

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

**KEMOTERAPÖTİK BİR AJAN OLAN L-ASPARAGİNAZ'IN
FARKLI POLİMERİK YAPILARA İMMOBİLİZASYONU VE
KARAKTERİZASYONU**

AHMET ULU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

MALATYA

HAZİRAN 2014

Tezin Başlığı: **Kemoterapötik Bir Ajan Olan L-asparaginaz'ın Farklı Polimerik Yapılara İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu**

Tezi Hazırlayan: Ahmet ULU

Sınav Tarihi: 27.06.2014

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri

Prof. Dr. İsmet YILMAZ

Doç. Dr. Burhan ATEş (Danışman)

Doç. Dr. Süleyman KÖYTEPE

Fen Bilimleri Enstitü Onayı

Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN

Enstitü Müdürü

Canım Ailem'e...

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “Kemoterapötik Bir Ajan Olan L-asparaginaz’ın Farklı Polimerik Yapılara İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Ahmet Ulu

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KEMOTERAPÖTİK BİR AJAN OLAN L-ASPARAGİNAZIN FARKLI POLİMERİK YAPILARA İMMOBİLİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Ahmet ULU

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

xiv + 102

2014

Danışman: Doç. Dr. Burhan ATEŞ

L-asparaginaz, akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde etkili bir şekilde kullanılan enzimdir. L-asparaginazın kullanımını sınırlayan hipersensitif reaksiyonları çözmek için polietilen glikol (PEG) ile konjugasyon oldukça yaygındır. Bununla beraber farklı biyoyumlu materyallere L-asparaginazın immobilize edilerek daha etkin şekilde kullanılması oldukça önemlidir. Bu çalışmanın amacı L-asparaginazın immobilizasyonunda kullanılacak biyoyumlu farklı polimerik yapıları hazırlamak ve immobilize edilen enzimin hem yapısal hem de kinetik açıdan kullanılabilirliğinin test edilmesidir.

Çalışmamızda katı matriks olarak polimetilmetakrilat (PMMA), polihidroksietilmetakrilat (PHEMA) ve polimetakrilikasit : polimetilmetakrilat P(MA-MMA) ve bu polimerlerinden yola çıkılarak farklı oranlarda nişasta katkılı polimerik yapılar hazırlandı. Tüm yapılar FTIR, TGA, DTA, DSC ve sıvı temas açısı ile yapısal olarak karakterize edildi. Polimerik yapılara nişasta katkılamanın polimerik yapıların biyobozunurluğunu arttırdığı, sıvı temas açısını düşürdüğü ve bozunma sıcaklığı aralığını genişlettiği tespit edilmiştir. L-asparaginazın immobilizasyonunda PMMA ve PHEMA için % 3, P(MA-MMA) için ise % 5 nişasta içeren polimerler en yüksek aktivite değerleri sergilemiştir. İmmobilize enzimlerin 50 °C'den yüksek sıcaklıklarda serbest enzime göre aktivitesini koruduğu tespit edilmiştir. Özellikle P(MA-MMA)-5N-Asn immobilize enzim örneklerinde yarı ömrün oda sıcaklığında 30 güne kadar uzadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, L-asparaginazın immobilizasyonu ve daha etkin kullanımı için biyoyumlu polimerik yapılar ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: L-asparaginaz, İmmobilizasyon, PMMA, PHEMA, P(MA-MMA).

ABSTRACT

Master Thesis

IMMOBILIZATION AND CHARACTERIZATION OF L-ASPARAGINASE, A CHEMOTHERAPETIC AGENT, ONTO DIFFERENT POLYMERIC STRUCTURES

Ahmet ULU

Inönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Department

xiv + 102

2014

Supervisor: Assoc. Prof. Burhan ATEŞ

L-asparaginase, is the enzyme effectively used to treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). Polyethylene glycol (PEG) conjugation of the enzyme is quite common to solve the hypersensitive reaction which is limit in the use of L-asparaginase. However, a different biocompatible material by immobilization of L-asparaginase is very important to use more effectively. The purpose of this study has prepared at different biocompatible polymeric structures to be used for immobilization of L-asparaginase and the immobilized enzyme is tested of availability as both structural and kinetically.

In our study, different rates starch blended polymethylmethacrylate (PMMA), polyhydroxyethylmethacrylate (PHEMA) and polymethacrylic acid : polymethylmethacrylate P(MA-MMA) polymeric structures were prepared as the solid matrix. All structures were characterized with FTIR, TGA, DTA, DSC and liquid contact angle, structurally. With starch added to the polymeric structure was found to increase the biodegradability of the polymeric structure, lower the liquid contact angle and extend the decomposition temperature range. In the immobilization of L-asparaginase, 3% for PHEMA and PMMA, 5% for P(MMA-MA) starch-containing polymer exhibited the highest activity values. Immobilized enzymes were found to retain activity compare with free enzyme at the temperatures above of 50 °C. Especially, P(MA-MMA)-5N-Asn samples was determined at the half-life of immobilized enzyme to be prolonged up to 30 days at room temperature.

As a result, biocompatible polymeric structures have been revealed for more effective use and immobilization of L-asparaginase.

Key Words: L-asparaginase, Immobilization, PMMA, PHEMA, P(MA-MMA).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimi ile yardım ve önerilerini hiçbir zaman esirgemeyen, sabırla ve özveriyle her konuda beni aydınlatan, deneysel çalışmalarında izlemem gereken yol hakkında ve deneysel verilerimin değerlendirilmesinde önsezili ve geliştirici açıklamaları ile çalışmalarım boyunca önümde bir ışık olan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Burhan ATEŞ'e, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında bilgi ve deneyimleri ile izlemem gereken yöntem ve metotlar hakkında sürekli beni bilgilendiren, hiçbir zaman yardım ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Süleyman KÖYTEPE'ye çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca her konuda destek ve yardımını gördüğüm Arş. Grv. Ali ERDOĞAN'a, Biyokimya Araştırma Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma ve arkadaşım İsmail GÜREL'e teşekkür ederim.

Karşılaştığım her zorlukta hep yanımda olan, varlığıyla bu sürecin kolaylaşmasını sağlayan, çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, hayatımı paylaşmaya karar verdiğim sevgili nişanlım Öznur DOĞAN'a ve,

Hayatım boyunca her konuda ilgi ve desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde 2012/37 nolu ve " Kemoterapötik Bir Ajan Olan L-asparaginazın Farklı Polimerik Yapılara İmmobilizasyonu ve Karakterizasyonu " başlıklı proje ile finansal destek sunan, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONUR SÖZÜ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. L-asparaginaz.....	2
1.2. L-asparaginazın Moleküler Yapısı.....	3
1.3. L-asparaginazın Optimum Koşulları.....	5
1.4. L-asparaginazın Depo Kararlılığı.....	6
1.5. L-asparaginaz Kaynakları.....	6
1.5.1. Bakteriyel L-asparaginazlar.....	6
1.5.2. Ferment L-asparaginazlar.....	7
1.5.3. Fungal L-asparaginaz.....	7
1.5.4. Aktinomiset L-asparaginaz.....	7
1.5.5. Bitkisel L-asparaginaz.....	7
1.5.6. Rekombinant L-asparaginaz.....	8
1.6. L-asparaginazın Etki Mekanizması.....	8
1.7. L-asparaginazın Kemoterapötik Etkisi.....	9
1.8. Gıda Endüstrisinde L-asparaginazın Kullanımı.....	10
1.9. Ticari L-asparaginazlar.....	11
1.10. İmmobilizasyon ve İmmobilizasyon Teknikleri.....	11
1.10.1. Geri dönüşümsüz immobilizasyon metotları.....	14
1.10.1.1. Kovalent bağlama	14
1.10.1.2. Tutuklama.....	16
1.10.1.3. Çapraz bağlama.....	18
1.10.2. Dönüşümlü immobilizasyon metotları.....	18
1.10.2.1. Adsorpsiyon.....	18

1.10.2.2.	İyonik bağlanma.....	19
1.10.2.3.	Affinite bağlanma	19
1.10.2.4.	Metal bağlanma.....	19
1.10.2.5.	Disülfid bağı	19
1.11.	Biyotaşıyıcılar: Biyouyumlu Polimerler.....	20
1.11.1.	Doğal polimerler	21
1.11.2.	Sentetik biyouyumlu polimerler.....	22
1.12.	Poli(metil metakrilat) (PMMA)	23
1.12.	Poli(2-hidroksietilmetakrilat) (PHEMA)	24
1.13.	Poli(metakrilik asit) (PMA)	25
2.	KAYNAK ÖZETLERİ	26
3.	MATERYAL VE METOT	30
3.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	30
3.2.	Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	30
3.3.	Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	30
3.4.	Nessler Reaktifinin Hazırlanması.....	31
3.5.	Polimer Örneklerinin Sentezi	32
3.5.1.	Polimetilmetakrilat (PMMA) sentezi.....	32
3.5.2.	% 1, % 3, % 5, % 10 nişasta katkılı PMMA sentezi.....	32
3.5.3.	Poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) sentezi.....	32
3.5.4.	% 1, % 3, % 5, % 10 nişasta katkılı PHEMA sentezi.....	33
3.5.5.	Polimetakrilik asit (PMA) sentezi.....	33
3.5.6.	70:30 P(MA:MMA) sentezi.....	34
3.5.7.	% 1, % 3, % 5, % 10 nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) sentezi.....	34
3.6.	Saf ve Nişasta Katkılı Olarak Sentezlenen Polimerlerin Bozunurluk Testleri.....	34
3.7.	Saf ve Nişasta Katkılı Olarak Sentezlenen Polimerlerin Çözünürlük Testleri.....	35
3.8.	Sentezlenen Polimer Örneklerinin Yüzey Özelliklerinin Sıvı Temas Açısı İle İncelenmesi.....	35
3.9.	Polimer Örneklerine ve Nişasta Katkılı Polimer Örneklerine Enzim İmmobilizasyonu.....	35
3.10.	Serbest Enzimin Aktivite Ölçümü.....	36

3.11.	İmmobilize Enzimin Aktivite Ölçümü.....	36
3.12.	Serbest ve İmmobilize Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi.....	36
3.13.	Serbest ve İmmobilize Enzimin Maksimum ve Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	37
3.14.	Serbest ve İmmobilize Enzimin Depo Kararlılıklarının Belirlenmesi.....	37
3.15.	Serbest ve İmmobilize Enzimin Km ve Vmax Değerlerini Belirlenmesi.	38
3.16.	Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini.....	38
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	
4.1.	Saf ve Nişasta Katkılı Polimerlerin Karakterizasyonu.....	39
4.1.1.	Saf ve nişasta katkılı PMMA'nın karakterizasyonu.....	39
4.1.2.	Saf ve nişasta katkılı PHEMA'nın karakterizasyonu.....	45
4.1.3.	Farklı oranlarda PMA-PMMA içeren kopolimerlerin karakterizasyonu..	52
4.1.4.	Saf ve % 1, % 3, % 5, % 10 nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) karakterizasyonu.....	56
4.2.	Serbest L-asparaginazın Optimum pH'ın Belirlenmesi.....	64
4.3.	Serbest Enzimin Optimum ve Maksimum Sıcaklığın Belirlenmesi.....	65
4.4.	Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri.....	67
4.5.	Serbest Enzimin Kinetik Parametrelerinin Hesaplanması.....	68
4.6.	Serbest Enzimin Depo Kararlılığının Belirlenmesi.....	68
4.7.	Saf ve Nişasta Katkılı PMMA Polimerine Enzim İmmobilizasyonu.....	70
4.7.1.	PMMA-% 3N-Asn'nin optimum pH'ın belirlenmesi.....	71
4.7.2.	PMMA-% 3N-Asn'nin optimum ve maksimum sıcaklığının belirlenmesi.....	73
4.7.3.	PMMA-% 3N-Asn'nin kinetik parametrelerinin belirlenmesi.....	75
4.7.4.	PMMA-% 3N-Asn'nin depo kararlılığının belirlenmesi.....	75
4.8.	Saf ve Nişasta Katkılı PHEMA Polimerine Enzim İmmobilizasyonu.....	77
4.8.1.	PHEMA-% 3N-Asn'nin optimum pH'ın belirlenmesi.....	78
4.8.2.	PHEMA-% 3N-Asn'nin optimum ve maksimum sıcaklığının belirlenmesi.....	80
4.8.3.	PHEMA-% 3N-Asn'nin kinetik parametrelerinin belirlenmesi.....	82
4.8.4.	PHEMA-% 3N-Asn'nin depo kararlılığının belirlenmesi.....	83
4.9.	Saf ve Nişasta Katkılı 70:30 P(MA:MMA) Polimerine Enzim İmmobilizasyonu.....	84

4.9.1.	70:30 P(MA:MMA) -% 5N-Asn'nin optimum pH'ın belirlenmesi.....	85
4.9.2.	70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin optimum ve maksimum sıcaklığının belirlenmesi.....	86
4.9.3.	70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin kinetik parametelerinin belirlenmesi	89
4.9.4.	70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin depo kararlılığının belirlenmesi.....	89
5.	SONUÇ ve TARTIŞMA	92
6.	KAYNAKLAR	98
	ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	L-asparagin amino asidinin L-aspartata hidroliz reaksiyonu	2
Şekil 1.2.	<i>Yersinia pestis</i> gram-negatif bakterisinden izole edilen Tip I L-asparaginazın kristal yapısı	3
Şekil 1.3.	<i>Erwinia chrysanthemi</i> gram-negatif bakterisinden izole edilen Tip II L-asparaginazın kristal yapısı	4
Şekil 1.4.	<i>Erwinia chrysanthemi</i> aktif esnek bölgeler	4
Şekil 1.5.	L-asparaginazın etki mekanizması	9
Şekil 1.6.	Maillard reaksiyonu	11
Şekil 1.7.	Geridönüşümsüz immobilizasyon yöntemleri	14
Şekil 1.8.	Kovalent bağın enzim aktivitesi üzerine olası etkileri	15
Şekil 1.9.	Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu	16
Şekil 1.10.	Enzim immobilizasyonu için lipozom kapsüller.....	17
Şekil 1.11.	Geridönüşümlü immobilizasyon yöntemleri	18
Şekil 1.12.	PMMA'nın sentez reaksiyonu	23
Şekil 1.13.	PHEMA'nın sentez reaksiyonu	24
Şekil 1.14.	PMA'nın sentez reaksiyonu.....	25
Şekil 4.1.	Farklı oranlarda nişasta katkılanmış PMMA polimer örneklerine ait FT-IR spektrumları	41
Şekil 4.2.	PMMA ve nişasta katkılı PMMA örneklerine ait TGA termogramları	42
Şekil 4.3.	PMMA ve nişasta katkılı PMMA örneklerine ait DTA termogramları	43
Şekil 4.4.	PMMA ve nişasta katkılı PMMA örneklerine ait DSC termogramları.....	44
Şekil 4.5.	Nişastasız, % 3 nişasta katkılı ve % 3 nişasta katkılı enzimli PMMA örneklerine ait FT-IR spektrumları.....	45
Şekil 4.6.	Saf ve nişasta katkılı PMMA örneklerinin % bozunurluk sonuçları.....	46
Şekil 4.7.	Saf ve % 1 nişasta katkılı PMMA polimer filmlerinin sıvı temas açısı görüntüleri.....	46
Şekil 4.8.	% 3, % 5 ve % 10 nişasta katkılı PMMA polimer filmlerinin sıvı temas açısı görüntüleri.....	47
Şekil 4.9.	Farklı oranlarda nişasta katkılanmış PHEMA polimer örneklerine ait FT-IR spektrumları	48

Şekil 4.10.	PHEMA ve nişasta katkılı PHEMA örneklerine ait TGA termogramları	49
Şekil 4.11.	PHEMA ve nişasta katkılı PHEMA örneklerine ait DTA termogramları.....	50
Şekil 4.12.	PHEMA ve nişasta katkılı PHEMA örneklerine ait DSC termogramları.....	51
Şekil 4.13.	Nişastasız, % 3 nişasta katkılı ve % 3 nişasta katkılı enzimli PHEMA örneklerine ait FT-IR spektrumları.....	52
Şekil 4.14.	Saf ve nişasta katkılı PHEMA örneklerine ait % bozunurluk sonuçları.....	53
Şekil 4.15.	Saf ve % 1 nişasta katkılı PHEMA filmlerinin sıvı temas açısı görüntüleri.....	53
Şekil 4.16.	% 3, % 5 ve % 10 nişasta katkılı PHEMA filmlerinin sıvı temas açısı görüntüleri.....	54
Şekil 4.17.	Farklı oranlarda kopolimerleştirilmiş PMA-PMMA polimerlerine ait FT-IRspektrumları.....	55
Şekil 4.18.	Farklı oranlarda kopolimerleştirilmiş PMA-PMMA örneklerine ait TGA termogramları.....	56
Şekil 4.19.	Farklı oranlarda kopolimerleştirilmiş PMA-PMMA örneklerine ait DTA termogramları.....	57
Şekil 4.20.	Farklı oranlarda kopolimerleştirilmiş PMA-PMMA örneklerine ait DSC termogramları.....	58
Şekil 4.21.	Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) örneklerine ait FT-IR spektrumları.....	59
Şekil 4.22.	Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) örneklerine ait TGA termogramları.....	60
Şekil 4.23.	Saf ve nişasta katkılı 7:3 P(MA:MMA) örneklerine ait DTA termogramları.....	61
Şekil 4.24.	Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) örneklerine ait DSC termogramları.....	62
Şekil 4.25.	Nişastasız, % 5 nişasta katkılı ve % 5 nişasta katkılı enzimli 70:30 P(MA:MMA) örneklerine ait FT-IR spektrumları.....	63
Şekil 4.26.	Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) kopolimerine ait %	

	bozunurluk sonuçları.....	64
Şekil 4.27.	Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) polimer filmlerinin sıvı temas açısı görüntüleri.....	65
Şekil 4.28.	Serbest L-asparaginaz aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi.....	67
Şekil 4.29.	Serbest L-asparaginaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi.....	68
Şekil 4.30.	Serbest L-asparaginaz'ın Arrhenius grafiği.....	69
Şekil 4.31.	Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik.....	69
Şekil 4.32.	Serbest enzime ait Lineweaver-Burk grafiği.....	70
Şekil 4.33.	Serbest L-asparaginazın depolama kararlılığı.....	72
Şekil 4.34.	Saf ve nişasta katkılı PMMA örneklerine immobilize edilen enzimin aktivite sonuçlarının sütun grafiği olarak gösterimi.....	73
Şekil 4.35.	Serbest enzim ve PMMA-% 3N-Asn'nin aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi.....	74
Şekil 4.36.	Serbest enzim ve PMMA-% 3N-Asn'nin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi.....	76
Şekil 4.37.	PMMA-% 3N-Asn'nin Arrhenius grafiği.....	76
Şekil 4.38.	PMMA-% 3N-Asn'nin Lineweaver-Burk grafiği.....	77
Şekil 4.39.	PMMA-% 3N-Asn'nin depolama kararlılığı.....	79
Şekil 4.40.	Saf ve nişasta katkılı PHEMA örneklerine immobilize edilen enzimin aktivite sonuçları.....	80
Şekil 4.41.	Serbest enzim ve PHEMA-% 3N-Asn'nin aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi.....	82
Şekil 4.42.	Serbest enzim ve PHEMA-% 3N-Asn'nin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi.....	83
Şekil 4.43.	PHEMA-% 3N-Asn'nin Arrhenius grafiği.....	84
Şekil 4.44.	PHEMA-% 3N-Asn'nin Lineweaver-Burk grafiği.....	84
Şekil 4.45.	PHEMA-% 3N-Asn'nin depolama kararlılığı.....	86
Şekil 4.46.	Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) polimerine immobilize edilen enzimin aktivite sonuçları.....	87
Şekil 4.47.	Serbest enzim ve 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi.....	88
Şekil 4.48.	Serbest enzim ve 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin aktivitesinin	

	sıcaklığa bağlı olarak değişimi.....	90
Şekil 4.49.	70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin Arrhenius grafiği.....	90
Şekil 4.50.	70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin Lineweaver-Burk grafiği	91
Şekil 4.51.	70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin depo kararlılığı.....	93

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1.1.	Enzimlerin immobilizasyon tekniği ile kullanım alanları.....	12
Tablo 1.2.	Taşıyıcıların sınıflandırılması	13
Tablo 4.1.	Serbest enzimin değişen pH değerlerine karşı aktivite sonuçları.....	66
Tablo 4.2.	Serbest enzimin değişen sıcaklık değerlerine karşı aktivite sonuçları.....	67
Tablo 4.3.	+4 °C'de depolanan serbest enzimin günlere kıyasla aktivite sonuçları...	71
Tablo 4.4.	+25 °C'de depolanan serbest enzimin günlere kıyasla aktivite sonuçları...	71
Tablo 4.5.	Saf ve nişasta katkılı PMMA örneklerine immobilize edilen enzimin aktivite sonuçları	73
Tablo 4.6.	PMMA-% 3N-Asn'nin değişen pH değerlerine karşı aktivite sonuçları...	74
Tablo 4.7.	PMMA-% 3N-Asn'nin değişen sıcaklık değerlerine karşı aktivite sonuçları.....	75
Tablo 4.8.	+4 °C'de depolanan PMMA-% 3N-Asn'nin aktivite sonuçları	78
Tablo 4.9.	+25 °C'de depolanan PMMA-% 3N-Asn'nin aktivite sonuçları	78
Tablo 4.10.	Saf ve nişasta katkılı PHEMA yapılarına immobilize edilen enzimin aktive sonuçları	80
Şema 4.11.	PHEMA-% 3N-Asn'nin değişen pH değerlerine karşı aktivite sonuçları	81
Tablo 4.12.	PHEMA-% 3N-Asn'nin değişen sıcaklık değerlerine karşı aktivite sonuçları.....	82
Tablo 4.13.	+4 °C'de depolanan PHEMA-% 3N-Asn'nin aktivite sonuçları.....	85
Tablo 4.14.	+25 °C'de depolanan PHEMA-% 3N-Asn'nin aktivite sonuçları.....	85
Tablo 4.15.	70:30 (MA:MMA)-Asn'nin aktivite sonuçları	86
Tablo 4.16.	70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin değişen pH değerlerine karşı aktivite sonuçları.....	88
Tablo 4.17.	70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin değişen sıcaklık değerlerine karşı aktivite sonuçları.....	89
Tablo 4.18.	+4 °C'de depolanan 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin aktivite sonuçları.....	92
Tablo 4.19.	+25 °C'de depolanan 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin aktivite sonuçları.....	92

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALL	Akut lenfoblastik lösemi
BSA	Bovine serum albümin
DMF	N,N-Dimetilformamit
DSC	Diferensiyal taramalı kalorimetri
DTA	Diferensiyal termal analiz
DTT	Ditiyotreitol
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
IR	Infrared Spektroskopisi
MMA	Metilmetakrilat
HEMA	Hidroksietilmetakrilat
MA	Metakrilik asit
OVA	Ovalbümin
PEG	Polietilen glikol
PHEMA	Polihidroksietilmetakrilat
PMMA	Polimetilmetakrilat
PMA	Polimetakrilik asit
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinilpirolidon
TCA	Trikloroasetik asit
TGA	Termogravimetrik analiz
Vmax	Maksimum hız
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy

1. GİRİŞ

Kanser son yüzyılımızın en önemli hastalıklarından biri olup etkin mücadele yolları halen yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bazı enzimlerin çeşitli kemoterapilerde kullanım potansiyellerinin keşfedilmesi ve bu enzimlerin hastalığın tedavisinde kullanılması, enzim-ilaç tedavileri ve bununla ilgili araştırmalarda önemli oranda artış oluşturmuştur. Buradaki çalışmanın konusunu oluşturan L-asparaginaz enzimi de çocuk lösemisi (akut lenfoblastik lösemi, ALL) başta olmak üzere birçok kanser türünde terapötik olarak kullanılmaktadır. L-asparaginaz, esansiyel olmayan L-asparagin (L-Asn) amino asidinin L-aspartat ve amonyağa hidrolizini katalizlemektedir. Normal hücreler büyümek için kandaki L-asparagine gerek duymamasına rağmen kanserli hücreler için kandaki L-asparagin esansiyel bir aminoasittir. Bu nedenle kandaki L-asparagin amino asidinin L-asparaginaz enzimi ile süpürülmesi kanserli hücrelerin büyümesini yavaşlatır ve ölmesine yol açar. Özellikle ALL’de birincil kemoterapötik ajan olan L-asparaginaz hastalar açısından yüklü maliyetler oluşturmaya karşın hastalığın tedavisinde vazgeçilmez bir kemoterapötik ilaçtır. Bu nedenle enzimin özellikle kanser tedavisinde daha etkin kullanılması ve vücut içi yarılanma ömrünün arttırılması için çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlarla ortaya konmuş ve halihazırda kullanım potansiyeli bulan Polietilen glikol (PEG) ile enzimin hazırlanması en önemli yöntemdir. Ayrıca immobilize L-asparaginazın ticari olarak önemli bir kullanım alanı da yiyeceklerde akrilamid oluşumunu engellenmesidir. Yukarıda saydığımız özellik ve kullanım alanları nedeniyle L-asparaginazın daha etkin bir şekilde ve uzun ömürlü immobilize edildiği sistemlerin araştırılması gerekliliği aşikârdır.

