. *Ceramics International*, 43(2), 2113-2122.
- Doğan, D., Sezer, S., Ulu, A., Köytepe, S., & Ateş, B. (2021).** Preparation and Characterization of Amino-Functionalized Zeolite/SiO₂ Materials for Trypsin–Chymotrypsin Co-immobilization. *Catalysis Letters*, 1-15
- Duval, M., Suci, S., Ferster, A., Rialland, X., Nelken, B., Lutz, P., ... & Philippe, N. (2002).** Comparison of *Escherichia coli*–asparaginase with *Erwinia*–

- asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children's Leukemia Group phase 3 trial. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 99(8), 2734-2739.
- El-Sayed, S., Fyiad, A. A., & Gamal-Eldeen, A. M.** (2012). Immobilization, properties and anti-tumor activity of L-asparaginase of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *Aust J Basic Appl Sci* 2012; 6 (3): 785, 794.
- Faraji, M., Yamini, Y., & Rezaee, M.** (2010). Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 7(1), 1-37.
- Fung, L. K., & Saltzman, W. M.** (1997). Polymeric implants for cancer chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, 26(2-3), 209-230.
- Gallo, R. C., Whang-Peng, J., & Adamson, R. H.** (1971). Studies on the antitumor activity, mechanism of action, and cell cycle effects of camptothecin. *Journal of the National Cancer Institute*, 46(4), 789-795.
- Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C.** (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(16), 2885-2904.
- Gonçalves Filho, D., Silva, A. G., & Guidini, C. Z.** (2019). Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(18), 7399-7423.
- Gong, J., & Lin, X.** (2003). Facilitated electron transfer of hemoglobin embedded in nanosized Fe_3O_4 matrix based on paraffin impregnated graphite electrode and electrochemical catalysis for trichloroacetic acid. *Microchemical journal*, 75(1), 51-57.
- Harris, D. K., Allen, P. M., Han, H. S., Walker, B. J., Lee, J., & Bawendi, M. G.** (2011). Synthesis of cadmium arsenide quantum dots luminescent in the infrared. *Journal of the American Chemical Society*, 133(13), 4676-4679.
- Jain, T. K., Morales, M. A., Sahoo, S. K., Leslie-Pelecky, D. L., & Labhasetwar, V.** (2005). Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Molecular pharmaceuticals*, 2(3), 194-205.
- Jedrzejczak-Silicka, M., Kordas, M., Konopacki, M., & Rakoczy, R.** (2021). Modulation of Cellular Response to Different Parameters of the Rotating Magnetic Field (RMF)—An In Vitro Wound Healing Study. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 5785.
- Jiang, W., Wu, J., Shen, Y., Tian, R., Zhou, S., & Jiang, W.** (2016). Synthesis and characterization of doxorubicin loaded pH-sensitive magnetic core-shell nanocomposites for targeted drug delivery applications. *Nano*, 11(11), 1650127.
- Jun, Y. W., Seo, J. W., & Cheon, J.** (2008). Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences. *Accounts of chemical research*, 41(2), 179-189.
- Junior, J. C. Q., Ferrarezi, A. L., Borges, J. P., Brito, R. R., Gomes, E., Da Silva, R., ... & Boscolo, M.** (2016). Hydrophobic adsorption in ionic medium improves the catalytic properties of lipases applied in the triacylglycerol hydrolysis by synergism. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39(12), 1933-1943.
- Junior, J. C. Q., Ferrarezi, A. L., Borges, J. P., Brito, R. R., Gomes, E., Da Silva, R., ... & Boscolo, M.** (2016). Hydrophobic adsorption in ionic medium improves the catalytic properties of lipases applied in the triacylglycerol hydrolysis by synergism. *Bioprocess and biosystems engineering*, 39(12), 1933-1943.