Bu amaçla çalışmamız, sentezini ve karakterizasyonunu tez kapsamında yaptığımız polimetilmetakrilat (PMMA), polihidroksietilmetakrilat (PHEMA), polimetakrilik asit-co-polimetilmetakrilat (PMA:PMMA) polimerleri ve bu polimerlere farklı oranlarda nişasta katkılanmış serilere L-asparaginazın immobilizasyonu ve kullanım parametrelerinin araştırılmasını içermektedir. Bu kapsamda polimer ve nişasta içeren yapılar FTIR, TGA, DTA, DSC, sıvı temas açısı, ve biyobozunurluk testi ile karakterize edildi. Yapısal olarak karakterize edilen farklı oranlarda nişasta içeren polimerlere enzimin immobilizasyonu gerçekleştirdi ve immobilizasyon etkinliği en yüksek olan polimerik yapı seçilerek enzimatik

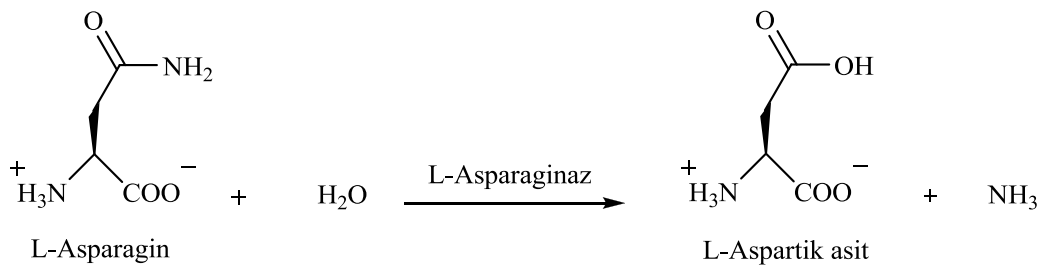
açından depolama, pH ve termal kararlılık gibi ileri karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Ayrıca immobilize enzimin kinetik parametreleri (K_m , V_{max}) ve aktivasyon enerjisi belirlendi.

Kullanım potansiyeli ve maliyeti düşünüldüğünde L-asparaginazın daha etkin kullanımı için immobilizasyonu oldukça önemlidir. Çalışma farklı şekillerde hazırlanmış biyouyumlu polimerik yapılara L-asparaginazın immobilizasyonunu içermekte ve alternatif immobilizasyon ajanları ortaya koymaktadır.

1.1. L-asparaginaz

Enzimler, hücre içerisinde meydana gelen kimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısındaki moleküllerdir. Biyolojik bir sistemde neredeyse bütün reaksiyonlar enzim varlığında gerçekleşir. Enzimler substratlarına özgü olduklarından dolayı hücrede oluşan metabolik yolları kontrol ederler. Ayrıca enzimler endüstriyel, tıbbi, bilimsel ve analitik çalışmalarda kullanılmaktadır (Ahmad ve ark., 2012).

Son yıllarda, enzimlerin klinik araştırmalardaki kullanımı büyük bir önem kazanmıştır. L-asparaginaz (L-asparagin amidohidrolaz, EC 3.5.1.1) bu alanda yaygın olarak kullanılan enzimlerden birisidir. L-asparaginaz, L- asparagin (L-Asn) amino asidinin L-aspartat (L-Asp) ve amonyağa (NH_3) hidrolizi reaksiyonunu katalizler (Şekil 1.1). Bu reaksiyonda L-Asn'nin amid bağı hidrolize edilmektedir.



Şekil 1.1. L-asparagin amino asidinin L-aspartata hidroliz reaksiyonu

L-asparaginaz aynı zamanda L-glutamin (L-Gln) amino asidinin L-glutamata (L-Glu) hidroliz reaksiyonunu da daha az bir affinite göstererek katalizler.

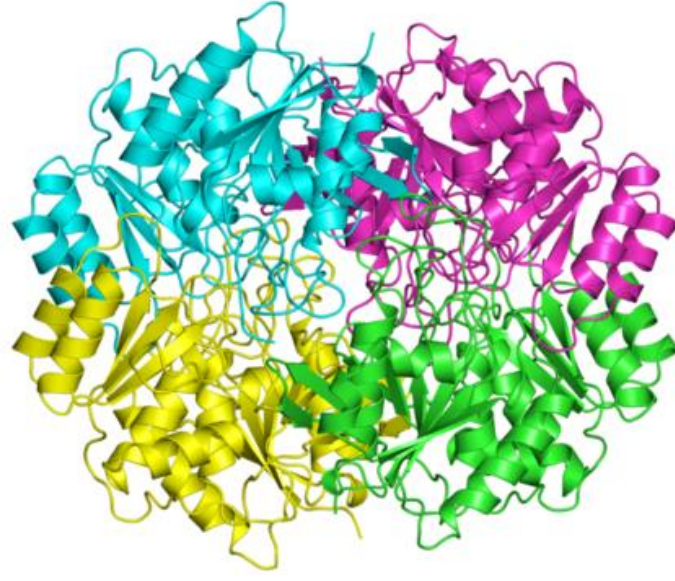
1.2. L-asparaginazın Moleküler Yapısı

Campbell ve arkadaşları tarafından 1967 yılında bakteri kaynaklı Tip I ve Tip II olmak üzere iki tip L-asparaginaz tanımlanmıştır (Campbell, 1967) (Şekil 1.2, 1.3). Tip I L-asparaginaz daha çok sitoplazmada bulunur ve hem L-Asn hem de L-Gln'nin hidroliz reaksiyonunu katalizlerken, Tip II L-asparaginaz bakteriyel membranların periplazmik boşluklarda bulunur ve L-Asn'nin hidroliz reaksiyonuna yüksek bir spesifiklik gösterir.

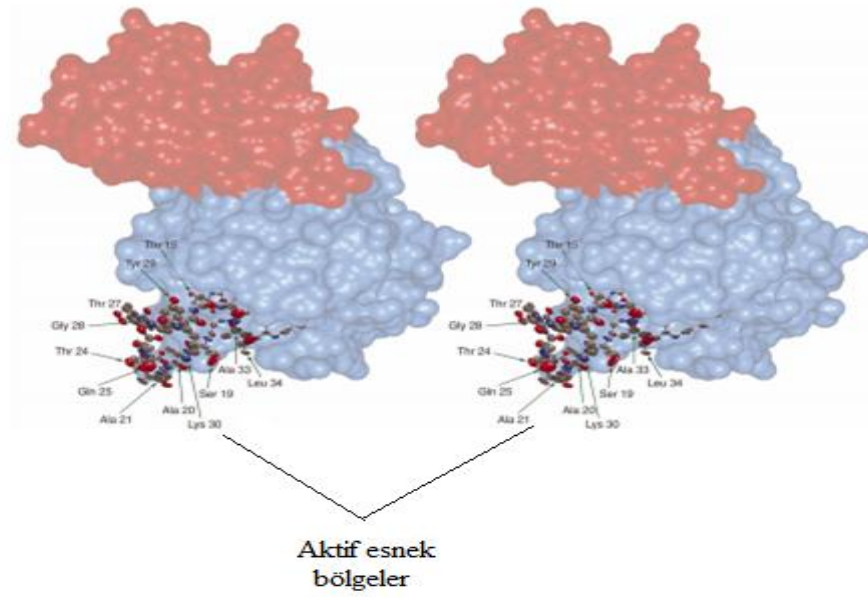
Bakteriyel L-asparaginazların çoğu benzer tersiyer, kuarterner ve aynı zamanda ortak biyokimyasal özellikler gösterir. Genellikle *E. coli* ve *Erwinia sp* asparaginazların yapısal özellikleri hakkında mevcut bilgiler çoğunluktadır. *E.coli* asparaginazın moleküler ağırlığı 133-144 kDa iken, farklı kaynaklardan elde edilen asparaginazların moleküler ağırlığı 140-150 kDa arasında değişmektedir. Bakteriyel kökenli L-asparaginaz, her biri 14 α -heliks yapı ve sekiz β -kırmalı tabaka yapı 330 amino asit uzunluğunda geniş N-terminal zinciri ve daha küçük C-terminal zincirden oluşmaktadır. L-asparaginaz 4 alt ünitelerden oluşan homotetramerik bir yapıdadır. Homotetramerik yapıyı oluşturan her bir alt ünite komşu alt ünitesiyle dimer oluşturarak kuarterner yapıyı oluşturmaktadır. Başlangıç dimeri oluştuğunda yüzeyler arası bölgede diğer bölgelerden daha esnek iki ayrı aktif bölge oluşur (Şekil 1.4). Aktif bölgedeki amino asit rezidüleri Thr15, Tyr29, Ser62, Glu63, Thr95, Asp96, Ala120. Katalitik rezidüler arasında Thr15 ve Thr95 önemlidir (Ramya ve ark., 2012).



Şekil 1.2. *Yersina pestis* gram-negatif bakterisinden izole edilen Tip I L-asparaginazın kristal yapısı (Anonymous, 2012).



Şekil 1.3. *Erwinia chrysanthemi* gram-negatif bakterisinden izole edilen Tip II L-asparaginazın kristal yapısı (Anonymous, 2010).



Şekil 1.4. *Erwinia chrysanthemi* aktif esnek bölgeler (Lubkowski, 2003)

1.3. L-asparaginazın Optimum Koşulları

L-asparaginaz enziminin saflaştırıldığı kaynak enzimin optimum pH koşullarının değişmesinde etkilidir. Bazıları asidik, bazıları nötral ve bazıları da alkali pH da kararlılığını sürdürür. Örneğin, *Cyberlindnera jadinii* kökenli L-asparaginaz enzimi pH 4'te 50 °C'de 10 dakika ve 37 °C'de 20 saat aktivite gösterir. Aktivite gösterdiği maksimum pH 10'dur. *Pseudomonas stutzeri* MB 405'den izole edilen enzimin ise pH aralığı 7.5-9.5 arasındadır ve pH 9, 37 °C de maksimum aktivite gösterir (Sinha ve ark., 2013). *T. pyriformis* kökenli L-asparaginaz için optimum pH 9.6'dır. *E. carotovora* L-asparaginaz, alkali pH bölgesinde *E. coli* kökenli enzimden daha karardır. Kanseri hücrelerin tedavisinde kullanılan L-asparaginazın pH 8'in altında etkisini tam olarak gösteremez (Yadav ve ark., 2014).

L-asparaginazın tıpkı pH da olduğu gibi optimum sıcaklık değerleri de kaynağın değişmesiyle farklılaşır, çünkü amino asit sekansı ve yapısı değişir. *Cylindrocarpon obtusisporum* kökenli enzimin optimum sıcaklığı 37 °C'dir ancak, sıcaklık 40 °C ye geldiğinde enzim % 20 oranında aktivite kaybeder. Kaynağı *Azotobacter vinelandii* olan enzim 50 °C'de kararlılığını korumaya devam etmesine rağmen 65 °C'de enzim inaktif olur. *Streptomyces gulbargensis* kökenli enzimin ise alkali pH'da 80 °C'de 1 saat boyunca aktivitesini % 55 oranında koruduğu rapor edilmiştir (Sinha ve ark., 2013). Ama genellikle L-asparaginazın optimum sıcaklığı 37 °C'dir ve 30 °C ile 75 °C gibi geniş bir sıcaklık aralığında aktivitesini sürdürür. Bu sıcaklık aralığı dışında enzim kararsızlaşır. Enzimin bu özelliği asparaginin komple eliminasyonunda önemli bir rol oynar (Yadav ve ark., 2014).

Metaller ve iyonlar enzim aktivitesinin regülasyonunda önemli bir yer tutar. L-asparaginaz enziminin de aktivite göstermesi için veya aktivitesini arttırmak için gerekli metaller ve iyonlar vardır. *Bacillus coagulans* bakterisinden elde edilen enzim K^+ , Li^+ , Na^+ gibi metal iyonların varlığında hızlı ve dönüşümlü bir aktivite gösterir. *Mucor sp.* kökenli L-asparaginaz ise Na^+ metal iyonu varlığında maksimum aktivite gösterirken, *Cylindrocarpon obtusisporum* enzimde CN^- , I^- ve PO_4^{3-} gibi iyonlar aktiviteyi artırır (Sinha ve ark., 2013).

Her enzimin olduğu gibi L-asparaginazın da inhibitörleri mevcuttur. *Escherichia coli* enzimin aktivitesini 5-diazo-4-okso-L-norvalin inhibe eder. Dimetilsülfoksit, glutaraldehit ise % 0.2 konsantrasyonunu aşarlarsa bu enzimi

inhibe edebilirler. Bunun yanı sıra; Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , iyodoasetamid, Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , SDS, üre, Zn^{2+} bu enzimi inhibisyona uğratabilir.

L-asparaginazın inhibitörleri olduğu gibi aktiviteörleri de vardır. *Pseudomonas stutzeri* kökenli enzimde, 2-merkaptoethanol, ditiyotireitol, EDTA, glutatyon, GSH, L-Cys, L-His gibi moleküller aktiviteyi artırırken, *Pectobacterium carotovorum* kökenli enzimde ise 1-amino-6-metil-4-fenil-2-tiyoksi-1, 2, 3, 4- tetrahidropirimidin-5-karboksilik asit metil esteri enzimin aktivitesini artırır.

1.4. L-asparaginazın Depo Kararlılığı

L-asparaginaz enziminin raf ömrü önemli bir faktördür. Bu konu ile çalışan bilim adamları farklı kaynaklardan elde edilen enzim için çeşitli teknik ve sıcaklıklar denemişlerdir. Farklı mikrobiyal kaynaklı enzim farklı depolama koşulları gerektirir. *Bacillus coagulans* L-asparaginazın 6 aydan daha fazla bir süre aktivite gösterir. *E.coli* L-asparaginaz enzimi ise plazma da 1000 U/ml enzim içerecek şekilde depolandığında $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 1 yıl boyunca aktivitesinde bir azalma olmadığı görülmüştür. *Proteus vulgaris* L-asparaginazın $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 ay, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 3.5 M amonyum sülfat çözeltisinde 1 yıl aktivitesini koruduğu rapor edilmiştir (Sinha ve ark., 2013).

1.5. L-asparaginaz Kaynakları

Son 35 yıldır L-asparaginazın üretilmesinde kullanılan kaynaklar bakteriler, algler, bitkiler, mantarlar, fermentler, aktinomisetlerdir (Ahmad ve ark., 2012). Ayrıca L-asparaginaz bazı kemirgen hayvanların serumunda da yaygın olarak bulunmaktadır (Dhanam ve Kannan, 2013). Ticari kullanıma sahip L-asparaginazların en önemli kaynağı bakterilerdir.

1.5.1. Bakteriyel L-asparaginazlar

Bakteriler kolaylıkla üretilbildiğinden ve L-asparaginazın saflaştırılması süreci kolay olduğundan dolayı mikrobiyal kaynaklar L-asparaginaz için çok yaygın olarak kullanılmaktadır. *Erwinia caratovira*, *Corynebacterium gluyamicum*, *Bacillus sp*, *Pseudomonas stutzeri* ve *E.coli* L-asparaginaz üretiminde en çok kullanılan bakterilerdir. *E.coli*'den saflaştırılan L-asparaginaz kanserli hücrelerin aktivitesini

inhibe etmede mükemmel bir ajandır. Bununla beraber *E. chrysanthemi*'den saflaştırılan L-asparaginaz ise farmakolojik olarak etkilidir. Çünkü bu iki L-asparaginaz enzimi farklı immunolojik özelliklere sahiptir. Diğer kemoterapötik ajanların aksine bu bakterilerden saflaştırılan enzimler herhangi bir yan etki veya doku irritasyonu olmaksızın intramüsküler, intravenöz ve subkutan enjeksiyon uygulanarak kullanılabilir (Dhanam ve Kannan, 2013).

1.5.2. Ferment L-asparaginazlar

Günümüzde L-asparaginaz çeşitli ferment kaynaklardan üretilmektedir. Özellikle *Saccharomyces cerevisiae* L-asparaginaz üretiminde kullanılan en önemli fermenttir. Bunun yanı sıra *Candida utilis* ve *Pichia polymorpha* diğer önemli ferment kaynaklarıdır (Ahmad ve ark., 2012).

1.5.3. Fungal L-asparaginaz

L-asparaginaz üretiminde mantarlar önemli bir kaynağı oluştururlar. *A. terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Mucor Sp.* ve *Cylindrocarpon obtusisporum* başlıca kullanılan mantarlardır (Ahmad ve ark., 2012).

1.5.4. Aktinomiset L-asparaginaz

Aktinomiset, prokaryotik bakteriler olup bakterilerin *Eubacteriales* takımında yer alırlar. Bakteriler ile mantarlar arasında bir geçit formudur. Hücre yapıları bakımından bakteri özelliği göstermekle birlikte dallanmış, miselli bir yapı oluştururlar. *Streptomyces longisporusflavus*, *Theramon jarbua*, *Nocardia sp.* ve *Villorita cyprinoids* aktivite gösteren L-asparaginaz enzimine sahip aktinomisetlerdir (Verma ve ark., 2007).

1.5.5. Bitkisel L-asparaginaz

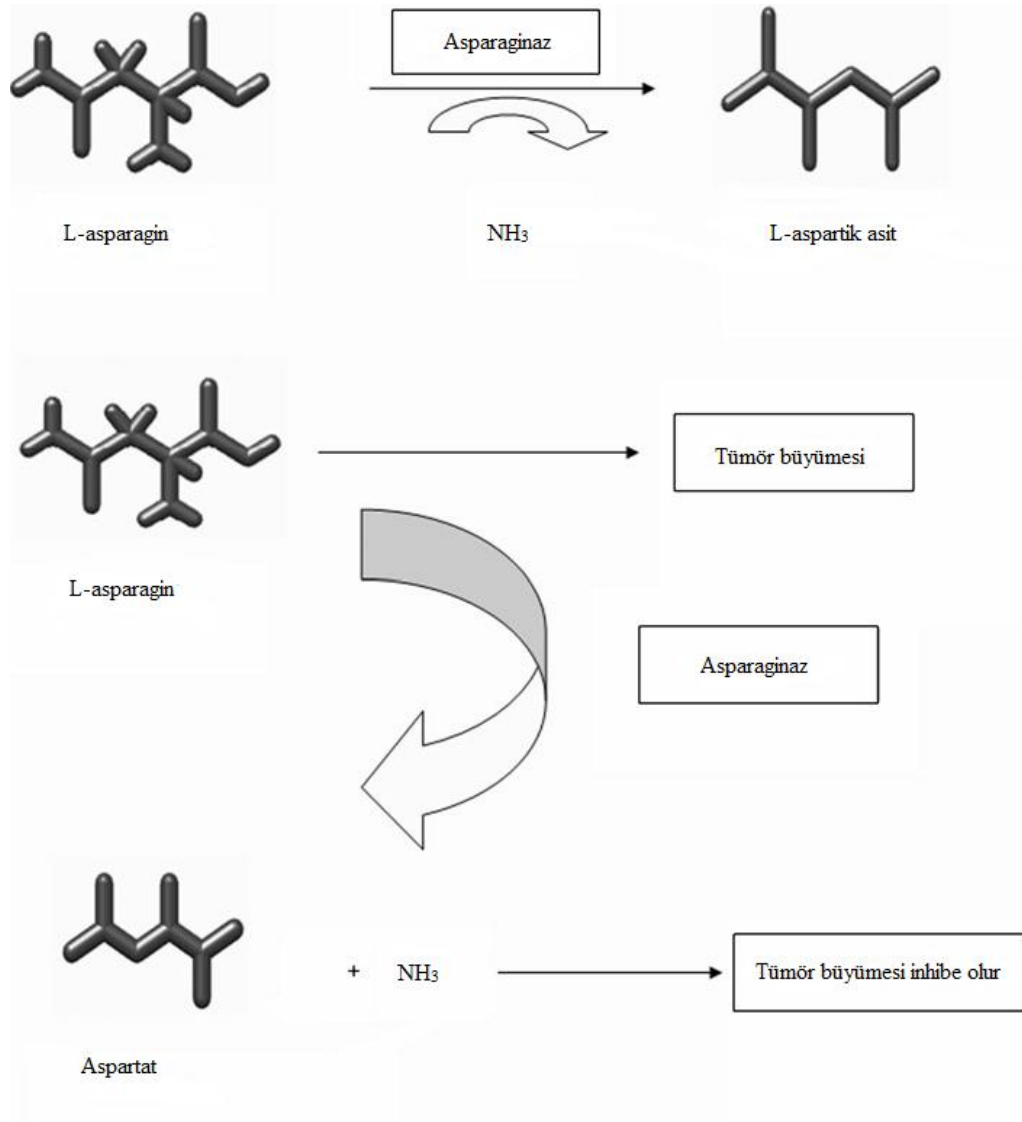
Tıpkı L-asparaginazın diğer kaynakları gibi bitkilerde bu enzimin üretiminde kullanılırlar. *Lupin arabreus*, *Lupin angustiplius*, *Pinus pinaster* ve *Pinus radiata* başlıca kullanılan bitkilerdir (Ahmad ve ark., 2012).

1.5.6. Rekombinant L-asparaginaz

Gen klonlama ve rekombinant DNA gibi modern biyoteknolojiler kullanılarak ticari olarak L-asparaginaz üretimi mümkündür. Günümüzde hala batırılma fermantasyonu (submerged fermentation, SmF) tekniği ile L-asparaginaz üretilmektedir. Bu yöntemin düşük konsantrasyonda ürün oluşumu ve işlem sürecinde oluşan geniş çapta su hacminin bertaraf edilme zorluğu gibi dezavantajları vardır. Bu yüzden SmF pahalı ve bir hayli sorunlu bir tekniktir. Bunun yerine rekombinant L-asparaginaz üretebilme yeteneğine sahip umut verici Moleküler Klonlama ve Genetik Mühendisliği çalışma alanı alternatif bir çözümdür. Henry ve ark., 1986 yılında *E.coli* ve *Erwinia carotovora* bakterilerinden *E. chrysanthemi* asparaginaz geni olarak ifade edilen rekombinant L-asparaginazı üretir ve klonlar. Moola ve ark., 1994 yılında tavşan ve fare poliklonal antiserum ve sentetik heksapeptidleri kullanarak *Erwinia chrysanthemi* epitop üzerinde rekombinant L-asparaginaz çalışmaları yapmıştır. Borisova ve ark., 2003 yılında ise *E. coli* den *Erwinia carotovora* rekombinant L-asparaginaz saflaştırdığını rapor etmiştir (Ahmad ve ark., 2012).

1.6. L-asparaginazın Etki Mekanizması

L-asparagin kanserli hücrelerin gelişimi için esansiyel bir aminoasit olmasına rağmen normal hücreler büyümek için bu amino aside ihtiyaç duymazlar. Çünkü normal hücrelerde asparagin sentetaz enzimi var olduğu için kendileri bu amino asidi sentezleyebilirler. Normal dokuların çoğu kendi metabolik ihtiyaçları için L-Asn sentezlerler ama kanserli hücreler (özellikle Malignant ve Carcinoma hücreler) gelişimleri ve üreyebilmeleri için L-Asn'yi dış kaynaklardan temin ederler. L-asparaginaz varlığında kanserli hücreler bu amino asitten yoksun kalırlar ve ölürlər. Bundan dolayı bu enzim antilösemik ilaç veya antitümör olarak çoğunlukla çocuklarda akut lenfoblastik lösemi (ALL) hastalığının tedavisinde 1961 yılından itibaren kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmaktadır. L-asparaginaz II, akut myelomonositik lösemi, akut myelositik lösemi, Hodgkin hastalığı, limfasarkoma, retiklesarkoma ve melanosarkoma hastalıklarının tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılan en önemli enzimdir.



Şekil 1.5. L-asparaginazın etki mekanizması (Ramya ve ark., 2012).

1.7. L-asparaginazın Kemoterapötik Etkisi

1953 yılında Kidd, kobay farelerin serumlarında antilösemik aktiviteye dair gözlemler kaydetti. 1961 yılında Broome bu antilökemik aktivitenin sebebi olarak asparagin tükenmesine bağlı olduğunu açıkladı. Araştırmacılar hızlı bir şekilde yaptıkları çalışmalardan sonra *Escherichia coli* L-asparaginazın kemoterapötik etkisini doğruladı. 1970'li yıllarda L-asparaginaz tüm ALL'li çocukların tedavi protokollerine dahil edildi ve pediyatrik ALL tedavilerinde önemli bir bileşen haline geldi. Çocukların yanı sıra yetişkinlerin tedavi süreçlerinde de L-asparaginaz kendine yer buldu (Rytting, 2012). L-asparaginazın tam mekanizması halen bilinmemesine

rağmen beta-açıl enzim ara ürünleri yoluyla asparagin amino asidinin amid bağını iki adımda hidrolize eder.

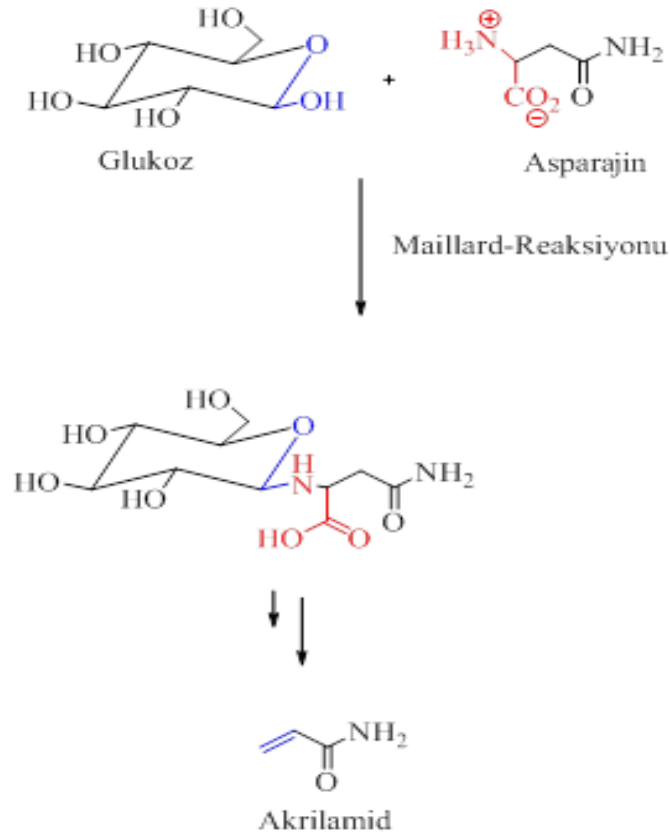
L-asparaginazın kemoterapötik etkisinin yanında katalizlediği reaksiyonlar sonucu oluşan ürünlerinde biyolojik sistemler açısından önemi büyüktür. L-asparaginazın L-Asn'nin amid bağını hidroliz ettiği reaksiyonda substrat olan L-Asn ve ürün olan L-Asp protein sentezinde yapı taşı olarak kullanılmalarının yanında L-Asn protein sentezinde yeniden kullanılan azotun taşınması ve depolanması için önemli bir amino asittir. Ayrıca, L-Asp Krebs ve üre döngüsünde, pürin ve pirimidin sentezinde önemli rollere sahiptirler (Ates, 2007).

1.8. Gıda Endüstrisinde L-asparaginazın Kullanımı

L-asparaginaz bazı amino asitlerin biyosentezinde hayati rol oynarken, karbonhidratça zengin gıdaların ısıtılması sonucu oluşan akrilamid miktarını da azaltıcı bir etkiye sahiptir. Deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar akrilamidin kansere yol açtığını göstermiştir. Bu nedenle Uluslar Arası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) akrilamidi insanlar için muhtemel kanserojen madde olarak sınıflandırmıştır. Akrilamid nişastalı gıdaların pişirilmesi veya kızartılması sonucu oluşan kimyasal bir bileşiktir. Asparagin amino asidi ısıtıldığında zaman Maillard reaksiyonu isimli bir süreçle akrilamide dönüşür.

Nişastalı gıdaların pişirilmeden veya kızartılmadan önce ortama L-asparaginaz eklenmesi ile asparagin amino asidi aspartik asit ve amonyağa dönüştürülür. Böylece asparagin amino asidi Maillard reaksiyonunda yer alamaz ve akrilamid oluşumu önemli şekilde azaltılmış olur. Akrilamidin tamamen uzaklaştırılması mümkün değildir. Çünkü asparagin farklı bağımsız metabolik yollarda da oluşur. L-asparaginaz enzimi sayesinde olası kanserojen bir bileşik olan akrilamid düzeyi önemli bir oranda azaltılabilmektedir (Dhanam ve Kannan, 2013).

L-asparaginazın aynı zamanda bir teşhis biyosensörü olarak da kullanımı mevcuttur. Bu enzim sayesinde, hastaların dolaşımında bulunan mevcut asparagin düzeyi direkt olarak üretilen amonyak miktarı ile ilişkili olduğundan sensör teknolojisinde de uygulamalara tabiidir (Sinha ve ark., 2013).



Şekil 1.6. Maillard reaksiyonu

1.9. Ticari L-asparaginazlar

L-asparaginaz enzim ilacı Elspar, Oncaspar (Pegasparagaz, modifiye versiyon), Crisantaspase, Kidrolase ve Erwinase gibi ticari isimlerle günümüzde satılmaktadır. Elspar, L-asparagin amidohidrolaz enzimini içeren *E.coli* 'den türetilmiş bir markadır. Crisantaspase, *Erwinia chrysanthemi* türevlidir ve çoğunlukla diğer anti kanser ilaçların kombinasyonu ile elde edilir. Kidrolase ALL, lösemik menenjit ve non-Hodgkin lenfoma hastalığının tedavisinde kullanılır. Erwinase radyoterapi kemoterapi protokollerinde kullanılan ticari bir üründür. Klinik uygulamalarda, doğal enzimin sebep olduğu hipersensitif reaksiyonlar gibi olumsuz etkiler modifikasyonla azaltılarak başarılı sonuçlar elde edilebilir. Oncaspar ilacı enzimin polietilen glikol (PEG) ile modifiye olmuş formuyla satılmaktadır. Böylelikle ilacın yarı ömrü artırılır ve ilaç kararlılığı artırılmaktadır (Ramya ve ark., 2012).

1.10. İmmobilizasyon ve İmmobilizasyon Teknikleri

Terim olarak "**immobilize**" kelimesi, hareket kabiliyeti sınırlandırılmış veya tutuklanmış anlamına gelmektedir. Enzim immobilizasyonu ise, serbest veya

çözünmüş formdaki enzimin farklı tipteki taşıyıcılarla tutuklanması ve bunun sonucunda enzimin mobilitesinin azalması ya da kaybetmesi olarak tanımlanmaktadır.

Enzim immobilizasyonu, başlarda sadece enzimoloji araştırmalarında immobilize enzimin serbest enzime göre avantajlarını karşılaştırmak üzere kullanılırdı. Immobilize enzimlerin endüstriyel olarak ilk kullanımı 1967 yılında Chibata ve arkadaşları tarafından *Aspergillus oryzae* türünden izole edilen aminoasılaz (EC 3.5.1.14) enziminin immobilize edildiği rapor edilmiştir. Immobilize enzimin serbest enzime kıyasla pH, çeşitli denatüre edici organik solventler, sıcaklık gibi çevresel faktörlere karşı daha karardır. Son yıllarda ise, immobilize enzim teknolojisinin kullanımı çok gelişmiş olmakla beraber; tıp, antibiyotik üretimi, ilaç metabolizması, gıda endüstrisi, biyodizel üretimi, biyosensör, biyoremediasyon alanlarında ve klinik, endüstriyel ve çevresel örneklerin analiz etmek için multidisipliner çalışmalarda sıkça kullanılan bir yöntemdir. Tablo 1.1'de immobilize enzimlerin kullanım alanlarına örnek gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Enzimlerin immobilizasyon tekniği ile kullanım alanları

Enzim	Taşıyıcı Matriks	Kullanım Alanı
L-asparaginaz	Polietilenlikol	Tıp ve İlaç Metabolizması
Penisilin Asilaz	Poliakrilamid Jel	Antibiyotik Üretimi
Tripsin	Selüloz	Gıda Endüstrisi
Lipaz (<i>Rhizopus</i>)	Poliüretan	Biyodizel Üretimi
Asetilkolinesteraz	Polivinilalkol	Biyosensör
Lipaz (<i>C. rugosa</i>)	Polipropilen Membran	Biyoremediasyon

Uygun koşullar sağlandığı sürece enzimlerin birçok farklı alanda uygulanması mümkündür. Enzimlerin kullanıldığı sistemlerde karşılaşılan en önemli problem enzimlerin aktivite kaybetmesi ve bazı enzimlerin çok pahalı olmasıdır. Ayrıca reaksiyon kontrolü gerektiren sistemlerde kullanılan enzimlerin kontrolü çok güçtür. Bu problemi çözmek için ortama inhibitör eklenebilir ama bu da ekstra bir kirlilik demektir. Enzimlerin reaksiyon ortamından uzaklaştırılması da imkansızdır. Bu sebeple enzimlerden daha çok faydalanmak için immobilizasyon teknikleri

geliştirilmiştir. İmmobilize enzimin serbest enzime göre avantajları aşağıda listelenmiştir.

İmmobilize enzimin serbest enzime göre üstünlükleri;

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir (süzme, santrifüjleme v.b.) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdır.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Doğal enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygundur.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendi kendini parçalama olasılığı azalır.

İmmobilizasyon prosesinde taşıyıcı olarak kullanılacak olan destek materyal ve immobilizasyon yöntemi önemli bir rol oynar. Çünkü hem taşıyıcı sistem hem de yöntem enzimin özelliklerini etkiler. Taşıyıcı olarak kullanılan materyal reaksiyon koşullarının yanı sıra immobilizasyon aşamasında da kimyasal, fiziksel ve biyolojik olarak kararlı olmalıdır. Özellikle endüstride kullanılacak olan taşıyıcılar yeterli mekanik bir kararlılığa sahip olmalıdırlar. Gıda endüstrisinde kullanılması durumunda ise toksik olmamalıdır. Poröz yapı, uygun fonksiyonel gruplara sahip olma, biyobozunur olma, suda çözünmeme ise bu uygulamalarda aranan diğer kriterlerdir.

Tablo 1.2. Taşıyıcıların sınıflandırılması (Brena ve Batista-Viera, 2006).

Organik
Doğal Polimerler
• Polisakkaritler: selüloz, dekstran, agar, agaroz, kitin, aljinat • Protein: albümin, kollajen • Sentetik Polimerler • Polistiren, poliakrilat, polimetakrilat, poliakrilamid, poliamid, vinil polimerler
İnorganik
Doğal Mineraller: bentonit, silika
İşlenmiş Materyaller: Cam (gözeneksiz ve kontrol edilmiş gözenekli), metaller, kontrollü gözeneklere sahip metal oksitler

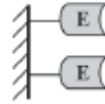
1.10.1. Geri dönüşümsüz immobilizasyon metotları

Geri dönüşümsüz immobilizasyon yöntemlerinde enzim taşıyıcıya bağlanır bağlanmaz, taşıyıcı ve enzimin biyolojik aktiviteleri bozulmadan ayrılmalari söz konusu değildir. Bu metotta kullanılan yaygın teknikler: kovalent bağlama, tutuklama, mikrokapsülleme ve çapraz bağlamadır.

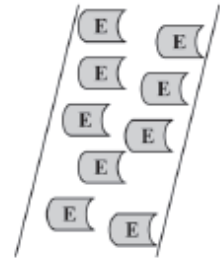
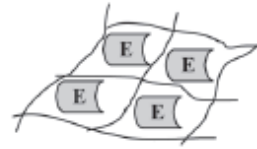
1.10.1.1. Kovalent bağlama

Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde, enzim ve taşıyıcı arasında kovalent bağlanma gerçekleşir. Kovalent bağ güçlü ve kararlı olduğundan dolayı enzimin çözeltiye kaçıışı önlenmiş olur. Dahası bu yöntemde taşıyıcı üzerindeki enzimin lokalize olduğu bölge ve substrat arasında herhangi bir bariyer olmadığı için enzim substratı ile daha çok etkileşim imkanına sahip olur. Bu da enzimin daha fazla aktivite göstermesine olanak sağlar.

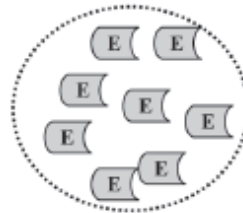
❖ Kovalent Bağlama



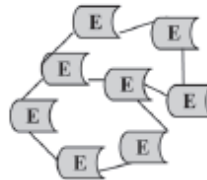
❖ Tutuklama



❖ Mikrokapsülleme



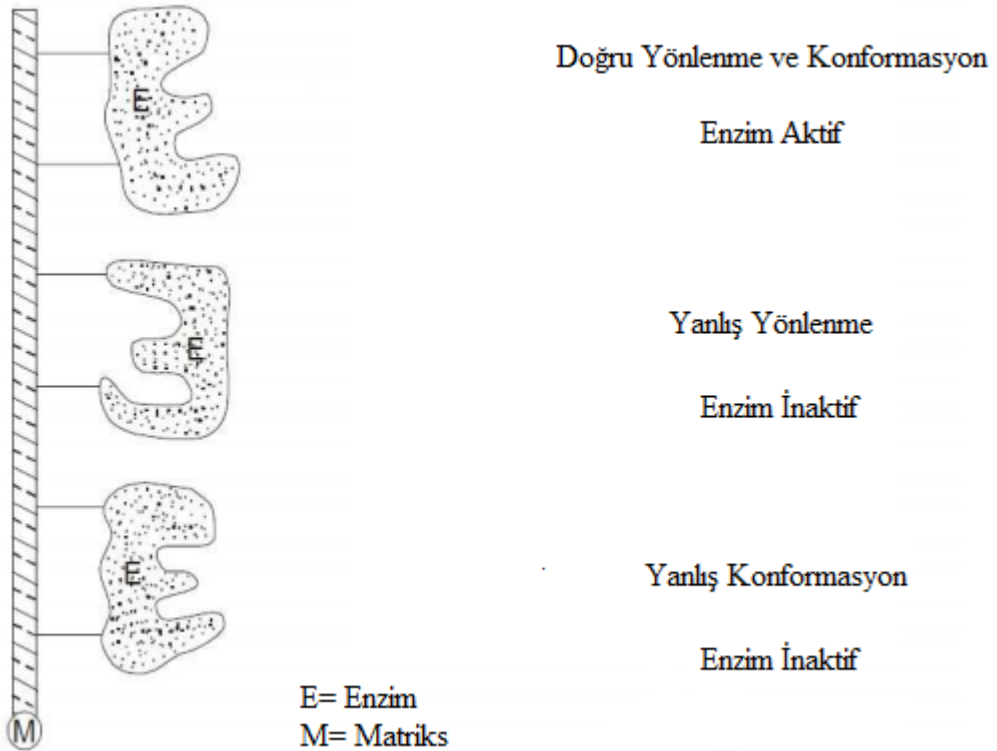
❖ Çapraz Bağlama



Şekil 1.7. Geridönüşümsüz immobilizasyon yöntemleri (Brena ve Batista-Viera, 2006).

Taşıyıcı matriksin sahip olduğu fonksiyonel gruplar ($-S^-$, $-SH$, $-OH$, $-COO^-$, $-NH_3$ gibi) ve enzimin yapısında bulunan aminoasitlerin yan zincirinde bulunan gruplar kovalent bağlanma için önemlidir. Çoğunlukla lizin (amino grubu), sistein (tiyol grubu), aspartik asit ve glutamik asit (karboksilik gruplar) içeren enzimler, taşıyıcı olarak ise agaroz, selüloz, polivinilklorür, porözlü cam kullanılmaktadır. Kovalent bağlama yönteminin kullanılabilirliğini belirleyen en önemli faktör enzimin bağlanma yönüdür. Şayet enzim taşıyıcı ile aktif merkezinden bağlanırsa belli bir aktivite kaybı gözlenebilir. Aktif merkezden kovalent bağlanmayı önlemek için yaygın olarak kullanılan işlem, aktif merkezi yarışmalı inhibitör ile doyurmaktır. Bu yöntemin diğer bir dezavantajı ise enzim taşıyıcı ile yanlış yönelme ile bir bağlanma gerçekleştirirse enzim inaktif olabilir.

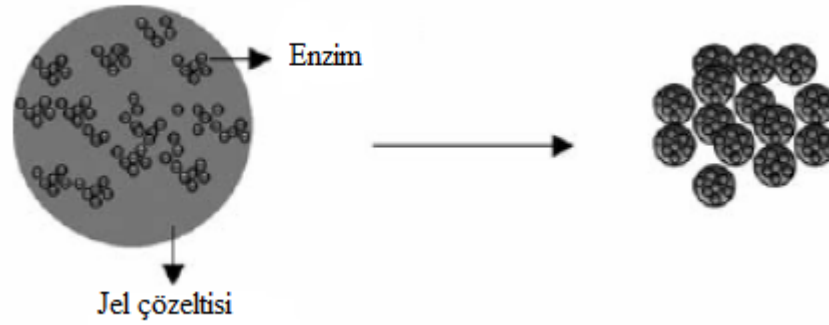
Kovalent bağlanma ile immobilizasyon yöntemi iki basamakta gerçekleştirilir. Öncelikle destek materyal aktifleştirilir. Aktivasyon işlemi için siyanojen bromür, karbodiimit ve glutaraldehit gibi kimyasal reaktifler kullanılır. Sonrasında ise enzim kovalent olarak bağlanır.



Şekil 1.8. Kovalent bağın enzim aktivitesi üzerine olası etkileri (Kar ve Sambamurthy, 2006)

1.10.1.2. Tutuklama

Tutuklama enzimi küçük bir hacimde durmaya zorlamaktır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlarda da gerçekleştirilebilir (Telefoncu, 1997).



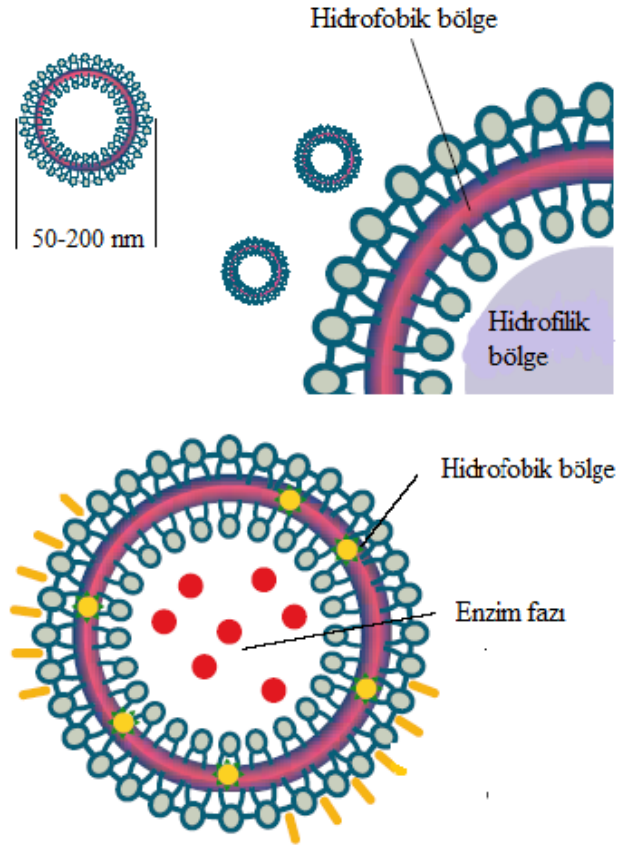
Şekil 1.9. Enzimin tutuklama yöntemi ile immobilizasyonu

Tutuklama yöntemi; polimer matrikste tutuklama, mikrokapsülleme, lipozom tekniği olarak üçe ayrılmaktadır.