- Kalkan, N. A., Aksoy, S., Aksoy, E. A., & Hasirci, N.** (2012). Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. *Journal of Applied Polymer Science*, 123(2), 707-716.
- Karimzadeh, I., Aghazadeh, M., Doroudi, T., Ganjali, M. R., & Kolivand, P. H.** (2017). Superparamagnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles Coated with PEG/PEI for Biomedical Applications: A Facile and Scalable Preparation Route Based on the Cathodic Electrochemical Deposition Method. *Advances in Physical Chemistry*.
- Kayastha, A. M., & Srivastava, P. K.** (2001). Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) urease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads and its analytical applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 96(1), 41-53.
- Kayastha, A. M., Srivastava, P. K., Miksa, B., & Slomkowski, S.** (2003). Unique activity of ureases immobilized on poly (styrene-co-acrolein) microspheres. *Journal of bioactive and compatible polymers*, 18(2), 113-124.
- Kidd, J. G.** (1953). Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *Journal of Experimental Medicine*, 98(6), 565-582.
- Klaus, T.** (1999). R. Joerger R, Olsson E, and Granquist CG: Silver based crystalline nanoparticles Microbically fabricated. *J. wound care*, 12, 250.
- Kook, J. K., Phung, V. D., Koh, D. Y., & Lee, S. W.** (2019). Facile synthesis of boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for efficient dopamine extraction. *Nano convergence*, 6(1), 1-8.
- Krishnamoorthi, S., Banerjee, A., & Roychoudhury, A.** (2015). Immobilized enzyme technology: potentiality and prospects. *J Enzymol Metabol*, 1(1), 010-104.
- Krishnamoorthi, S., Banerjee, A., & Roychoudhury, A.** (2015). Immobilized enzyme technology: potentiality and prospects. *J Enzymol Metabol*, 1(1), 010-104.
- Kumar, S., Dwevedi, A., & Kayastha, A. M.** (2009). Immobilization of soybean (Glycine max) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 138-145.
- Kumar, S., Dwevedi, A., & Kayastha, A. M.** (2009). Immobilization of soybean (Glycine max) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 138-145.
- Lai, S. M., Hsiao, J. K., Yu, H. P., Lu, C. W., Huang, C. C., Shieh, M. J., & Lai, P. S.** (2012). Polyethylene glycol-based biocompatible and highly stable superparamagnetic iron oxide nanoclusters for magnetic resonance imaging. *Journal of Materials Chemistry*, 22(30), 15160-15167.
- Lee, N., & Hyeon, T.** (2012). Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2575-2589.
- Li, C., Cummings, J., Lam, J., Graves, E., & Wu, W.** (2009). Radar remote monitoring of vital signs. *IEEE Microwave Magazine*, 10(1), 47-56.
- Li, H., Qin, L., Feng, Y., Hu, L., & Zhou, C.** (2015). Preparation and characterization of highly water-soluble magnetic Fe₃O₄ nanoparticles via surface double-layered self-assembly method of sodium alpha-olefin sulfonate. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 384, 213-218.