Polimer matrikste tutuklama yöntemi, polimerizasyon ve çapraz bağlamanın olduğu ortamda enzimin de bulunması durumunda çapraz bağlama sonucu oluşan kafeslerde enzimin tutulması esasına dayanmaktadır. Enzimler yapay ya da doğal polimer kafesleri içinde tutuklanırlar. Polimer kafesler içine substrat girer ve ürün dışarı çıkar. Çapraz bağlı poliakrilamid jeller, Ca alginat, kappa karragenan bu polimerlerin örneklerindendir.

Mikrokapsülleme yöntemi, enzim yarı geçirgen membran içerisinde hapsediğinden hareket edemez. Substrat gözeneklerden geçerek enzime ulaşır ve ürüne dönüşür. Dolayısıyla polimer membranın gözeneklerinin substrat ve ürünün difüzyonuna izin verir. Bu gözenekler enzim difüzyonunu engelleyecek kadar sıkı olması gerekmektedir. Enzim ile matriks arasında herhangi bir kovalent bağlanma olmadığı için enzimin aktif merkezi korunur. Bu yöntem hızlı, ucuz ve yumuşak reaksiyon koşullarına sahip olma gibi avantajlara sahiptir. Ancak, enzimin zarin içinden kaçma olasılığı fazladır; dolayısıyla enzim sarfiyatı fazladır. Ayrıca kütle transferinin sınırlı olması da bu yöntemin uygulanmasını zorlaştırır (Brena ve Batista-Viera, 2006).

Lipozom tekniği yöntemi, temel olarak fosfolipitlerden oluşan lipozomlar; yapı ve içerik açısından hücre zarına benzerlik göstermeleri, toksik olmamaları ve kimyasal içeriklerinin araştırmacı tarafından belirlenebilmesi nedeni ile bilim adamları tarafından uzun yıllar boyunca model membran olarak kullanılmıştır. Oldukça büyük bir kontakt yüzeyine sahip olup, aynı anda bir adımda birçok enzimin immobilizasyonuna olanak sağlamaktadır. Bunların yanında, substrat ve ürünün membrandan geçişinin znrlēē baēımlı olması, işlem sırasında enzimin aktivite kaybetmesi ve sıvı olan membrandan enzim kaçma olasılıēı bulunmaktadır. Süreksiz, dönüşümlü ve tamamen fiziksel bir yöntemdir (Luisi ve Magid, 1986). Günümüzde kanser kemoterapisi, gen tedavisi ve kozmetik alanlarında lipozom uygulamaları vardır.



şekil 1.10. Enzim immobilizasyonu için lipozom kapsüller

1.10.1.3. Çapraz bağlama

Çapraz bağlama yönteminde herhangi bir taşıyıcıya gerek yoktur. İki veya daha fazla fonksiyonel grup taşıyan enzim moleküllerinin birbirine çapraz bağlanması ve bu şekilde suda çözünmeyen bir kompleks oluşturması temeline dayanır. Moleküller içi ve moleküller arası bağlanmalar söz konusudur. Glutaraldehit ucuz ve ticari olarak yaygın bulunmasından dolayı en çok kullanılan çapraz bağlayıcı ajandır. Diğer kullanılan ajanlara bisizosiyanat, bis-diazobenzidin, geçiş metal iyonları, bovine serum albümin (BSA), dekstran verilebilir (Grecka ve Jastrębska, 2011). Çapraz bağlama yönteminde taşıyıcı olmadığı için maliyet olarak daha ucuzdur. Ayrıca enzim prosedürü basit ve hızlıdır. Bu avantajlara rağmen, çapraz bağlama reaksiyonları sert şartlarda gerçekleştirilir. Sert koşullar enzimin aktif merkezinin konformasyonunu değiştirebilir ve bu da enzimin aktivitesinin önemli bir kısmını kaybetmesine yol açabilir.

1.10.2. Dönüşümlü immobilizasyon metotları

Dönüşümlü immobilize enzimler, enzim-taşıyıcı bağının türünden dolayı ılıman koşullar altında taşıyıcıdan ayrılabilir. Enzim immobilizasyonu için dönüşümlü metotların kullanımı ekonomik nedenlerden dolayı oldukça kullanılıştır. Çünkü enzimin aktivitesi düştüğünde taşıyıcı rejenere edilip taze, kullanılmamış enzim ile tekrar bağlanabilir. Aslında, taşıyıcı masrafı bütün immobilize edilmiş katalizörlerin masraflarında genellikle sık sık dikkat edilen temel faktördür. Enzimlerin tersinir reaksiyonu biyoanalitik sistemlerdeki uygulamalarda özellikle değişken enzimler için son derece önemlidir (Gemeiner, 1992).

1.10.2.1. Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, kullanılan en eski ve en kolay immobilizasyon yöntemidir. Aktif kömür, alümina, iyon değiştirici reçineler, gözenekli cam, silikajel, bentonit, nişasta ve gluten enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar malzemelerdir. Yüzey aktif, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim zltisi ile karıştırılması ve enzimin aşırısının yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır (Nelson ve Griffen, 1916). Yöntem ucuz ve basit olma gibi avantajlarına rağmen, enzim ve matriksin yüzeyi arasında iyonik bağ, hidrojen bağı ve Van der Waals gibi

zayıf etkileşimler olmasından dolayı enzim kaçıışı söz konusudur (Brady ve Jordan, 2009).

1.10.2.2. İyonik bağlanma

Bu yöntemin prensibi; kromatografide kullanılan protein-ligand etkileşiminin temeline dayanır (Nisha, Arun ve Gobi, 2012). Metod basit ve dönüşümlüdür fakat genel olarak enzimlerin bağlarının güçlü olması ve tam olarak aktif oldukları koşulları bulmak oldukça zordur (Roy ve Gupta, 2003). İyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik olarak bağlanması esasına dayanmaktadır. İyonik bağlanma çok ılıman koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezinde değişikliğe sebep olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından enzim kaçıışı söz konusudur.

1.10.2.3. Affinite bağlanma

Bu yöntemde, enzimler ile antikorlar ve lektinler arasındaki biyospesifik etkileşimlerden yararlanarak enzimler immobilize edilmektedirler. Biyospesifik bağlanma ile immobilize edilen enzimin substratı ile etkileşimi daha fazladır.

1.10.2.4. Metal bağlanma

Bu yöntemde, Titan(III), Titan(IV), Zirkonyum (IV) gibi bazı geçiş metallerinin şelat yapma özellikleri sayesinde enzimlerin organik ve inorganik taşıyıcılara bağlanması sağlanmaktadır (Brena ve Batista-Viera, 2006).

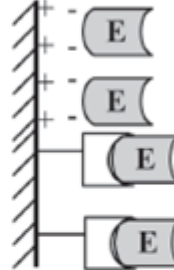
1.10.2.5. Disülfid bağı

Bu yöntem benzersizdir çünkü matriks ve enzim arasında kovalent bağlanma olmasına rağmen ditiyotritol (DTT) gibi uygun ajanlar kullanılarak yumuşak koşullar altında bu bağ kırılabilir (Brena ve Batista-Viera, 2006). Buna ek olarak, tiyol gruplarının reaktivitesi pH değişmesi ile modüle edilebildiğinden metodun aktivite verimi genellikle yüksektir (Carlsson, Batista-Viera ve Rydén, 1998).

❖ Adsorpsiyon



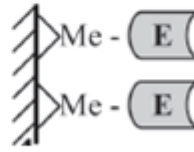
❖ İyonik Bağlanma



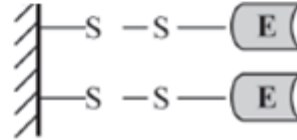
❖ Affinite Bağlanma



❖ Metal Bağlanma



❖ Disülfid Bağı



Şekil 1.11. Geridönüşümlü immobilizasyon yöntemleri (Brena ve Batista-Viera, 2006).

Enzim immobilizasyon metotları gıda endüstrisi, tekstil endüstrisi, ilaç ve deterjan endüstrisinde, biyoremediasyonda sıkça kullanılmaktadır. Immobilizasyon yöntemleri teknik ve ekonomik avantajlarından dolayı önem kazanmıştır. Enzimlerin maliyetinin fazla olma sebebi de bu yöntemlerin önemini ve kullanımını daha da çok arttırmaktadır.

1.11. Biyotaşıyıcılar: Biyouyumlu Polimerler

Bir canlı hücreden enzim izolasyonu ve saflaştırılması oldukça pahalı süreçlerle yapılmaktadır. Bu nedenle enzimler genellikle pahalıdır ve endüstriyel uygulamalarda serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması oldukça zordur. Serbest enzimin reaksiyon ortamından istenildiği anda uzaklaştırılamaması reaksiyonun kontrolünü güçleştirir. Serbest enzimi reaksiyon ortamında etkisiz hale getirebilmek için kullanılan inhibitörler ise serbest enzim tarafından kirletilen reaksiyon ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru olarak eklenir. Reaksiyon ortamındaki bu kirlilik unsurlarının uzaklaştırılmaya çalışılması maliyeti artırmaktadır. Bunun

yanı sıra serbest enzimler sürekli üretim işlemlerinde de tercih edilmezler. Enzimlerin birçok alanda çeşitli amaçlarla kullanılmaya başlanması nedeniyle, enzimleri daha ekonomik ve kullanışlı hale getirme çalışmaları artmıştır. Bu nedenle serbest enzimlerden daha fazla yararlanabilmek için immobilizasyon teknikleri geliştirilmiştir (Uygun, Aktaş ve Karagözler, 2012). Bu destek materyalleri jel matriks, membran formunda polimerik veya inorganik katı, partikül veya mikroküre formunda bulunabilirler (Aksoy, 1998). Enzimlerin klinik, tıp ve eczacılık alanlardaki kullanımı git gide artmaktadır. Özellikle enzimlerin canlı sistemlerde bazı onkolojik hastalıklarda ilaç olarak kullanılması hem immobilizasyonu hem de kullanılacak destek materyali daha önemli hale getirmiştir. Özellikle enzimi taşıyacak olan matriks sistem daha ön plana çıkmaktadır. Canlı sistemlerde vücuda yabancı maddelere karşı oluşan biyotransformasyon metabolizması enzim ilaçların kullanımını kısıtlamaktadır. Enzim ilaçlar da diğer her yabancı madde gibi vücut tarafından ksenobiyotik olarak değerlendirilir ve metabolize edilir. Dolayısıyla enzim kaynaklı ilacın hastalığa karşı etki süresi büyük ölçüde azalmaktadır.

İlacın etki süresini arttırmak için en kolay çözüm canlı sistemlere uygun doğal veya inorganik materyaller kullanmaktır. Biyotaşıyıcı olarak günümüzde yaygın olarak en çok kullanılan taşıyıcılar doğal, modifiye (yarı sentetik) ve sentetik biyoyumlu polimerlerdir.

1.11.1. Doğal Polimerler

Doğal polimerler, doğada kendiliğinden oluşan polimerlerdir ve insanlar her dönemde bu polimerleri değişik alanlarda kullanmışlardır. Çok farklı doğal polimerler vardır. Bitki ve ağaçların temel yapısını oluşturan selüloz doğada en bol bulunan polimerdir, pamuğun temel bileşeni de selülozdur. Selüloz gibi genelde doğal polimerlerin önemli bir kısmı canlıların yapısında yer alır. Yün, saç, tırnak protein yapısındaki doğal polimerlere örneklerdir. Proteinler (kollojen, jelatin, elastin, aktin vb.), polisakkaritler (selüloz, nişasta, dekstran, kitin vb.) ve polinükleotidler (DNA ve RNA) başlıca doğal polimerlerdir (Sacak, 2004). Immobilizasyonda yaygın olarak kullanılan en önemli doğal taşıyıcılardan birisi agarozdur. Yüksek gözenekli yapısına ilaveten, proteinler için yüksek kapasite sağlarlar. Matriks olarak agarozu kullanmanın bazı diğer avantajları; hidrofilik karakterde olması, türevlerine dönüştürmenin kolay olması, yüklü grupların

olmaması (substrat ve ürünlerin spesifik olmayan adsorpsiyonunu engellemek için) ve ticari geçerliliğidir. Ancak diğer gözenekli yapılarda ve agarozun kullanımında yüksek maliyet önemli derecede sınırlanmaya neden olur. Bu problem, matriks rejenerasyonu ve tekrar kullanımına izin veren dönüşümlü metodların geliştirilmesiyle ancak çözülebilir.

Aljinat, mannurik ve guluronik asit birimlerinden meydana gelen doğal bir polimerdir. Kolay ulaşılabilir oluşu ve düşük maliyeti nedeniyle immobilizasyon matriksi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca aljinat enzimlere inert sulu bir ortam sağlaması ve geniş gözenekleri sayesinde moleküllerin hızlı difüzyonuna izin vermesi nedeniyle tercih edilen bir enzim immobilizasyon destek materyalidir (Kumar, 2006).

Kitosan, yengeç ve karides gibi kabuklu deniz ürünlerinin dış iskeletlerinde, kelebeklerin kanatlarında, mantarların hücre duvarlarında vb. bulunan doğal bir polisakkarit olan kitin'den kısmi deasetilasyon yoluyla elde edilen, reaktif fonksiyonel amino gruplarına sahip; kimyasal yapı olarak selüloza benzeyen ve doğada selülozdan sonra en sık rastlanan biyopolimerdir (Shepherd, Reader ve Falshaw 1997; Terbojevich, Muzarelli, 2000). Kitosan, çöktürme, nem tutma, film oluşturma, antimikrobiyal etki, enzim immobilizasyonu gibi çok çeşitli fonksiyonları nedeniyle ilaç, kozmetik, tıp, tarım gibi çeşitli endüstrilerde sınırsız kullanım alanlarına sahiptir.

1.11.2. Sentetik Biyouyumlu Polimerler

En yaygın olarak kullanılan sentetik polimer lineer, non-toksik ve non-immünogenetik oluşu sebebiyle polietilen glikol (PEG) olmuştur. PEG, polimer-protein konjugatları oluşturur ve pek çok lisanslı ilacın formülasyonuna girmiştir.

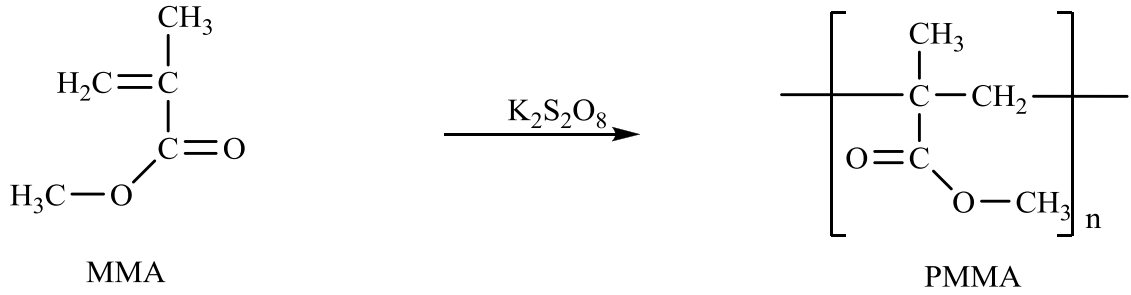
Polivinil alkol (PVA) enzim immobilizasyonunda sıkça kullanılan, toksik olmayan, ucuz ve sentetik bir materyaldir. PVA'e immobilizasyon basit ve ucuz olan PVA-borik asit metodu ile gerçekleştirilir. Bu metodun tek dezavantajı çökmeye meyilli oluşudur. Bu dezavantaj ortama aljinat eklenmesi ile giderilebilmektedir (Idris, 2008).

Polivinilpirolidon (PVP), N-vinil-2-pirolidon'un polimerleşmesiyle elde edilir. Tutkal, meşrubat, kozmetik ve deterjan yapımında, litografide, medikal

uygulamalarda, kağıt üretiminde, farmosetiklerde, fotoğrafçılıkta ve tekstilde sıkça kullanılan bir polimerdir.

1.12. Poli(metil metakrilat) (PMMA)

Yüksek saydamlıkta termoplastik bir polimer olup metilmetakrilat (MMA) monomerinin emülsiyon polimerizasyonu ile elde edilir.

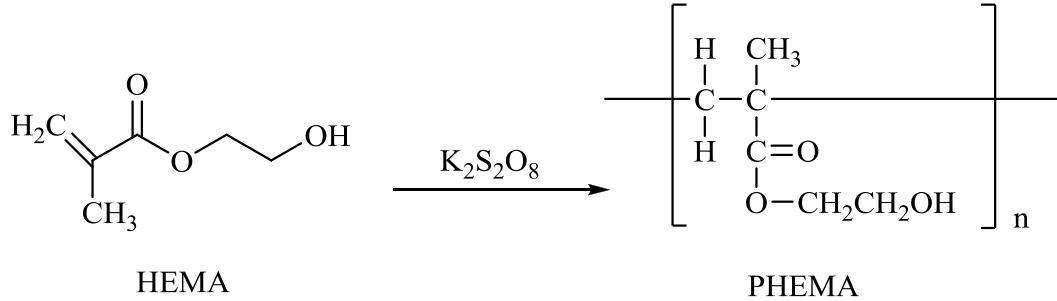


Şekil 1.12. PMMA'nın sentez reaksiyonu

Molekül formülü $(\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2)_n$ olup, molekül ağırlığı değişkendir ve özgül ağırlığı $1,18 \text{ g/cm}^3$ 'dir. Kırılma indeksi $587,6 \text{ nm}$ 'de $1,4914$ 'dür ve görünür ışığı % 92 oranında iletir. Isıya karşı da stabil olup 125°C 'de yumuşar ve bir termoplastik madde gibi davranır. $125\text{-}200^\circ\text{C}$ arasında ise depolimerizasyon meydana gelir. Su absorblama kapasitesi düşük olup % 0.3-0.4 civarındadır. Lucite, Acrylite, Plexiglas optix, Altuglas, Oroglass, Perspex gibi ticari isimleriyle satılır ve bir çok alanda cam olarak kullanılırlar. PMMA çevresel kararlılık bakımından diğer önemli polimerlerden (polistiren, polietilen gibi) daha üstündür. Hafif olmasına rağmen güçlü bir materyaldir. PMMA kokusu olan bir polimerdir ve çoğu organik çözügenlerde çözünür. Akrilik olarak da isimlendirilen PMMA, günümüzde, sentetik elyaf ve boyalarda kullanılır. Çok serttir ve camdan daha saydamdır. Dünya Savaşı zamanında uçak güneşliklerinin ve denizaltı periskoplarının yapımında kullanılan pleksiglas, şimdilerde özellikle, açık hava reklamcılık sektöründe, basketbol potalarında, mobilya ve dekorasyon sanayiinde, yatlarda, otomotiv yan sanayinde ve camın kullanılabileceği her alanda alternatif malzeme olarak kullanılmaktadır (Loubat, 2001). İnsan vücuduyla son derece uyumlu bir polimerdir. Bundan dolayı kontakt lens, kemik dolgu maddesi olarak ve membran diyalizinde de kullanılır. Ayrıca, dişçiler diş restorasyonunda kullanılmaktadır. Tıp alanında yaygın olarak kullanımı bilimsel çalışmalardaki önemini arttırmıştır.

1.12. Poli(2-hidroksietilmetakrilat) (HEMA)

PHEMA, hidroksietilmetakrilat monomerinin emülsiyon polimerizasyonu ile elde edilen bir polimerdir.



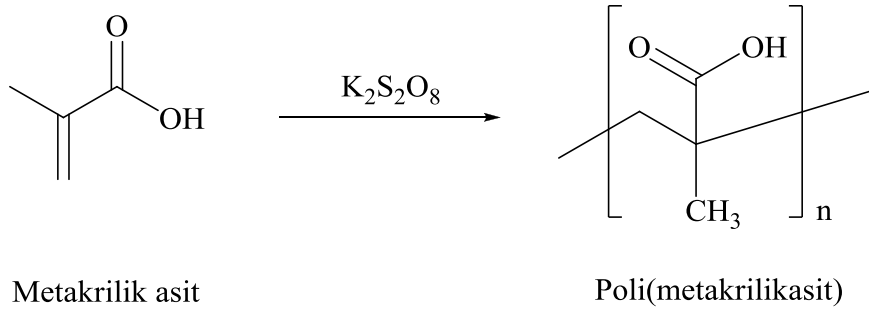
Şekil 1.13. PHEMA'nın sentez reaksiyonu

Molekül formülü $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3)_n$ olup, molekül ağırlığı değişkendir. IUPAC ismi poli(2-hidroksietilmetakrilat)'tır. PHEMA veya hidron olarak da adlandırılır. DMF ve etanol ile çözünür. Yoğunluğu oda sıcaklığında 1.15 g/ml'dir. Camsı geçiş sıcaklığı (Tg) 55°C'dir. Yumuşak, esnek ve su absorblayıcı plastik bir malzemedir. HEMA toksik olmasına rağmen PHEMA non-toksik bir sentetik hidrojeldir. PHEMA, sahip olduğu su içeriği nedeniyle, doğal dokulara büyük bir benzerlik gösterir. Normal biyolojik reaksiyonlarda inert'tir. Bozunmaya dirençlidir, vücut tarafından emilmez, ısıyla steril edilebilir, çok değişik şekil ve formlarda hazırlanabilir. PHEMA pH'a duyarlı anyonik bir hidrojeldir. Nötral ve yüksek pH ortamında şişerken, asidik ortamda şişmez. İlk olarak 1954 yılında optik implant olarak kullanılmıştır. Wichterle bu polimerin kontakt lens yapıma uygun bir malzeme olduğu düşüncesiyle ilk patentini almıştır ve sonraki yıllarda PHEMA hidrojelleri kontakt lens yapımında yaygın olarak kullanılan bir malzeme haline gelmiştir. Ayrıca, son yıllardaki en önemli uygulamalardan biri de eczacılık alanında, kontrollü ilaç salan sistemlerdeki kullanımıyla ön plana çıkmıştır. Örnek olarak insülin salımı verilebilir; insülin salımının kontrolü, glikoz seviyesinde artma olduğunda daha fazla insülin salabilen akıllı hidrojellerin yardımıyla başarılabilmektedir (Huang, 2012). PHEMA hidrojelleri vücut dokularına benzer yüksek bir su içeriğine sahip olduğundan günümüzde kornea implantların üretiminde, üreterlerin, kardiyovasküler implantların ve cerrahi ve doku onarımı ve çoğu dişçilik uygulamalarında kullanılmaktadır.

(Tomar ve ark., 2012). Poli (hidroksietil metakrilat) hidrojelleri bozuk eklem kıkırdığı yerine kullanılabilecek umut verici biyomateriyaller olarak önerilmiştir.

1.13. Poli(metakrilik asit) (PMA)

IUPAC'a göre 2-metil-2-propenoik asit homopolimer olarak adlandırılır. Kapalı formülü $(C_4H_6O_2)_n$ olup moleküler ağırlığı değişkendir. Suda çözünen bir polimerdir. Ticari olarak sodyum tuzu formuyla satılmaktadır. Metakrilik asit monomerinin emülsiyon polimerizasyonu ile elde edilmektedir.



Şekil 1.14. PMA'nın sentez reaksiyonu

Camsı geçiş sıcaklığı 228 °C'dir. Oda sıcaklığında yoğunluğu 1.251 g/ml'dir. Renksizdir, sıvı veya kristal formda bulunabilir. PMA, biyoaktiflik, pH ve iyonik güç duyarlılığı gibi spesifik özelliklere sahip olduğundan en yaygın olarak kullanılan hidrofilik polimerdir. Biyouyumlu bir hidrojeldir (Martin 2010).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

L-asparaginazın klinik kullanımı ile ilgili literatürde oldukça çok sayıda makale mevcut iken L-asparaginazın polimerik sistemlere immobilizasyonu konusunda literatür sınırlıdır. Çalışmamızın konusu temel olarak L-asparaginazın polimerik sistemlere immobilizasyon olması nedeniyle kaynak özetleri kısmında klinik çalışmalardan ziyade immobilizasyon çalışmalarına yer verilmiştir.

Jean-François ve Fortier, 1996 yılında biyoyumlu polietilen glikol-albümin hidrojellerine *E.coli* kökenli L-asparaginaz enzimini immobilize etmişlerdir. Araştırma bulgularının sonuçlarında, immobilize enzimin optimum pH aralığının serbest enzime göre daha geniş bir aralıkta olduğunu belirlemişlerdir. Serbest enzimin fizyolojik pH'da (pH:7.3) aktivitesinin % 43 iken immobilize enzimin % 90 oranında aktivite gösterdiğini ve buna ek olarak yarı ömrünün 2 gün olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu sonuçları matriks olarak kullanılan biyoyumlu PEG-albümin hidrojellerine dayandırmışlardır (Jean-François ve Fortier, 1996).

Vina ve ark., 2001 yılında, *Erwinia* kökenli L-asparaginazın polisakkarit tabakalar üzerine kovalent bağlama yöntemi ile immobilize etmeye çalışarak, immobilize enzimin antikanser, immünomodülatör ve diğer biyolojik aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırma bulgularında serbest enzimin aktivitesini % 100 alıp bu değer üzerinden immobilize enzimin % 58-90 aralığında aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir (Vina, Karsakevich ve Bekers, 2001).

Zhang ve ark., 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada, ipek böceğinden saflaştırılan doğal ipek polimer mikropartiküllerine L-asparaginazı immobilize etmişlerdir. Saflaştırılan bu enzimin aktivite ve optimum koşullarını belirlemişlerdir. Immobilize enzimin *in vitro* yarı ömrünü 8 gün olarak rapor etmişlerdir (Zhang, Tao, Shen, Zhou, Ding, Ma ve Zhou, 2003).

Ciesarova ve ark., 2006 yılında nişastaca zengin patates türevli ürünlerdeki akrilamid oluşumuna L-asparaginaz enziminin etkisini araştırmışlardır. Örnekler 180 °C'de 20 dakika inkübe edildiğinde % 97 oranından fazla akrilamid oluşumu gözlemlendiği ve sonra L-asparaginaz enziminin eklenmesiyle akrilamid düzeyinin % 70'lere düştüğünü rapor etmişlerdir (Ciesarová, Kíss ve Boegl, 2006).

Ghosh ve ark., 2008 yılında polianilin nanofiberlerine L-asparaginaz enzimini immobilize etmişler ve serbest enzim ile karşılaştırmışlardır. Farklı

konsantrasyonlardaki polianilin nanofiberlerine immobilize edilen enzim serbest enzime göre çeşitli pH ve sıcaklık değerlerinde daha stabil olduğunu ayrıca daha düşük bir K_m değerine sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Ghosh, Chaganti ve Prakasham, 2008).

Teodor ve ark., 2009 yılında yaptıkları çalışmada, *E.coli*'den saflaştırılan L-asparaginaz enzimini tutuklama yöntemiyle biyoyumlu hidrojel-manyetik nanopartiküllere immobilize etmişlerdir. L-asparaginazın immobilizasyon verimini % 43-90 aralığında belirlemişlerdir (Teodor, Litescu, Lazar ve Somoghi, 2009).

Kukurova ve ark., L-asparaginazın kızartılmış hamur pasta modelindeki akrilamid üzerine etkisini araştırmışlardır. 180-200 °C'de kızartılan hamur pasta örneklerine 100-500 U/kg L-asparaginaz ilave edilmesi sonucunda akrilamid seviyesinin % 96-97 oranında azaldığını dahası asparaginazın glutamin ve glutamik asit oluşumunu da etkilediğini ortaya koymuşlardır (Kukurova, Morales, Bednarikova ve Ciesarova, 2009).

Tabandeh ve Aminlari, son yıllarda biyokonjugasyon protokollerinin farmokinetik ve immünolojik alanlarda gelişmesine dikkat çekmişlerdir. Çalışmalarında okside inülin-L-asparaginaz konjugatları sentezleyerek immobilize enzimin immünolojik ve fizikokimyasal özelliklerini araştırmışlardır. Okside inülin-enzim 2:1 ve 4:1 oranında katkılanarak modifikasyon sağlanmıştır. Sonuç olarak, immobilize enzimin serbest enzime kıyasla yarı ömrü ve termokararlılığı artmış, tripsin sindirimine karşı daha dirençli bir hal almakla beraber tekrar kullanılabilirliği de sağlandığı rapor edilmiştir (Tabandeh ve Aminlari, 2009).

Maysa ve ark., 2010 yılında yaptıkları bir araştırmada L-asparaginazın antitümör aktivitesini ve farklı taşıyıcıya immobilize ederek enzim aktivitesini ölçmüşlerdir. *Bacillus sp* R36 kaynağından saflaştırılan L-asparaginaz enzimi glutaraldehit ile önceden aktiveleştirilmiş sekiz farklı taşıyıcıya (aktif karbon, selit, kitin, karboksimetil selüloz, yumurta kabuğu, silikajel, trikalsiyum fosfat ve kitosan) immobilize etmişlerdir. Her bir taşıyıcı için 50U/g enzim kullanmışlardır. Araştırma bulgularında en düşük aktiviteyi kitosan (% 17.8), en yüksek aktiviteyi ise aktif karbona immobilize edilmiş enzimin gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca *in vitro* olarak iki tümörlü hücrede enzimin antitümör etkisine bakmışlar ve sonuçta, kanserli hücrelerin büyük oranda inhibisyona uğradığını belirtmişlerdir (Maysa, Amira ve Sanaa, 2010).

Anese ve ark., olası kanserojen molekül olarak belirtilen akrilamid üzerine antikanserojenik ajan olan L-asparaginazın etkisini araştırmışlardır. Bisküvi örneklerinin inkübe edildikten sonra 500 U/kg L-asparaginaz enziminin eklenmesiyle akrilamid oluşumunun azaldığını ve L-asparaginaz enziminin bu uygulamalarda model bir enzim olduğunu rapor etmişlerdir (Anese, Quarta ve Frias, 2011).

Pedreschi ve ark., ticari L-asparaginaz kullanarak patates cipslerindeki akrilamid oluşumunu azaltmaya yönelik bir çalışma yapmışlardır. Patates cipslerinin farklı sıcaklıklarda inkübasyonu sonucunda 10000U L-asparaginaz eklenmesiyle akrilamid oluşumunu % 90 oranında azalttığını rapor etmişlerdir (Pedreschi, Mariotti, Grandby ve Risum, 2012) .

Sundaramoorthi, Rajakumari ve ark., Arabistan denizinde bulunan mantarlardan izole edilen L-asparaginazı farklı taşıyıcılara (silikajel, agaroz, aktif karbon, selit, karboksimetil selüloz, yumurta kabuğu, trikalsiyum fosfat) immobilize etmişlerdir. En yüksek aktiviteyi silikajel taşıyıcısına immobilize edilen enzimin gösterdiğini rapor etmişlerdir (Sundaramoorthi, Rajakumari, Dharamsi ve Vengadeshprabhu, 2012).

El-Sayed ve ark., *Vicia faba* ve *Phaseolus vulgaris* mikroorganizmalarından elde edilen iki farklı L-asparaginazı (sırasıyla A ve B) trikalsiyum fosfat, aktif karbon, silikajel ve karboksimetil selüloz taşıyıcılarına başarılı bir şekilde immobilize etmişlerdir. İmmobilize A enzimi için uygun taşıyıcı silikajel, immobilize B enzimi için ise karboksimetil selüloz olarak not edilmiştir. İmmobilize enzimlerin pH aralığı 7 - 8.5 olarak kaydedilirken, sıcaklık 55 °C'ye arttırıldığı zaman immobilize enzimlerin aktivitesinde sadece sırasıyla % 15 ve % 10 oranında bir kayıp olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda ekip, L-asparaginazın antikanser etkisine bakmış ve kanserli hücreleri sırasıyla 217.71 µg/mL ve 187.86 µg/mL değerlerinde inhibe ettiği çalışma ekibi tarafından rapor edilmiştir (El-Sayed, Fyad ve Gamal-Eldeen, 2012).

Kumar ve ark., 2013 yılında yayımlanan bir çalışmalarında *Cladosporium sp.* kaynağından saflaştırılan L-asparaginaz enziminin farklı derişimlerde (50-300 U) tatlı ekmek örneklerine eklenmesiyle bu ekmeklerin ısıtılması sonucu oluşan akrilamidi % 73-97 aralığında azalttığını rapor etmişlerdir. Böylece, bu enzimin endüstriyel ve gıda uygulamalarındaki potansiyeline de dikkat çekmişlerdir (Kumar, Shimray, Indrani ve Manonmani, 2013).

Ahmad ve ark., *Bacillus licheniformis* STRAIN HSA3-1a termofilik bakterisinden saflaştırılan L-asparaginaz enzimini glutaraldehit-karbon taşıyıcısına immobilize ederek optimum koşullarını belirlemişlerdir. Sonuçlara göre; bakteriden saflaştırılan serbest enzimin optimum aktivite gösterdiği pH:8, sıcaklık 50 °C iken, immobilize enzimin optimum aktivite gösterdiği pH:7, optimum aktivite gösterdiği sıcaklığı ise 60 °C olarak saptamışlardır. İmmobilize enzimin spesifik aktivitesini 499.27 IU/mg olduğunu ayrıca immobilize enzimin iki kez kullanımından sonra aktivitesini % 84.79 oranında koruduğunu rapor etmişlerdir (Ahmad, Patta ve Natsır, 2013).

Ashrafi ve ark., farklı zincir uzunluklarına sahip (C₁₂, C₁₆ ve C₂₂) yağ asitlerini L-asparaginaz enzimi ile kovalent bağ ile modifiye ederek yeni bir L-asparaginaz enzimi modeli oluşturmaya çalışmışlardır. İmmobilize enzim ile serbest enzimi karşılaştırarak lipid etkisini ortaya koymuşlardır. Araştırma sonucunda, yağ asidi konjugatlı enzim proteoliz olayına ve farklı pH koşullarına karşı daha stabil bir hal almış ve plazma yarı ömrü artmıştır. Dahası, enzim lipid tabakası sayesinde ise hidrofobikliği 15 kat artmıştır (Ashrafi, Amini, Samania, Ghasemi, Azadi, Tabandeh, Sarvestani ve Daneshamouz, 2013).

Kumar ve ark., , glutaraldehit çapraz bağlayıcı ajanı ile aktifleştirilen N-bromosüßinimid, mono-metoksi polietilen glikol, bovine serum albümin (BSA) ve ovalbümin (OVA) konjugatlarına *Cladosporium sp.* kökenli L-asparaginaz enzimini immobilize etmişlerdir. Araştırma sonuçlarında en yüksek aktiviteyi albümin modifiyeli enzim göstermiştir. *In vitro* yarı ömrü en uzun olan ise PEG modifiyeli enzimin olduğunu rapor etmişlerdir (Kumar, Kishore ve Manonmani, 2014).

Karamitros ve ark., terapötik asparaginaz enziminin katalitik aktivitesini korumak ve biyokimyasal kararlılığını arttırmak için biyouyumlu çok tabakalı polielektrolit mikrokapsüller önermiştir. Mikrokapsüller içerisine L-asparaginaz enzimi mikrokapsülleme tekniğı ile immobilize edilmiştir. Araştırma sonucunda immobilize enzim serbest enzim ile kıyaslanmıştır. İmmobilize enzim mikrokapsüller sayesinde katalitik aktivitesini korumuş, biyokimyasal stabilitesi artmış, *in vitro* ortamda proteazlara karşı dirençli hale gelmekle beraber, aynı zamanda *in vivo* olarak da enzimin kandaki yarı ömrü artmıştır (Karamitros, Yashchenok, Möhwald, Skirtach ve Konrad, 2013).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Araştırmada kullanılan tüm reaktifler analitik saflıkta olup kullanılan kimyasallar şunlardır: L-asparaginaz (Leunase), L-asparagin (Sigma), trikloroasetik asit (Riedel de Haen), metilmetakrilat (Alfa Aesar), hidroksietilmetakrilat (Aldrich), metakrilik asit (Merck), nişasta (Merck), sodyum asetat (Merck), asetik asit (Sigma), potasyum iyodür (Merck), civa(II) iyodür (Merck), sodyum hidroksit (Merck), tris (Merck), hidroklorik asit (Merck), potasyum persülfat (Riedel de Haen), etil alkol (Sigma), toluen (Merck), dimetilsülfoksit (Merck), dimetilformamid (Merck).

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

pH metre (Cyberscan 1000), etüv (Heraeus), shaker (Wisesake SHO-1D), su banyosu (Wisebath), santrifüj (Hettich universal 320R), terazi (Shimadzu ATX224), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), manyetik karıştırıcılı ısıtıcı (IKA C-MAG HS7), vorteks (Fision Whırlı Mixer), FT-IR (Wattson 1000), DSC-60 (Shimadzu), DTA-50 (Shimadzu), TGA-50 (Shimadzu), sıvı temas açısı ölçüm cihazı (SEO Phoenix 300) .

3.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

0.05 M pH:4 asetat tamponu: 4.1 g sodyum asetat ($M_A:82.03$ g/mol) biraz distile suda çözündü ve derişik glasiyel asetik asit çözeltisi eklenerek pH 4'e ayarlandı ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.05 M pH:5 asetat tamponu: 4.1 g sodyum asetat ($M_A:82.03$ g/mol) biraz distile suda çözündü ve derişik glasiyel asetik asit çözeltisi eklenerek pH 5'e ayarlandı ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.05 M pH:6 asetat tamponu: 4.1 g sodyum asetat ($M_A:82.03$ g/mol) biraz distile suda çözündü ve derişik glasiyel asetik asit çözeltisi eklenerek pH 6'ya ayarlandı ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.05 M pH:7 Tris-HCl tamponu: 6.07 g Tris ($M_A:121.14$ g/mol) biraz distile suda çözüldü ve derişik hidroklorik asit çözeltisi eklenerek pH 7'ye ayarlandı ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.05 M pH:8 Tris-HCl tamponu: 6.07 g Tris ($M_A:121.14$ g/mol) biraz distile suda çözüldü ve derişik hidroklorik asit çözeltisi eklenerek pH 8'e ayarlandı ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.05 M pH:8.5 Tris-HCl tamponu: 6.07 g Tris ($M_A:121.14$ g/mol) biraz distile suda çözüldü ve derişik hidroklorik asit çözeltisi eklenerek pH 8.5'a ayarlandı ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.05 M pH:9 Tris-HCl tamponu: 6.07 g Tris ($M_A:121.14$ g/mol) biraz distile suda çözüldü ve derişik hidroklorik asit çözeltisi eklenerek pH 9'a ayarlandı ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.05 M pH:10 Tris-HCl tamponu: 6.07 g Tris ($M_A:121.14$ g/mol) biraz distile suda çözüldü ve derişik hidroklorik asit çözeltisi eklenerek pH 10'a ayarlandı ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.01 M L-asparagin çözeltisi: 1.32 g L-asparagin ($M_A:132.12$ g/mol) biraz distile suda çözüldü ve distile su ile toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

1.5 M TCA çözeltisi: 2.45 g TCA katısı ($M_A:163.39$ g/mol) biraz distile suda çözüldü ve distile su ile toplam hacim 10 ml'ye tamamlandı.

3.4. Nessler Reaktifinin Hazırlanması

Nessler ayırıcı çözelti A ve B adı verilen iki çözeltinin karıştırılmasıyla hazırlanmaktadır.

A Çözeltisi: 35 g KI + 50 g HgI_2 alınıp distile su içerisinde çözünüp çözeltinin son hacmi 200 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

B Çözeltisi: 50 g NaOH alınıp son hacim 250 ml olacak şekilde distile su içerisinde çözünerek hazırlandı.

Soğutulmuş A ve B çözeltilerinden B çözeltisinin A çözeltisine eklenmesiyle hazırlanır. Bu karışık çözelti az 1 hafta presipitasyon için karanlıkta bekletildikten

sonra çözelti şişesinin etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak karanlık bir yerde saklanır. Kullanılmak istendiği zaman üstte kalan kısımdan alınarak kullanılmış ve gerektiği zamanlar cam pamuğu ile süzölmüştür.

3.5. Polimer Örneklerinin Sentezi

3.5.1. Polimetilmetakrilat (PMMA) sentezi

PMMA metilmetakrilat monomerinin emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. 0,5 g potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) 50 ml saf suda çözöndü. Çözelti 100 ml'lik bir balona konuldu ve su banyosunda çözelti sıcaklığı 80 °C'ye gelinceye kadar manyetik karıştırıcı ısıtıcı ile ısıtıldı. Sonrasında 10 ml metilmetakrilat eklendi ve karışım 80-90 °C'de 3-4 saat reflüks edildi. Reflüks işlemi bittikten sonra karışıma etil alkol eklenerek polimer çöktüröldü. Elde edilen beyaz lateks süzgeç kağıdı ile süzöldü. Süzölen kısım vakumlu etövde 1 gün kurumaya bırakıldı. Vakumlu etövde kurutulan saf polimerlerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu, TGA, DTA, DSC analizleri ile termal karakterizasyonu ve sıvı temas açö ölçömleri yapıldı.

3.5.2. % 1, % 3, % 5, % 10 nişasta katkılı PMMA sentezi

0,5 g potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) 50 ml saf suda çözöndü. Çözelti 100 ml'lik bir balona konuldu ve su banyosunda çözelti sıcaklığı 80 °C'ye gelinceye kadar manyetik karıştırıcı ısıtıcı ile ısıtıldı. Sonrasında 10 ml metilmetakrilat ve sırasıyla % 1, 3, 5, 10 çözöner nişasta eklendi ve karışım 80-90 °C'de 3-4 saat reflüks edildi. Reflüks işlemi bittikten sonra karışıma etil alkol eklenerek polimer çöktüröldü. Elde edilen beyaz lateks süzgeç kağıdı ile süzöldü. Süzölen kısım vakumlu etövde 1 gün kurumaya bırakıldı. Vakumlu etövde kurutulan nişastalı polimerlerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu, TGA, DTA, DSC analizleri ile termal karakterizasyonu ve sıvı temas açö ölçömleri yapıldı.

3.5.3. Poli (2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) sentezi

PHEMA, 2-hidroksietilmetakrilat monomerinin emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. 0,5 g potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) 50 ml saf suda çözöndü. Çözelti 100 ml'lik bir balona konuldu ve su banyosunda çözelti

sıcaklığı 80 °C'ye gelinceye kadar manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile ısıtıldı. Sonrasında 10 ml hidroksietilmetakrilat eklendi ve karışım 80-90 °C'de 3-4 saat reflüks edildi. Reflüks işlemi bittikten sonra karışıma etil alkol eklenerek polimer çöktürüldü. Elde edilen beyaz lateks süzgeç kağıdı ile süzüldü. Süzülen kısım vakumlu etüvde 1 gün kurumaya bırakıldı. Vakumlu etüvde kurutulan saf polimerlerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu, TGA, DTA, DSC analizleri ile termal karakterizasyonu ve sıvı temas açılı ölçümleri yapıldı.

3.5.4. % 1, % 3, % 5, % 10 nişasta katkılı PHEMA sentezi

0,5 g potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) 50 ml saf suda çözündü. Çözelti 100 ml'lik bir balona konuldu ve su banyosunda çözelti sıcaklığı 80 °C'ye gelinceye kadar manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile ısıtıldı. Sonrasında 10 ml hidroksietilmetakrilat ve sırasıyla % 1, 3, 5, 10 çözünür nişasta eklendi ve karışım 80-90 °C'de 3-4 saat reflüks edildi. Reflüks işlemi bittikten polimer çöktürüldü. Elde edilen beyaz lateks süzgeç kağıdı ile süzüldü. Süzülen kısım vakumlu etüvde 1 gün kurumaya bırakıldı. Vakumlu etüvde kurutulan nişasta katkılı polimerlerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu, TGA, DTA, DSC analizleri ile termal karakterizasyonu ve sıvı temas açılı ölçümleri yapıldı.

3.5.5. Polimetakrilik asit (PMA) sentezi

PMA, metakrilik asit monomerinin emülsiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak sentezlendi. 0,5 g potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) 50 ml saf suda çözündü. Çözelti 100 ml'lik bir balona konuldu ve su banyosunda çözelti sıcaklığı 80 °C'ye gelinceye kadar manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile ısıtıldı. Sonrasında 10 ml metakrilik asit eklendi ve karışım 80-90 °C'de 3-4 saat reflüks edildi. Reflüks işlemi bittikten sonra polimer çöktürüldü. Elde edilen beyaz lateks süzgeç kağıdı ile süzüldü. Süzülen kısım vakumlu etüvde 1 gün kurumaya bırakıldı. Vakumlu etüvde kurutulan saf polimerlerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu, TGA, DTA ve DSC analizleri ile de termal karakterizasyonu yapıldı. Polimere ait çözünürlük testi yapıldığında PMA'nın suda çözündüğü belirlendi. Elde ettiğimiz polimerin sudaki çözünürlüğünü maksimum derecede azaltmak için metilmetakrilat monomeri ile farklı oranlarda kopolimerizasyon reaksiyonuna sokuldu. 100:0, 90:10, 70:30, 50:50, 30:70, 10:90 ve 0:100 (MA:MMA) oranlarında bir dizi kopolimer sentezlendi. Elde edilen

kopolimerler FT-IR, TGA, DTA ve DSC analizleri ile karakterize edildi ve sudaki çözünürlüğü test edildi.