- Li, J., He, Y., Sun, W., Luo, Y., Cai, H., Pan, Y., ... & Shi, X.** (2014). Hyaluronic acid modified hydrothermally synthesized iron oxide nanoparticles for targeted tumor MR imaging. *Biomaterials*, 35(11), 3666-3677.
- Li, J., Zheng, L., Cai, H., Sun, W., Shen, M., Zhang, G., & Shi, X.** (2013). Polyethyleneimine-mediated synthesis of folic acid-targeted iron oxide nanoparticles for in vivo tumor MR imaging. *Biomaterials*, 34(33), 8382-8392.
- Li, Y., Hong, M., Bin, Q., Lin, Z., Cai, Z., & Chen, G.** (2013). Novel composites of multifunctional Fe₃O₄@ Au nanofibers for highly efficient glycoprotein imprinting. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(7), 1044-1051.
- Li, Z. X.; Barnes, J. C.; Bosoy, A.; Stoddart, J. F.; Zink, J. I.** Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41 (7), 2590–2605
- Li, Z., Tan, B., Allix, M., Cooper, A. I., & Rosseinsky, M. J.** (2008). Direct coprecipitation route to monodisperse dual-functionalized magnetic iron oxide nanocrystals without size selection. *Small*, 4(2), 231-239.
- Liao, M. H., & Chen, D. H.** (2001). Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability. *Biotechnology letters*, 23(20), 1723-1727.
- Lima, J. S., Araújo, P. H., Sayer, C., Souza, A. A., Viegas, A. C., & de Oliveira, D.** (2017). Cellulase immobilization on magnetic nanoparticles encapsulated in polymer nanospheres. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40(4), 511-518.
- Lima, J. S., Araújo, P. H., Sayer, C., Souza, A. A., Viegas, A. C., & de Oliveira, D.** (2017). Cellulase immobilization on magnetic nanoparticles encapsulated in polymer nanospheres. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40(4), 511-518.
- Lima-Ramos, J., Neto, W., & Woodley, J. M.** (2014). Engineering of biocatalysts and biocatalytic processes. *Topics in Catalysis*, 57(5), 301-320.
- Luhana, K., Dave, A., & Patel, K.** (2013). Production, purification and characterization of extracellular L-Asparaginase (Anti Cancerous Enzyme) from *Aspergillus niger*. *Int J Chem Tech Application*, 2(3), 14-25.
- Magnetoterapi, N. H.** (2012). Nazlıkul H (Editor): Detoksu keşfet. *Alfa basım yayım dağıtım, İstanbul*, 291-294.
- Majidi, S., Zeinali Sehrig, F., Farkhani, S. M., Soleymani Goloujeh, M., & Akbarzadeh, A.** (2016). Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(2), 722-734.
- McCoy, T. A., Maxwell, M., & Neuman, R. E.** (1956). The amino acid requirements of the Walker carcinosarcoma 256 in vitro. *Cancer research*, 16(10 Part 1), 979-984.
- Medeiros Vinci, R., Mestdagh, F., Van Poucke, C., Kerkaert, B., De Muer, N., Denon, Q., ... & De Meulenaer, B.** (2011). Implementation of acrylamide mitigation strategies on industrial production of French fries: Challenges and pitfalls. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(3), 898-906.
- Mostafa, S. A.** (1979). Production of L-asparaginase by *Streptomyces karnatakensis* and *Streptomyces venezuelae*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*, 134(5), 429-436.

- Mostafa, S. A., & Salama, M. S.** (1979). L-asparaginase-producing *Streptomyces* from the soil of Kuwait. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*, 134(4), 325-334.
- Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., & Dodson, A. T.** (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419(6906), 448-449.
- Mulder, W. J., Strijkers, G. J., Van Tilborg, G. A., Cormode, D. P., Fayad, Z. A., & Nicolay, K.** (2009). Nanoparticulate assemblies of amphiphiles and diagnostically active materials for multimodality imaging. *Accounts of chemical research*, 42(7), 904-914.
- Nair ve Pradeep,** (2002). Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains. *Crystal growth & design*, 2(4), 293-298.
- Nakarani, M., & Kayastha, A. M.** (2007). Kinetics and diffusion studies in urease- alginate biocatalyst beads. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 7(1), 79-84.
- Nakarani, M., & Kayastha, A. M.** (2007). Kinetics and diffusion studies in urease-alginate biocatalyst beads. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 7(1), 79-84.
- Narta, U. K., Kanwar, S. S., & Azmi, W.** (2007). Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical reviews in oncology/hematology*, 61(3), 208-221.
- Neto, S. A., Forti, J. C., Zucolotto, V., Ciancaglini, P., & De Andrade, A. R.** (2011). The kinetic behavior of dehydrogenase enzymes in solution and immobilized onto nanostructured carbon platforms. *Process Biochemistry*, 46(12), 2347-2352.
- Neves-Petersen, M. T., Snabe, T., Klitgaard, S., Duroux, M. E. G., & Petersen, S. B.** (2006). Photonic activation of disulfide bridges achieves oriented protein immobilization on biosensor surfaces. *Protein Science*, 15(2), 343-351.
- Neves-Petersen, M. T., Snabe, T., Klitgaard, S., Duroux, M. E. G., & Petersen, S. B.** (2006). Photonic activation of disulfide bridges achieves oriented protein immobilization on biosensor surfaces. *Protein Science*, 15(2), 343-351.
- Noma, S. A. A., Ulu, A., Acet, Ö., Sanz, R., Sanz-Pérez, E. S., Odabaşı, M., & Ateş, B.** (2020). Comparative study of ASNase immobilization on tannic acid-modified magnetic Fe₃O₄/SBA-15 nanoparticles to enhance stability and reusability. *New Journal of Chemistry*, 44(11), 4440-4451.
- Noma, S. A. A., Ulu, A., Acet, Ö., Sanz, R., Sanz-Pérez, E. S., Odabaşı, M., & Ateş, B.** (2020). Comparative study of ASNase immobilization on tannic acid-modified magnetic Fe₃O₄/SBA-15 nanoparticles to enhance stability and reusability. *New Journal of Chemistry*, 44(11), 4440-4451.
- Noma, S. A. A., Ulu, A., Koytepe, S., & Ateş, B.** (2020). Preparation and characterization of amino and carboxyl functionalized core-shell Fe₃O₄/SiO₂ for L-asparaginase immobilization: A comparison study. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(5), 392-404.
- Noma, S. A. A., Ulu, A., Koytepe, S., & Ateş, B.** (2020). Preparation and characterization of amino and carboxyl functionalized core-shell Fe₃O₄/SiO₂ for L-asparaginase immobilization: A comparison study. *Biocatalysis and Biotransformation*, 38(5), 392-404.

- Nouri, M.** (2020). Green synthesis of chitosan magnetic nanoparticles and their application with poly-aldehyde kefiran cross-linker to immobilize pectinase enzyme. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101681.
- Nunes, J. C., Cristóvão, R. O., Freire, M. G., Santos-Ebinuma, V. C., Faria, J. L., Silva, C. G., & Tavares, A. P.** (2020). Recent Strategies and Applications for L-Asparaginase Confinement. *Molecules*, 25(24), 5827.
- Ow, H., Larson, D. R., Srivastava, M., Baird, B. A., Webb, W. W., & Wiesner, U.** (2005). Bright and stable core– shell fluorescent silica nanoparticles. *Nano letters*, 5(1), 113-117.
- Oza, V. P., Parmar, P. P., Patel, D. H., & Subramanian, R. B.** (2011). Cloning, expression and characterization of l-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production. *3 Biotech*, 1(1), 21-26.
- Oza, V. P., Trivedi, S. D., Parmar, P. P., & Subramanian, R. B.** (2009). *Withania somnifera* (Ashwagandha): a Novel Source of L-asparaginase. *Journal of integrative plant biology*, 51(2), 201-206.
- Pandey, S., Oza, G., Mewada, A., & Sharon, M.** (2012). Green synthesis of highly stable gold nanoparticles using *Momordica charantia* as nano fabricator. *Arch. Appl. Sci. Res*, 4(2), 1135-1141.
- Paul, J. H.** (1982). Isolation and characterization of a *Chlamydomonas* L asparaginase. *Biochemical Journal*, 203(1), 109-115.
- Pierre, S. J., Thies, J. C., Dureault, A., Cameron, N. R., Van Hest, J. C., Carette, N.,... & Weberskirch, R.** (2006). Covalent enzyme immobilization onto photopolymerized highly porous monoliths. *Advanced Materials*, 18(14), 1822-1826.
- Pierre, S. J., Thies, J. C., Dureault, A., Cameron, N. R., Van Hest, J. C., Carette, N., ... & Weberskirch, R.** (2006). Covalent enzyme immobilization onto photopolymerized highly porous monoliths. *Advanced Materials*, 18(14), 1822-1826.
- Reddy, K. R. C., & Kayastha, A. M.** (2006). Improved stability of urease upon coupling to alkylamine and arylamine glass and its analytical use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38(2), 104-112.
- Reddy, K. R. C., & Kayastha, A. M.** (2006). Improved stability of urease upon coupling to alkylamine and arylamine glass and its analytical use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38(2), 104-112.
- Ren, Y., Rivera, J. G., He, L., Kulkarni, H., Lee, D. K., & Messersmith, P. B.** (2011). Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC biotechnology*, 11(1), 1-8.
- Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S. Z., ... & Rehman, I. U.** (2018). FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9), 703-746.
- Robinson, P. K.** (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in biochemistry*, 59, 1-41.
- Sakallıoğlu, H.** (2013). Manyetik nanopartiküller üzerine desteklenmiş Schiff bazı türevi metal komplekslerinin sentezleri ve katalitik etkinliklerinin incelenmesi. Çukurova Üniversitesi. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*.
- Salunkhe, A. B., Khot, V. M., & Pawar, S. H.** (2014). Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. *Current topics in medicinal chemistry*, 14(5), 572-594.