3.5.6. 70:30 P(MA:MMA) sentezi

0,5 g potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) 50 ml saf suda çözündü. Çözelti 100 ml'lik bir balona konuldu ve su banyosunda çözelti sıcaklığı 80 °C'ye gelinceye kadar manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile ısıtıldı. Sonrasında 7 ml metakrilik asit-3 ml metilmetakrilat balona eklendi ve karışım 80-90 °C'de 3-4 saat reflüks edildi. Reflüks işlemi bittikten sonra karışıma etil alkol eklenerek kopolimer çöktürüldü. Elde edilen beyaz lateks süzgeç kağıdı ile süzüldü. Süzülen kısım vakumlu etüvde 1 gün kurumaya bırakıldı. Vakumlu etüvde kurutulan kopolimerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu, TGA, DTA, DSC analizleri ile termal karakterizasyonu ve sıvı temas açısı ölçümleri yapıldı.

3.5.7. % 1, % 3, % 5, % 10 nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) sentezi

0,5 g potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) 50 ml saf suda çözündü. Çözelti 100 ml'lik bir balona konuldu ve su banyosunda çözelti sıcaklığı 80 °C'ye gelinceye kadar manyetik karıştırıcılı ısıtıcı ile ısıtıldı. Sonrasında 7 ml metakrilik asit-3 ml metilmetakrilat ve sırasıyla % 1, 3, 5, 10 çözünür nişasta balona eklendi ve karışım 80-90 °C'de 3-4 saat reflüks edildi. Reflüks işlemi bittikten sonra karışıma etil alkol eklenerek kopolimer çöktürüldü. Elde edilen beyaz lateks süzgeç kağıdı ile süzüldü. Süzülen kısım vakumlu etüvde 1 gün kurumaya bırakıldı. Vakumlu etüvde kurutulan nişasta katkılı polimerlerin FT-IR ile yapısal karakterizasyonu, TGA, DTA, DSC analizleri ile termal karakterizasyonu ve sıvı temas açısı ölçümleri yapıldı.

3.6. Saf ve Nişasta Katkılı Olarak Sentezlenen Polimerlerin Bozunurluk Testleri

Saf ve sırasıyla % 1, 3, 5, 10 oranında sentezlenen PMMA, PHEMA ve 70:30 P(MA:MMA) polimerlerinin bozunurluk uygulamasını yapmak için belirli miktarda hassas olarak tartılan polimerler 5 ml fosfat tamponu (pH:7) ile beraber darası alınmış olan deney tüplerine konuldu. Deney tüplerinin ağzı sıkıca kapatılarak örnekler sıcaklığı +37 °C'de sabitlenen etüvde inkübasyona bırakıldı. Bir hafta sonra deney tüpleri etüvden çıkarılarak üstteki tampon çözelti atılıp örnekler vakumlu etüvde kurumaya bırakıldı. Örnekler kurutulduktan sonra hassas bir şekilde tartılıp

başlangıç miktarı baz alınarak % bozunma oranı hesaplandı. Aynı işlemler tüm polimerlere 2. ve 4. haftalarda da uygulandı.

3.7. Saf ve Nişasta Katkılı Olarak Sentezlenen Polimerlerin Çözünürlük Testleri

Polimer örneklerine enzim immobilizasyonu ve enzim aktivite tayin yöntemlerinde kullanacağımız tampon sistemi su ile hazırlandığından elde ettiğimiz polimerlerin sudaki çözünürlüğü minimum derecede olmak zorundadır. Bu yüzden polimer örneklerine çözünürlük testleri yapılmıştır. Ayrıca polimer örneklerinin yüzey temas açılarının ölçülmesi deneylerinde polimerlerimizin film yapısında olmaları gerekmektedir. Çözünürlük testi için saf ve nişasta katkı polimerlerden küçük gramajlarda alınıp su ve bir dizi organik çözümler kullanarak çözünürlüğü test edildi.

3.8. Sentezlenen Polimer Örneklerinin Yüzey Özelliklerinin Sıvı Temas Açısı İle İncelenmesi

Sentezlenen saf ve nişasta katkı polimerlerin sıvı temas açısı ölçümleri için polimerler organik çözümlerde çözünüp film haline getirildi. Film haline gelen örnekler üzerine sıvı damlatarak cihaz yardımıyla yüzey temas açıları belirlendi.

3.9. Polimer Örneklerine ve Nişasta Katkılı Polimer Örneklerine Enzim Immobilizasyonu

Polimer örnekleri ve sırasıyla % 1, % 3, % 5 ve % 10 nişasta katkı polimer örneklerinden 0.1 g tartılıp ependorf tüplerine konuldu. Her bir örnek üzerine 0.75 ml distile su ve 0.04 ml L-asparaginaz enzimi konuldu. Örnekler +4 °C'de orbital shakerda 30 dakika boyunca karıştırıldı. 30 dakikanın sonunda örnekler 5000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra süpernatantlar alındı ve her bir örnek 1 ml distile su ile yıkanarak tekrar santrifüj edildi. İşlem tamamlandıktan sonra yıkama süpernatantları alındı ve örnekler +35 °C'de vakumlu etüvde kurutuldu. Kuruyan örneklerden 5 mg alınarak enzim aktivitesi tayini yapıldı.

3.10. Serbest Enzimin Aktivite Ölçümü

L-asparaginaz aktivitesi spektrofotometrik olarak Neslerizasyon metodu ile tayin edilmiştir. Bu yöntem ; L-asparaginaz enziminin L-asparagini aspartik asit ve amonyağa yıkmaya sonucu açığa çıkan amonyağın ölçülmesi temeline dayanan ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. L-asparaginaz enzim stoğundan 0.05 ml alınıp, 0.05 M Tris-HCl (pH:8.6) tamponuyla taze hazırlanmış 0.01 M 1 ml L-asparagin (substrat) çözeltisi ile 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 1.5 M 0.1 ml trikloroasetik asit (TCA) eklenerek reaksiyon durduruldu. Sonrasında toplam hacim 1 ml olacak şekilde 0.25 ml örnek, 0.5 ml distile su ve 0.25 ml Nessler reaktifi eklenip karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuş ve 480 nm'de köre karşı okuma yapılmıştır. Her bir ölçüm 2 tekrarlı yapılmış olup hesaplamalarda ortalaması alındı. 1 L-asparaginaz ünitesi (U), 37 °C'de 1 dakikada 1 µmol amonyak açığa çıkaran enzim miktarı olarak tanımlanmıştır (Ates, 2007).

3.11. İmmobilize Enzimin Aktivite Ölçümü

Enzim immobilize edilmiş örneklerden 5 mg tartılıp üzerine, 0.05 M Tris-HCl (pH:8.6) tamponuyla taze hazırlanmış 0.01 M L-asparagin çözeltisinden 1 ml eklenerek 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübe işlemini takiben örnekler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Sonrasında süzüntüler başka bir ependorf tüpüne transfer edildi. Örnekler +4 °C'de saklandı. Elde edilen süzüntülere 1.5 M 0.1 ml trikloroasetik asit (TCA) ilave edildi. Sonrasında toplam hacim 1 ml olacak şekilde 0.25 ml süzüntü, 0.5 ml distile su ve 0.25 ml Nessler reaktifi eklenip karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında tutulmuş ve 480 nm'de köre karşı okuma yapılmıştır. Örneklerdeki amonyak konsantrasyonu, belirli konsantrasyonlarda hazırlanan amonyum sülfat standart eğri yardımıyla hesaplanmıştır.

3.12. Serbest ve İmmobilize Enzimin Optimum pH'sının Belirlenmesi

L-asparaginaz enziminin ve enzim immobilize edilmiş örneklerin optimum aktivite gösterdiği pH değerini belirlemek için pH 4-6 aralığında 0.05 M asetat tamponu, pH 7-10 aralığında ise 0.05 M Tris-HCl tamponu kullanıldı. Her bir pH'daki tampon çözeltiyle 0.01 M L-asparagin çözeltisi hazırlandı ve enzim

aktivitesi ölçümleri yapıldı. Ölçümler sonucunda enzim aktivitesinin en fazla olduğu değer optimum pH değeri olarak belirlendi.

3.13. Serbest ve İmmobilize Enzimin Maksimum ve Optimum Sıcaklıklarının Belirlenmesi

L-asparaginaz enziminin ve enzim immobilize edilmiş örneklerin optimum ve maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığı belirlemek amacıyla 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C'de ayrı ayrı enzim aktivitesi ölçülmüştür. Enzim aktivitesini ölçmek için 0.05 M pH 8.6 Tris-HCl tamponu ve 0.01 M L-asparagin çözeltisi kullanılmıştır. Örneklerle immobilize edilmiş enzimin maksimum ve optimum sıcaklığının belirlenmesinde enzim, örnek ve substrat çözeltisi reaksiyon başlamadan önce aktivitenin belirleneceği sıcaklıkta 15 dk. bekletilerek aktivitenin belirleneceği sıcaklığa gelmeleri sağlandı. 15 dk. sonunda reaksiyon başlatılarak enzim aktivitesi ölçüldü.

Ayrıca serbest ve immobilize enzimin aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır. Arrhenius bağıntısına göre reaksiyon hızı (V) ile aktivasyon enerjisi (Ea) arasında matematiksel ifade aşağıda verilmiştir.

$$V=k.e^{-Ea/RT}$$

R gaz sabiti, k bir katsayıdır. Bu denklem;

$$\ln V = \ln k - \frac{Ea}{RT}$$

şeklinde yazılırsa, $\ln V$ ile $1/T$ arasında çizilen grafikten aktivasyon enerjisi bulunmuştur. Aktivitenin sıcaklıkla arttığı bölge için elde edilen grafiğin eğiminden immobilize L-asparaginazın aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.

3.14. Serbest ve İmmobilize Enzimin Depo Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimin aktivitesine depolanma koşullarını belirlemek amacıyla enzim hacmi (50µl), örnek miktarı (5mg) ve depolanma koşulları sabit tutularak her iki enzim de + 4 ve +25 °C'de muhafaza edildi. Belirli günlerde her iki enzim içinde aktivite tayini yapılarak başlangıç aktivitesi üzerinden % aktivitesi hesaplanarak enzimlerin aktivitelerini ne kadar koruyabildiği araştırıldı.

3.15. Serbest ve İmmobilize Enzimin Km ve Vmax Değerlerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimin hız sabitini (K_m) ve maksimum hızını (V_{max}) saptamak için 0.1-10 mM aralığında L-asparagin çözeltisi Tris-HCl (pH:8.5) tamponu ile hazırlandı. Serbest enzim ve immobilize enzim değişen substrat konsantrasyonuna karşılık 37 °C'de inkübe edilerek enzim aktivitesi tayin edildi. $1/V$ ve $1/[S]$ değerleri bulunarak Lineweaver-Burk grafiği çizildi. K_m ve V_{max} değerleri grafiğin denklemlerinden yararlanılarak bulundu.

3.16. Bradford Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

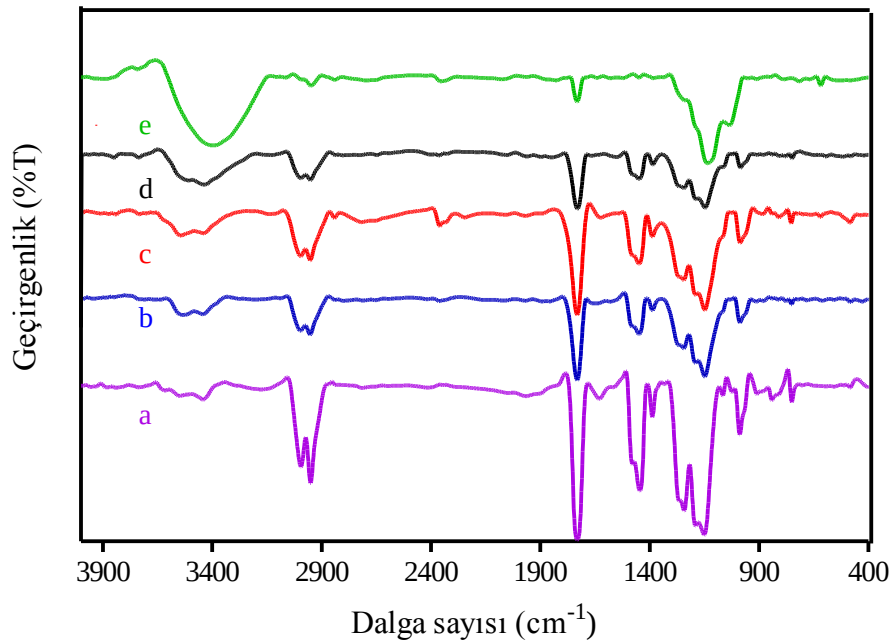
Serbest ve immobilize enzimlerin kantitatif protein tayini Bradford yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu yöntem fosforik asitli ortamda proteinlerin, Coomassie brilliant blue G-250 reaktifi ile kompleks oluşturması, oluşan kompleksin 595 nm'de maksimum absorbans göstermesi esasına dayanır (Bradford, 1976). Bu yöntemin diğer protein tayini yöntemlerinden üstün tarafı, çok kısa sürede uygulanması, bozucu faktörlerin az olması, protein boya kompleksinin çözeltilerde uzun süre kalmasıdır. Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 µg arasındadır. Protein tayini işleminde şu yol izlendi: 1 mL'sinde 1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltilerden belirli konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. 50 µl standart çözelti üzerine 950 µl Bradford reaktifi her bir tüpe ilave edildi. Tüpler vorteks ile karıştırılarak 3 dakika sonra 595 nm'de 1 mL'lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Köre olarak Bradford çözeltisi kullanıldı. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen mg/ml değerleri ile standart grafik hazırlandı (Şekil 4.31). L-asparaginaz enzim çözeltisinden 50 µl alınarak üzerlerine 1 mL Bradford çözeltisi ilave edildi. Vorteksde karıştırıldıktan 3 dakika sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. Ölçümler iki tekrarlı olarak çalışıldı. İki ölçümün ortalama absorbansına karşılık gelen protein miktarı standart grafik yardımıyla hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Saf ve Nişasta Katkılı Polimerlerin Karakterizasyonu

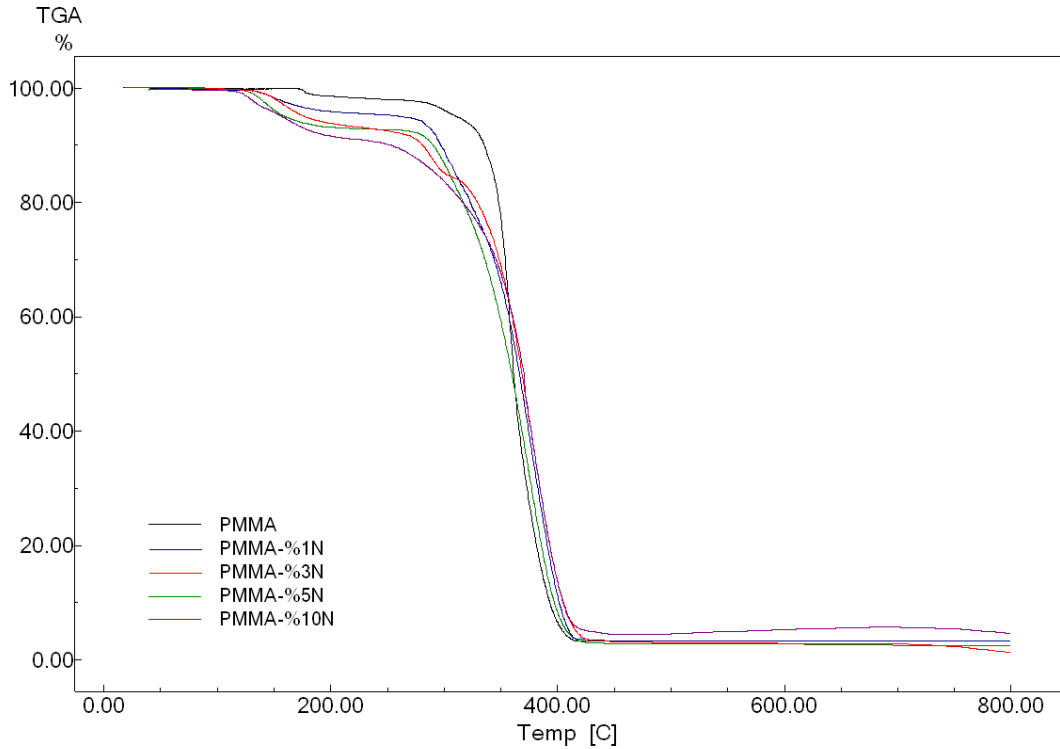
4.1.1. Saf ve nişasta katkılı PMMA'nın karakterizasyonu

Şekil 4.1' de saf ve nişasta katkılı PMMA yapılarına ait FT-IR spektrumları kıyaslamalı olarak verilmiştir. Spektrum incelendiğinde Şekil 4.1 a'da saf PMMA yapısı görülmektedir. Saf PMMA yapısından kaynaklı alifatik CH_2 grupları $2899\text{--}2950\text{ cm}^{-1}$ aralığında geniş bir pik olarak görülmektedir. Ester grubuna bağlı C=O titreşimi 1890 cm^{-1} 'de görülmektedir. Yine ester bağ titreşimleri 1274 cm^{-1} 'de polimerin karakterizasyonunu doğrulamaktadır. Farklı oranlarda nişasta katkılı polimerlere ait FT-IR spektrumları ise Şekil 4.1 b, c, d ve e'de verilmiştir. Nişasta yapısındaki serbest hidroksil gruplarına ait titreşimler $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ 'de birer pik vermektedir. Nişasta miktarı arttıkça pik şiddeti artmakta buda nişastanın düzenli olarak yapıya girdiğini ispatlamaktadır. Benzer şekilde nişasta oranı arttıkça yapıdaki metakrilat miktarı azalmakta ve metakrilattan kaynaklı piklerin ise şiddetlerinin düştüğü görülmektedir. Ayrıca, bu değişimleri alifatik CH_2 , C=O gerilme piki, COC ve C-O titreşimlerine ait piklerde de görülmektedir.



Şekil 4.1. Farklı oranlarda nişasta katkılı PMMA polimer örneklerine ait FT-IR spektrumları (a) PMMA (b) PMMA-% 1N (c) PMMA-% 3N (d) PMMA-% 5N (e) PMMA-% 10N

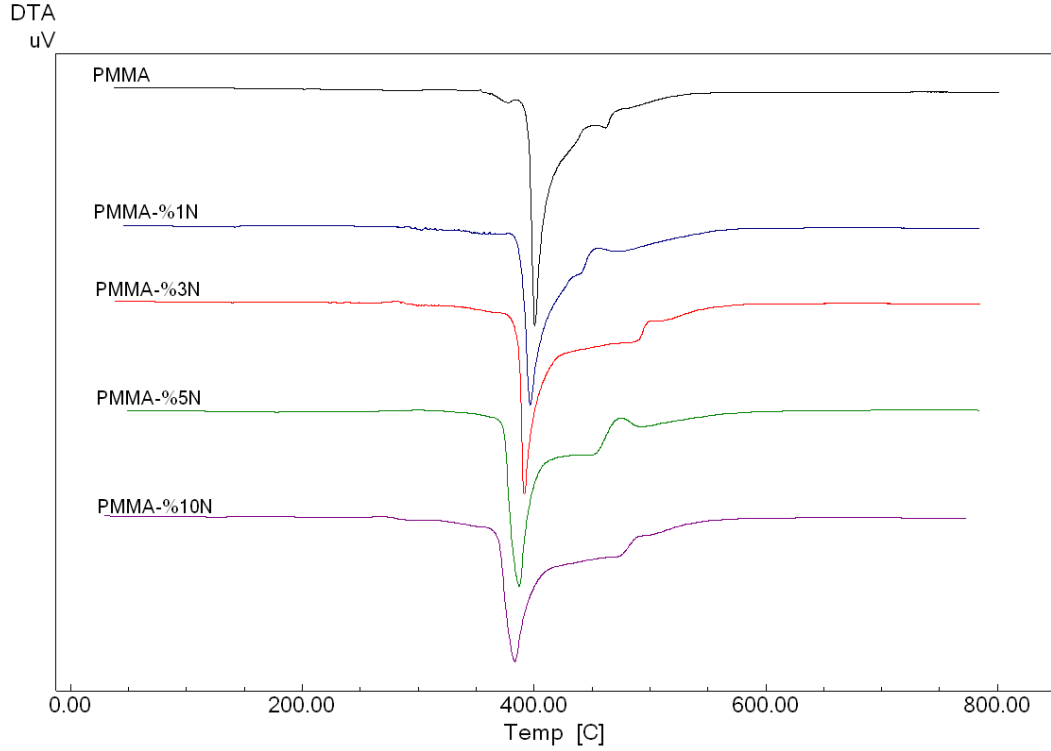
Şekil 4.2'de PMMA ve nişasta içeren yapılara ait TGA termogramları verilmiştir. Termogramlar incelendiğinde saf PMMA iki temel kütle kaybı vermektedir. Birincisi 200 °C ile 350 °C arasında yaklaşık % 5'lik bir kütle kaybıdır. Bu kütle kaybı polimerik yapıdaki bazı küçük yan grupların bozunduğunu göstermektedir. İkinci ve temel kütle kaybı ise PMMA'nın yapısının termal bozunmasıdır. Yaklaşık % 90'lık bir kütle kaybı gözlenir ve tüm polimerik yapı 350 °C ile 450 °C arasında bozunmaktadır. Nişasta ünitesi taşıyan PMMA'nın termogramlarında ise bozunma başlangıç sıcaklığı daha düşük bir değere kayar. Yine 2 farklı kütle kaybı görülmesine rağmen birinci kütle kaybının nişasta içeriğine bağlı olarak büyüdüğü görülmektedir. % 10 nişasta içeren yapı en yüksek bozunma değerini alır. İkinci kütle kaybı ise 300-400 °C arasında görülmektedir ve saf PMMA'ya kıyasla daha yatay bir bozunma eğrisi göstermektedir. Gerek bu eğrinin büyümesi gerekse nişasta içeren yapıların paralellik arz ederek bir termogram oluşturması istenilen PMMA-nişasta kompozit yapılarının elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.2. PMMA ve nişasta katkılı PMMA örneklerine ait TGA termogramları

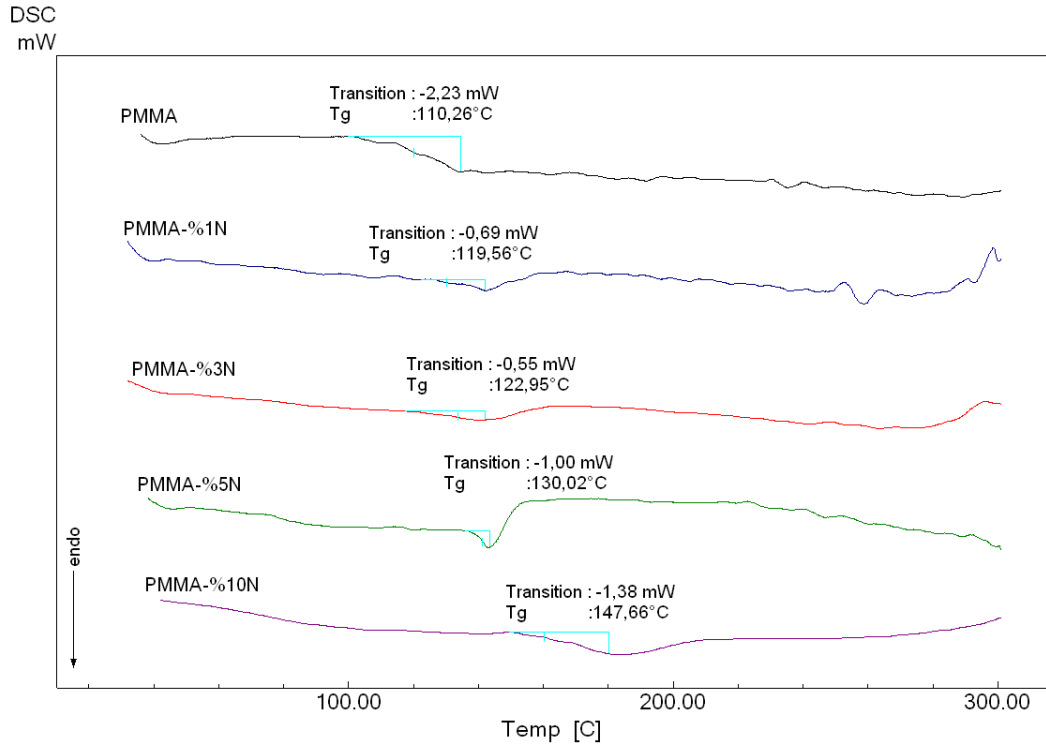
Saf PMMA ve nişasta katkılı PMMA yapılarına ait DTA termogramları Şekil 4.3.'de görülmektedir. Bu termogramlarda genel olarak saf PMMA yapısındaki

termal bozunmaya ait sıcaklık aralığında keskin bir endoterm görülmektedir. Bu endoterm bir bozunma reaksiyonu olduğunu göstermektedir ve polimere ait TGA verileri ile uyumludur. Nişasta kompozitlerinde ise ilgili endotermik pik daha da genişlemektedir. Yani bozunma, nişasta oranı artışına bağlı olarak geniş bir sıcaklık aralığında gözlenmektedir.