- Sánchez, J., Cortés-Hernández, D. A., Escobedo-Bocardo, J. C., Jasso-Terán, R. A., & Zugasti-Cruz, A.** (2014). Bioactive magnetic nanoparticles of Fe–Ga synthesized by sol–gel for their potential use in hyperthermia treatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(10), 2237-2242.
- Sandeep Kumar, V.** (2013). Magnetic nanoparticles-based biomedical and bioanalytical applications. *J Nanomed Nanotechol*, 4, e130.
- Sarquis, M. I. D. M., Oliveira, E. M. M., Santos, A. S., & Costa, G. L. D.** (2004). Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(5), 489-492.
- Sayiner, Ö., & Çomoğlu, T.** Nanotaşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme. Ankara Ecz. Fak. Derg. / J. Fac. Pharm. Ankara, 40(3): 62-79, 2016
- Schifrin, B. S., Erez, S., & Moore, J. G.** (1973). Teen-age endometriosis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 116(7), 973-980.
- Shawgi, N., Li, S., & Wang, S.** (2017). A Novel method of synthesis of high purity nano plated boron carbide powder by a solid-state reaction of poly (vinyl alcohol) and boric acid. *Ceramics International*, 43(13), 10554-10558.
- Sheldon, R. A.** (2007). Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289-1307.
- Shokrollahi, H.** (2013). Structure, synthetic methods, magnetic properties and biomedical applications of ferrofluids. *Materials Science and Engineering: C*, 33(5), 2476-2487.
- Shrivastava, A., Khan, A. A., Khurshid, M., Kalam, M. A., Jain, S. K., & Singhal, P. K.** (2016). Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical reviews in oncology/hematology*, 100, 1-10.
- Song, J. Y., & Kim, B. S.** (2009). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(1), 79-84.
- Sudhir, A. P., Dave, B. R., Trivedi, K. A., & Subramanian, R. B.** (2012). Production and amplification of an l-asparaginase gene from actinomycete isolate Streptomyces ABR2. *Annals of microbiology*, 62(4), 1609-1614.
- Sun, S., & Zeng, H.** (2002). Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 124(28), 8204-8205.
- Swain, A. L., Jaskólski, M., Housset, D., Rao, J. K., & Wlodawer, A.** (1993). Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), 1474-1478.
- Tamam, C., Evrensel, M., & Tamam, Y.** Elektromanyetik Alanların İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri. *Bilimsel Tamamlayıcı Tıp Regülasyon ve Nöral Terapi Dergisi*, 10(3), 19-25.
- Tarhan, T., Ulu, A., Sariçam, M., Çulha, M., & Ates, B.** (2020). Maltose functionalized magnetic core/shell Fe₃O₄@ Au nanoparticles for an efficient L-asparaginase immobilization. *International journal of biological macromolecules*, 142, 443-451.
- Teo, B. M., Chen, F., Hatton, T. A., Grieser, F., & Ashokkumar, M.** (2009). Novel one-pot synthesis of magnetite latex nanoparticles by ultrasound irradiation. *Langmuir*, 25(5), 2593-2595.
- Tripathi, P., Kumari, A., Rath, P., & Kayastha, A. M.** (2007). Immobilization of α-amylase from mung beans (Vigna radiata) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49(1-4), 69-74.

- Tripathi, P., Kumari, A., Rath, P., & Kayastha, A. M.** (2007). Immobilization of α amylase from mung beans (*Vigna radiata*) on Amberlite MB 150 and chitosan beads: A comparative study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 49(1-4), 69-74.
- Tüylek, Z.** (2017). İlaç Taşıyıcı Sistemler Ve Nanoteknolojik Etkileşim Drug Delivery Systems and Nanotechnological Interaction. *Bozok Tıp Dergisi*, 7(3), 89-98.
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M.** (1999). Polymeric systems for controlled drug release. *Chemical Reviews-Columbus*, 99(11), 3181-3198.
- Ulu, A., Noma, S. A. A., Koytepe, S., & Ates, B.** (2018). Magnetic Fe_3O_4 @ MCM-41 core-shell nanoparticles functionalized with thiol silane for efficient l-asparaginase immobilization. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup2), 1035-1045.
- Ulu, A., Noma, S. A. A., Koytepe, S., & Ates, B.** (2019). Chloro-modified magnetic Fe_3O_4 @ MCM-41 core-shell nanoparticles for L-asparaginase immobilization with improved catalytic activity, reusability, and storage stability. *Applied biochemistry and biotechnology*, 187(3), 938-956.
- Ulu, A., Ozcan, I., Koytepe, S., & Ates, B.** (2018). Design of epoxy-functionalized Fe_3O_4 @ MCM-41 core-shell nanoparticles for enzyme immobilization. *International journal of biological macromolecules*, 115, 1122-1130.
- Veisheh, O., Kievit, F. M., Fang, C., Mu, N., Jana, S., Leung, M. C., ... & Zhang, M.** (2010). Chlorotoxin bound magnetic nanovector tailored for cancer cell targeting, imaging, and siRNA delivery. *Biomaterials*, 31(31), 8032-8042.
- Vigneshwaran, N., Ashtaputre, N. M., Varadarajan, P. V., Nachane, R. P., Paralikar, K. M., & Balasubramanya, R. H.** (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials letters*, 61(6), 1413-1418.
- Wang, X., Cao, L., Lu, F., Meziani, M. J., Li, H., Qi, G., ... & Sun, Y. P.** (2009). Photoinduced electron transfers with carbon dots. *Chemical Communications*, (25), 3774-3776.
- Wasak, A., Drozd, R., Jankowiak, D., & Rakoczy, R.** (2019). Rotating magnetic field as tool for enhancing enzymes properties-laccase case study. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- Wei, H., Cheng, S. X., Zhang, X. Z., & Zhuo, R. X.** (2009). Thermo-sensitive polymeric micelles based on poly (N-isopropylacrylamide) as drug carriers. *Progress in Polymer Science*, 34(9), 893-910.
- Williams, M. C., Moss, A. J., Dweck, M., Adamson, P. D., Alam, S., Hunter, A., ... & Nicol, E. D.** (2019). Coronary artery plaque characteristics associated with adverse outcomes in the SCOT-HEART study. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(3), 291-301.
- Williams, R. A., & Blanch, H. W.** (1994). Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 9(2), 159-167.
- Williams, R. A., & Blanch, H. W.** (1994). Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 9(2), 159-167.
- Willner, I., Baron, R., & Willner, B.** (2006). Growing metal nanoparticles by enzymes. *Advanced Materials*, 18(9), 1109-1120.
- Woo, K., Hong, J., Choi, S., Lee, H. W., Ahn, J. P., Kim, C. S., & Lee, S. W.** (2004). Easy synthesis and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Chemistry of materials*, 16(14), 2814-2818.