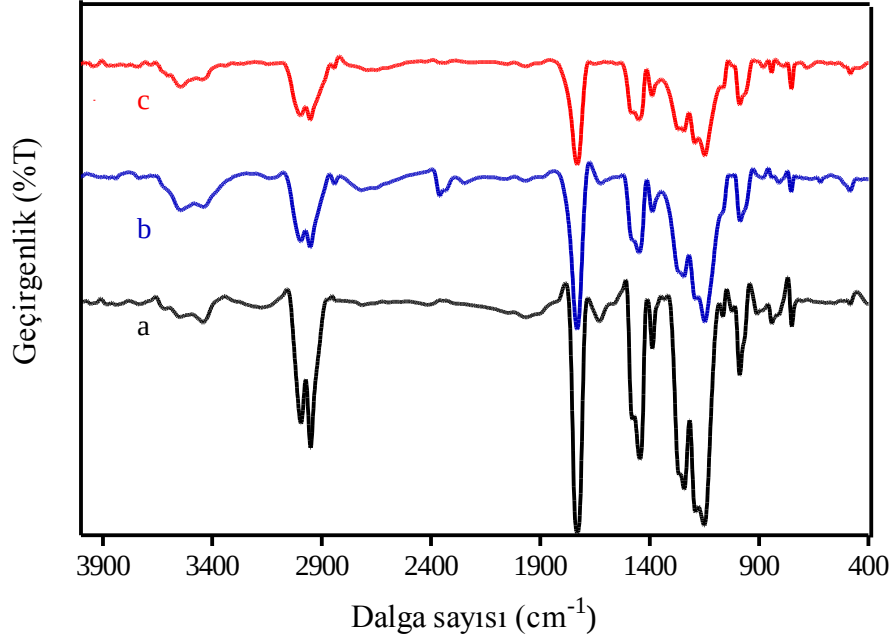
Şekil 4.3. PMMA ve nişasta katkılı PMMA örneklerine ait DTA termogramları

PMMA ve farklı oranlarda nişasta içeren polimerik filmlerin DSC verileri Şekil 4.4'te verilmiştir. Bu verilerden PMMA için camı geçiş sıcaklığı (T_g) 110 °C olarak gözlenmiştir. Sırasıyla yüzde 1, 3, 5, 10 nişasta içeren polimerik filmlerin ise 119, 122, 130 ve 147 °C'dir ve T_g değerlerinde bir artış olduğu gözlenmektedir. Bu artışın sebebi artan nişasta miktarına bağlı olarak zincirler arasındaki etkileşimlerin artmasıyla yapının daha sert ve sıkı bir hal almasıdır.



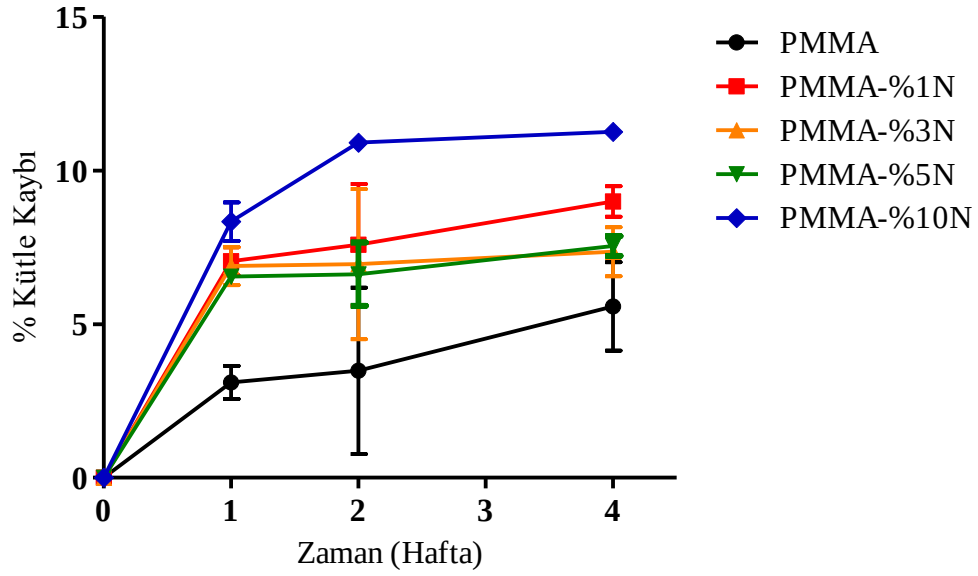
Şekil 4.4. PMMA ve nişasta katkılı PMMA örneklerine ait DSC termogramları

Nişastasız, % 3 nişasta katkılı ve % 3 nişasta katkılı enzimli PMMA örneklerine ait FT-IR spektrumları Şekil 4.5'te verilmiştir. Spektrumda nişasta miktarı arttıkça saf PMMA ait pik titreşimleri azaldığı görülmektedir. Ayrıca, enzim immobilize edilmiş nişastalı polimer örneğinin spektrumunda ise pik konumlarında değişiklik olmadığı ama bağlanan enzimden kaynaklı olarak yapıdaki metilmetakrilat oranı düştüğünden pik şiddetlerinin daha da azaldığı verilen spektrumdan anlaşılmaktadır.



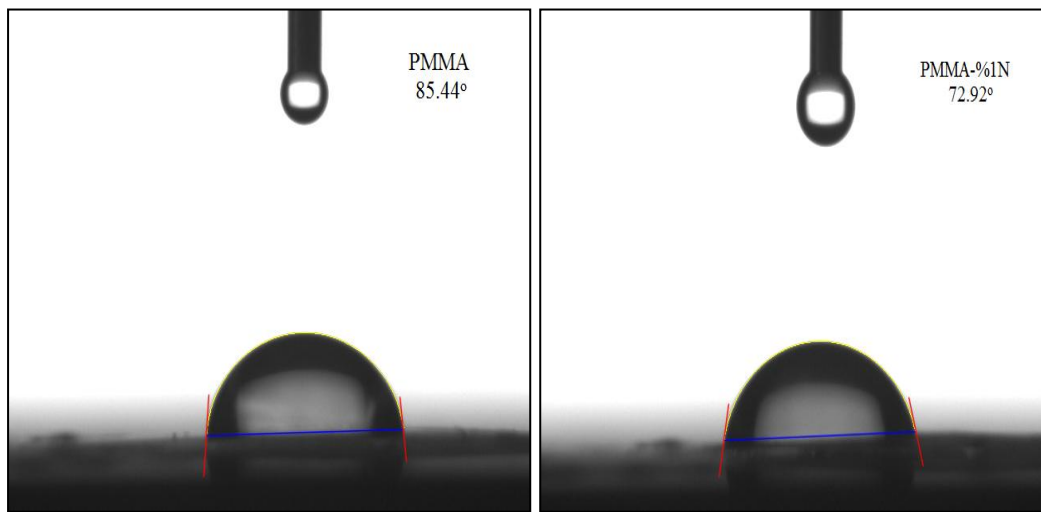
Şekil 4.5. Nişastasız, % 3 nişasta katkı ve % 3 nişasta katkı enzimli PMMA örneklerine ait FT-IR spektrumları (a) PMMA, (b) PMMA-% 3N, (c) PMMA-% 3N-Asn

Şekil 4.6'da saf ve nişasta katkı polimer örneklerine ait 1, 2 ve 4 haftalık bozunurluk test sonuçları verilmiştir. Grafik incelendiğinde saf PMMA'nın ilk haftada yaklaşık % 2.5, 1 ay sonunda ise % 5 oranında bir kütle kaybı yaşadığı görülmektedir. Doğal bir polimer olan nişastanın yapıya katkılanmasıyla bozunmanın bariz bir şekilde arttığı görülmektedir. En fazla nişasta oranını içeren PMMA-% 10 N polimerinin bir ay sonunda yaklaşık % 12 oranında bir bozunma göstermesi de bunu doğrulamaktadır. Sonuç olarak biyoyumlu bir polimer olan PMMA polimerine nişasta katkılanmasıyla biyoyumluluğu ve biyobozunurluluğu arttırılmaktadır.

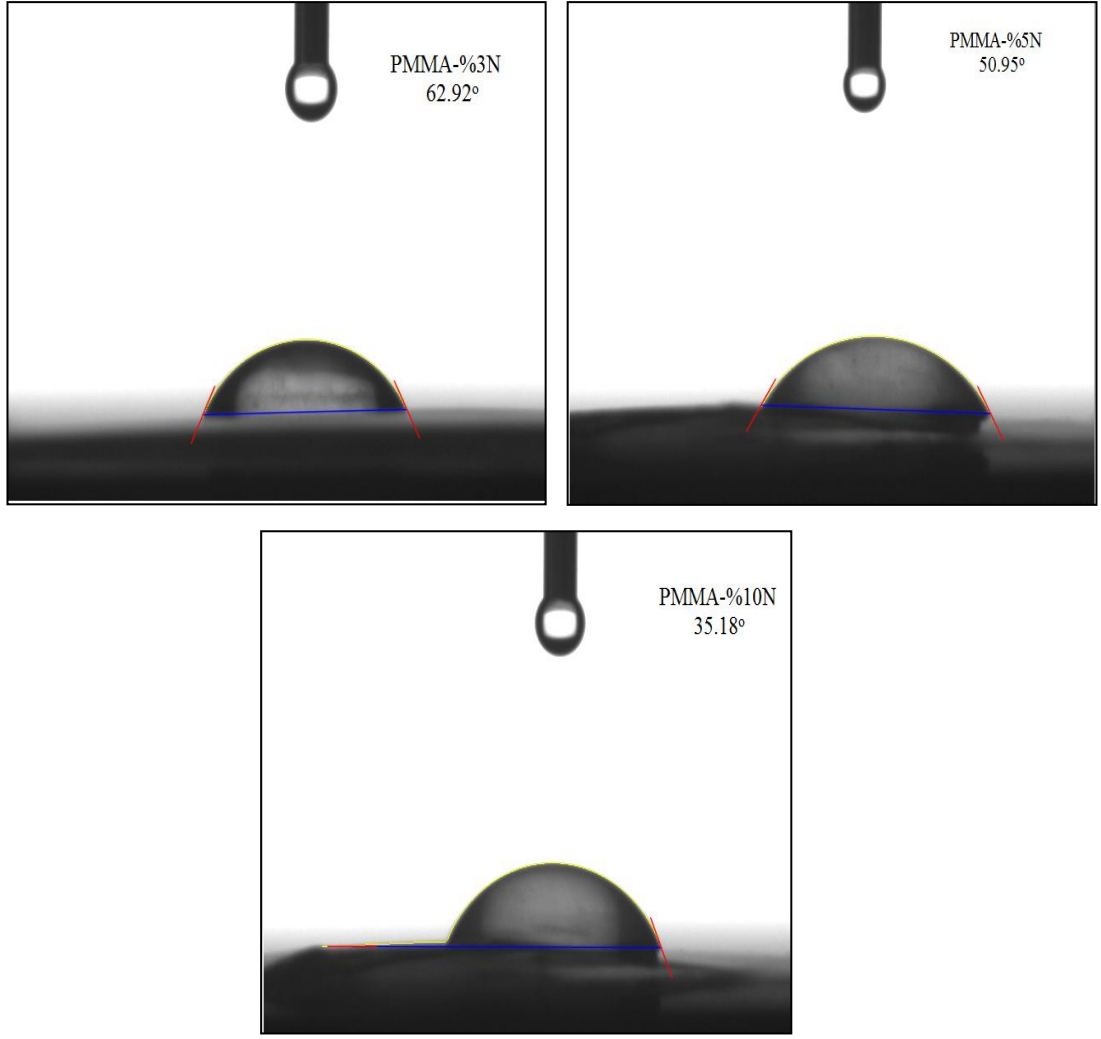


Şekil 4.6. Saf ve nişasta katkılı PMMA örneklerinin % bozunurluk sonuçları

Saf ve nişasta katkılı PMMA polimerimize ait sıvı temas açıları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir. Bu sayede elde edilen polimerlerin hidrofilik karakterleri hakkında bilgi edinildi. Saf PMMA için sıvı temas açısı 85.44° olarak belirlenmiştir. Nişasta katkılı polimerler için ise sırasıyla 72.92° , 62.92° , 50.95° ve 35.18° olarak bulunmuştur. Buradan şu sonuca varabiliriz ki yapıdaki nişasta oranı arttıkça polimer filmlerimizin sıvı temas açıları azalmıştır. Buda nişastanın hidrofilik karakterinden dolayı kaynaklanmaktadır. Nişasta oranı arttıkça polimerin hidrofilik karakteri de artmaktadır.



Şekil 4.7. PMMA ve PMMA-% 1N polimer filmlerinin sıvı temas açısı görüntüleri

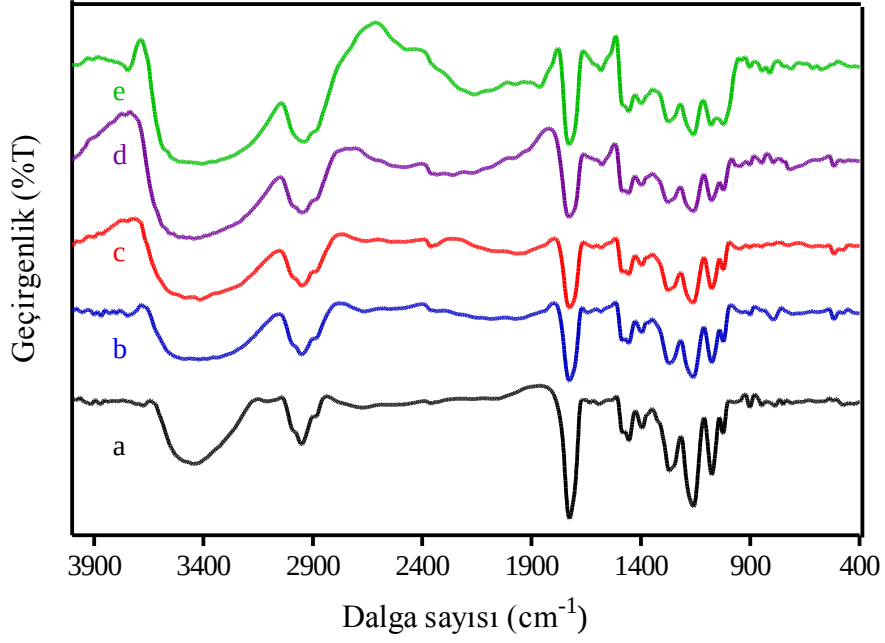


Şekil 4.8. % 3, % 5 ve % 10 nişasta katkılı PMMA polimer filmlerinin sıvı temas açısı görüntüleri

Sentezlenen saf ve nişasta katkılı PMMA örneklerine yapılan çözünürlük testi sonuçlarına göre hem saf PMMA hem de nişastalı PMMA'nın suda çözünmediği belirlenmiştir. Polimerler birer organik çözen olan toluen ve etil asetat varlığında çözünmektedir.

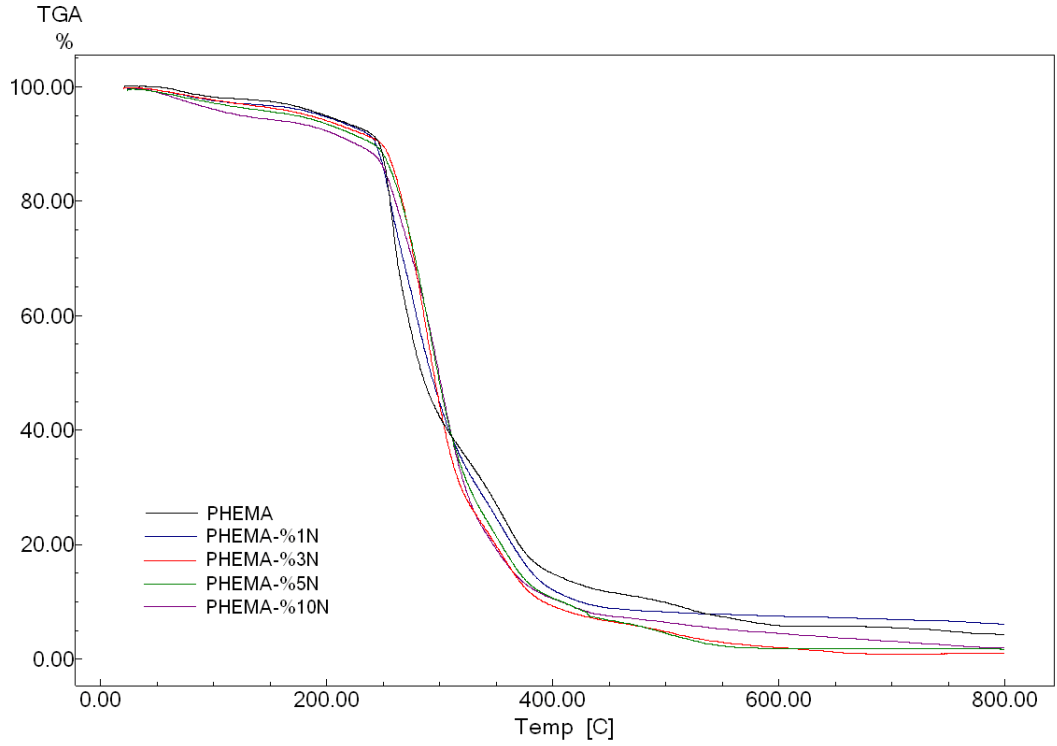
4.1.2. Saf ve nişasta katkılı PHEMA'nın karakterizasyonu

Şekil 4.9'da PHEMA ve nişasta içeren PHEMA kompozitlerine ait FT-IR spektrumları görülmektedir. Spektrum yapıları birbirine benzerlik arz etmekle beraber nişasta oranı arttıkça nişastanın yapısında bulunan OH gerilme titreşimlerinden kaynaklı olarak $3000-3680\text{ cm}^{-1}$ aralığında geniş bir band vermektedir.



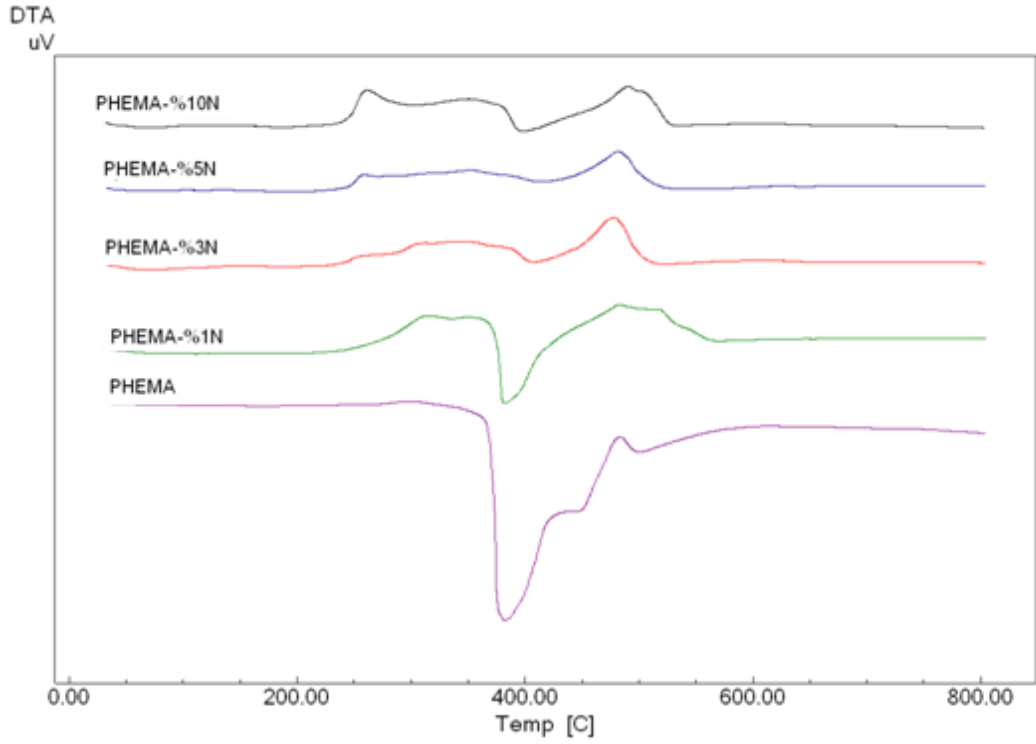
Şekil 4.9. Farklı oranlarda niçasta katkılı PHEMA polimer örneklerine ait FT-IR spektrumları (a) PHEMA (b) PHEMA-% 1N (c) PHEMA-% 3N (d) PHEMA-% 5N (e) PHEMA-% 10N

Saf ve niçastalı PHEMA polimerine ait TGA termogramları Şekil 4.10'da görülmektedir. Bu termogramlarda PHEMA yapısının 220-400 °C arasında keskin bir bozunma piki verdiği görülmüştür. Ancak termal kararlılığı düşük olan niçastanın yapıya girmesiyle malzemenin bozunma sıcaklığı daha da düşük değerlere kaymaktadır. Özellikle % 10 niçasta taşıyan örneklerde 50-200 °C arasında % 10'luk bir net kütle kaybı niçastanın yapıya girdiğini doğrulamaktadır.