- Wu, W., He, Q., & Jiang, C.** (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale research letters*, 3(11), 397-415.
- Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., & Kim, W. S.** (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and technology of advanced materials*.
- Wulandari, I. O., Santjojo, D. J. D. H., Shobirin, R. A., & Sabarudin, A.** (2017). Characteristics and magnetic properties of chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles prepared by ex-situ co-precipitation method. *Rasayan J. Chem.*, 10, 1348-1358.
- Xu, J., Ju, C., Sheng, J., Wang, F., Zhang, Q., Sun, G., & Sun, M.** (2013). Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles and its application in lipase immobilization. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 34(8), 2408-2412.
- Yang, C., & Yan, H.** (2012). A green and facile approach for synthesis of magnetite nanoparticles with tunable sizes and morphologies. *Materials Letters*, 73, 129-132.
- Yang, P.; Gai, S.; Lin, J.** Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 3679– 3698.
- Ye, L., Yong, K. T., Liu, L., Roy, I., Hu, R., Zhu, J., ... & Prasad, P. N.** (2012). A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. *Nature nanotechnology*, 7(7), 453-458.
- Zhang, B., Weng, Y., Xu, H., & Mao, Z.** (2012). Enzyme immobilization for biodiesel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(1), 61-70.
- Zhang, B., Weng, Y., Xu, H., & Mao, Z.** (2012). Enzyme immobilization for biodiesel production. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(1), 61-70.
- Zhang, K., Yang, W., Liu, Y., Zhang, K., Chen, Y., & Yin, X.** (2020). Laccase immobilized on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles as reusable biocatalyst for degradation of chlorophenol. *Journal of Molecular Structure*, 1220, 128769.
- Zırh Gürsoy** Nanofarmasötikler ve Uygulamaları (s. 1-7). İstanbul: Kontrollü Salım Sistemleri Derneği

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Gamze Dik

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2017, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü

ÇALIŞMA ALANLARI :

- Enzim immobilizasyonu
- Enzim inhibisyonu
- Enzim kinetiği
- Nanotaşıyıcı malzemeler
- Biyomalzeme
- Biyopolimer
- İlaç taşıyıcı materyaller
- İlaç salınımı
- Biyosensör/Manyetoelastik biyosensör

YÜKSEK LİSANS DÖNEMİNDE ÜRETİLEN YAYINLAR

- **Ateş B, Ulu A, Dik G,** (2020), Poliüretan Temelli Malzemelerin Enzim İmmobilizasyonunda Kullanımı, PUTECH.
- **Ateş B, Ulu A, Dik G,** (Basımda) Handbook of Magnetic Hybrid Nanoalloys and their Nanocomposites – Your Contribution: Medicinal and biological application of magnetic alloy nanoparticles and their polymer nanocomposites.
- **Dik G, Ulu A, Ateş B,** (2020), Synthesis Of Boronic Acid/PEG Functionalized Magnetic Nanoparticles For Enzyme Immobilization, Department of Chemistry, Faculty of Arts and Science, İnönü University, PCFM

BURSLAR

- Suda Çözünebilen Fonksiyonel Bor Türevli Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi ve L-Asparajinaz İmmobilizasyonunda Kullanımı, Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü, 2019-2020
- Upconverting Nanopartiküller Kullanılarak Biyoteknolojik Enzim-İlaçların Aktivitesinin Yakın Kızılötesi Işık (NIR) ile Tetiklendiği Fonksiyonel Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, TÜBİTAK, 2020

PROJELER

- Suda Çözünebilen Fonksiyonel Bor Türevli Manyetik Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve L-asparajinaz İmmobilizasyonunda Kullanımı, BAP, BOREN (Tamamlandı)

- Mikro Manyetoelastik Sensör Üretimi ve İmmüno­sen­sor Uygulaması, BAP (Devam ediyor)
- Ürikaz İmmobilizasyonu için Upconverting Nanopartiküllerin Hazırlanması Karakterizasyonu ve Yakın kızıl ötesi NIR Kullanılarak Enzim Aktivitesinin Kontrollü Manipülasyonu, (Devam ediyor)
- Upconverting Nanopartiküller Kullanılarak Biyoteknolojik Enzim-İlaçların Aktivitesinin Yakın Kızılötesi Işık (NIR) ile Tetiklendiği Fonksiyonel Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi, TÜBİTAK, (Devam ediyor)