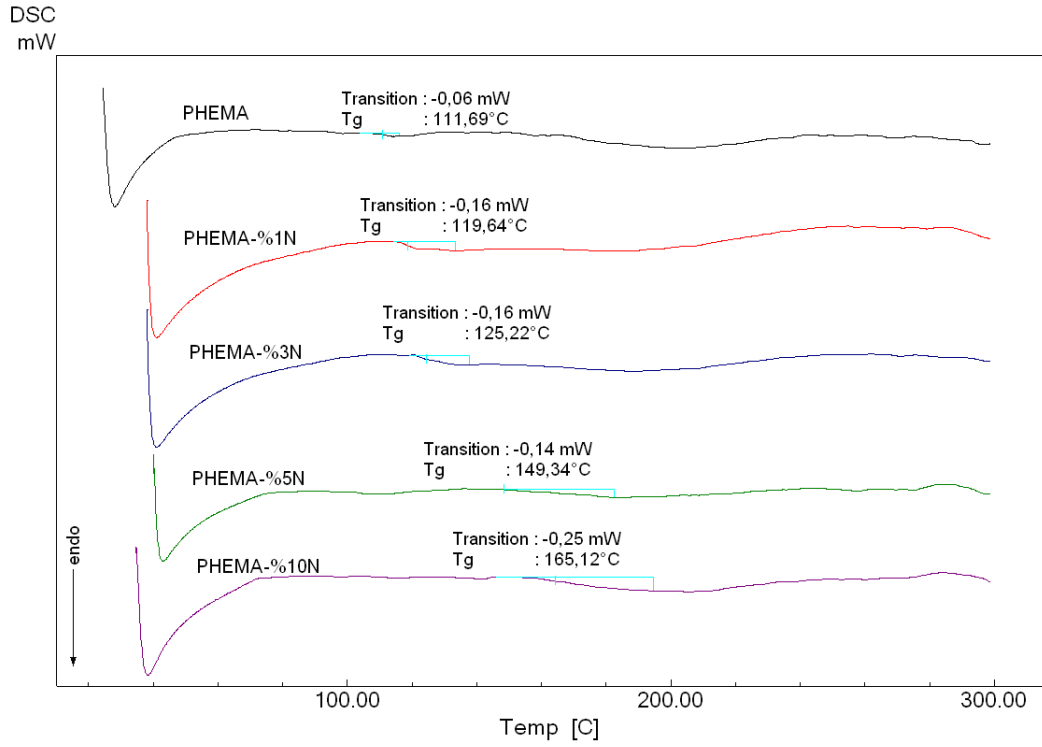
Şekil 4.10. PHEMA ve nişasta katkılı PHEMA örneklerine ait TGA termogramları

PHEMA ve nişastalı PHEMA örneklerinin DTA termogramları Şekil 4.11'de verilmiştir. Bu termogramlarda PHEMA'nın TGA ile orantılı olarak 230-450 °C arasında net bir bozunma piki görülmektedir. Nişasta içeren yapılarda ise iki temel bozunma piki görülmektedir. Birinci pik yapıdaki nişastanın bozunması, ikincisi ise polimerik yapıdan kaynaklı bir bozunma pikidir. Nişasta miktarı arttıkça birinci temel pik daha da düşük sıcaklık değerlerine kaymaktadır.



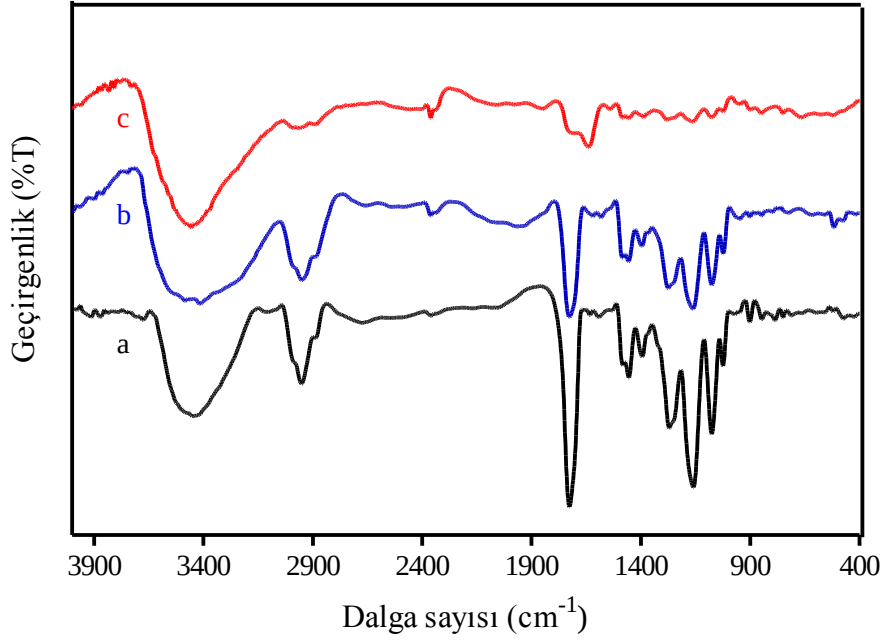
Şekil 4.11. PHEMA ve nişasta katkılı PHEMA örneklerine ait DTA termogramları

PHEMA ve nişastalı PHEMA örneklerinin DSC termogramları Şekil 4.12'de verilmiştir. Bu eğriler üzerinde gösterilen saf PHEMA'nın Tg sıcaklığı 111 $^{\circ}C$ 'dir. Nişastanın yapıya girmesiyle bu değerler artmaktadır. Sırasıyla % 1, 3, 5, 10 nişasta içeren yapıların Tg değerleri 119, 125, 149 ve 165 $^{\circ}C$ değerlerini almıştır. Nişasta yapısındaki hidroksil grupları PHEMA üzerindeki hidroksil grupları ile hidrojen bağı yaparak zincirlerin daha sık istiflenmesini ve serbest hacim değerinin azalmasını sağlamaktadır. Bu sayede daha sık ve sert istiflenme yapıların Tg değerlerinin daha yüksek değerlere kaymasını sağlamaktadır.



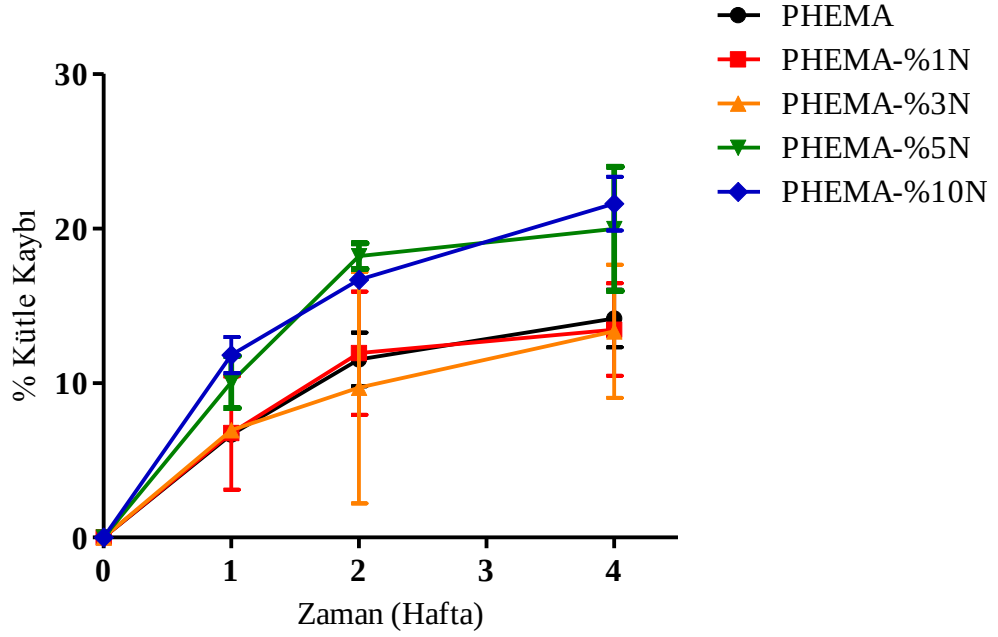
Şekil 4.12. PHEMA ve nişasta katkılı PHEMA örneklerine ait DSC termogramları

PHEMA, % 3 nişastalı PHEMA ve bu polimere immobilize edilen enzime ait FT-IR spektrumları Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Saf ve nişasta katkılı polimerler arasındaki değişiklik açıkça görülmektedir. Özellikle hidroksil gruplarının artışına bağlı olarak OH gerilme titreşim pikinin genişliği artmaktadır. Ayrıca enzim tutuklu polimerin spektrumu ile diğer spektrumlar karşılaştırıldığında pik şiddetlerindeki değişiklik göze çarpmaktadır. Özellikle yaklaşık 1800 cm^{-1} 'de pikin şiddetinde belirgin bir azalma görülmektedir.



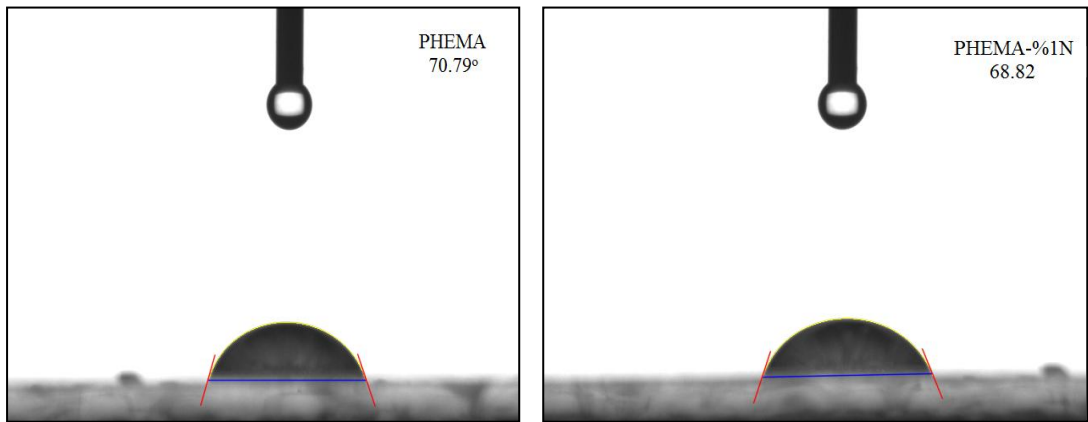
Şekil 4.13. Nişastasız, % 3 nişastalı ve % 3 nişastalı enzimli PHEMA örneklerine ait FT-IR spektrumları (a) PHEMA, (b) PHEMA-% 3N, (c) PHEMA-% 3N-Asn

Şekil 4.14'de saf ve nişasta katkılı polimer örneklerine ait 1, 2 ve 4 haftalık bozunurluk test sonuçları verilmiştir. Yapılan biyobozunurluk testi sonuçlarına göre saf polimer PHEMA ilk haftada % 5'lik bir kütle kaybı yaşarken, yapıya nişasta katkılanmasıyla bu kaybın daha fazla olduğu görülmektedir. Özellikle en fazla nişasta miktarı taşıyan PHEMA polimeri 1 ay sonunda % 20'den fazla bir kütle kaybına sahiptir. Bunun açıkça sebebi nişastanın zaten biyoyoumlu bir polimer olan PHEMA'ya katkılanmasıyla bu polimerin canlı sistem koşullarındaki uyumluluğunu ve bozunurluluğunu arttırmasıdır.

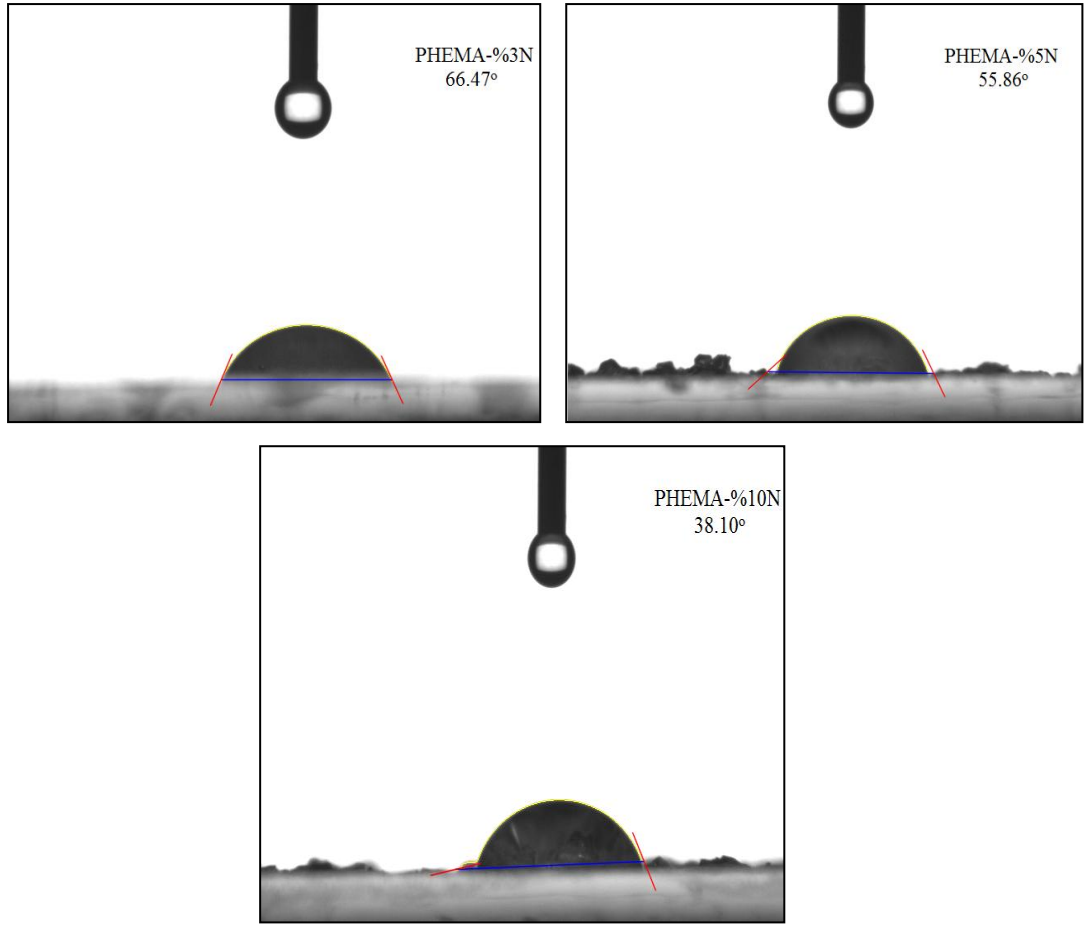


Şekil 4.14. Saf ve nişastalı PHEMA örneklerine ait % bozunurluk sonuçları

Saf ve nişasta katkılı PHEMA polimerimize ait sıvı temas açıları Şekil 4.15 ve 4.16'da verilmiştir. Bu sayede elde edilen polimerlerin hidrofilik karakterleri hakkında bilgi edinildi. Saf PHEMA için sıvı temas açısı 70.79° olarak belirlenmiştir. Nişasta katkılı polimerler için ise sırasıyla 68.82° , 66.47° , 55.86° ve 38.10° olarak bulunmuştur. Yapıdaki nişasta miktarı arttıkça sıvı temas açısının küçüldüğü görülmektedir. Buradan şu sonuca varabiliriz ki; hidrofilik bir polimer olan nişastanın yapıya katkılanmasıyla yapının hidrofilik karakterinin arttığı ve böylece polimer yüzeyinin daha çok ıslandığını anlamına gelir.



Şekil 4.15. Saf PHEMA ve % 1 nişasta içeren PHEMA polimer filmlerinin sıvı temas açısı görüntüleri

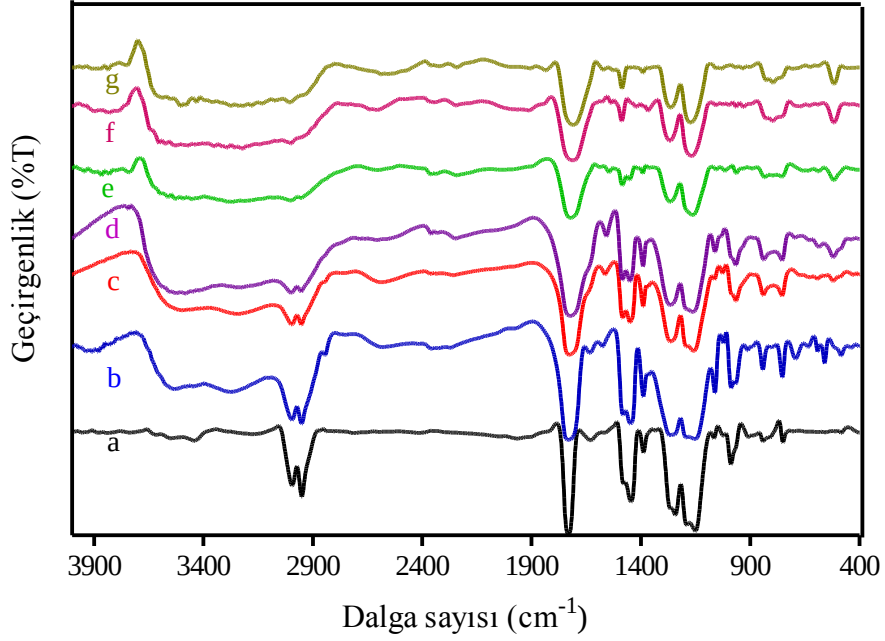


Şekil 4.16. %3, % 5 ve % 10 nişasta içeren PHEMA polimer filmlerinin sıvı temas açısı görüntüleri

Saf ve nişastalı PHEMA örneklerine ait çözünürlük testi sonuçlarına göre; PHEMA su içerisine bırakıldığında suyu absorbe ederek şişiyor ve hidrojel oluşturduğu bunun yanında etanol ve DMF varlığında polimerin çözündüğü gözlemlenmiştir.

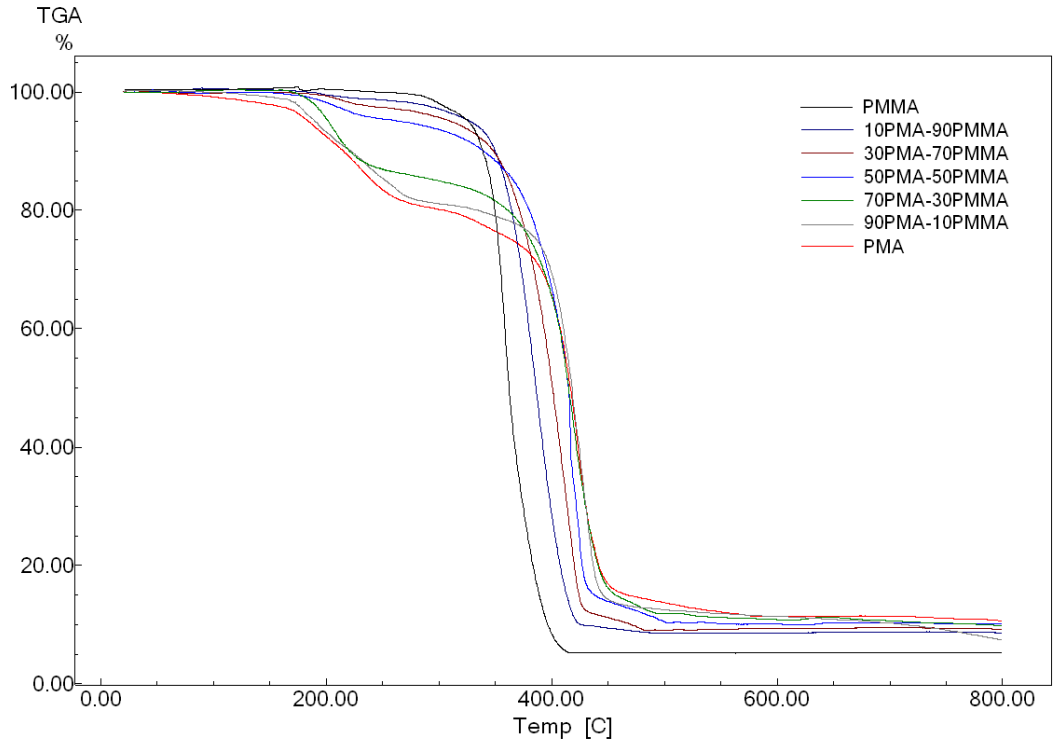
4.1.3. Farklı oranlarda PMA-PMMA içeren kopolimerlerin karakterizasyonu

Şekil 4.17'de PMMA ve PMA'nın farklı oranlarda polimerizasyonu ile elde edilen polimerik filmlerin FT-IR spektrumları verilmiştir. Bu spektrumlarda saf PMMA için keskin ve belirgin olan alifatik CH_2 gerilme titreşimleri 2960 cm^{-1} 'de bariz görülürken, metakrilik asit miktarı arttıkça bu pikin kaybolduğu spektrumdan anlaşılmaktadır. Yine aynı şekilde 1700 cm^{-1} 'de gözükken karbonil pikinin metakrilik asit miktarının artmasıyla pik şiddetinde düşme ve keskinliğinin azaldığı spektrumda görülmektedir. $1000\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ aralığında gelen eterik bağ pikinin de pik şiddetindeki azalma benzer şekilde görülmektedir.



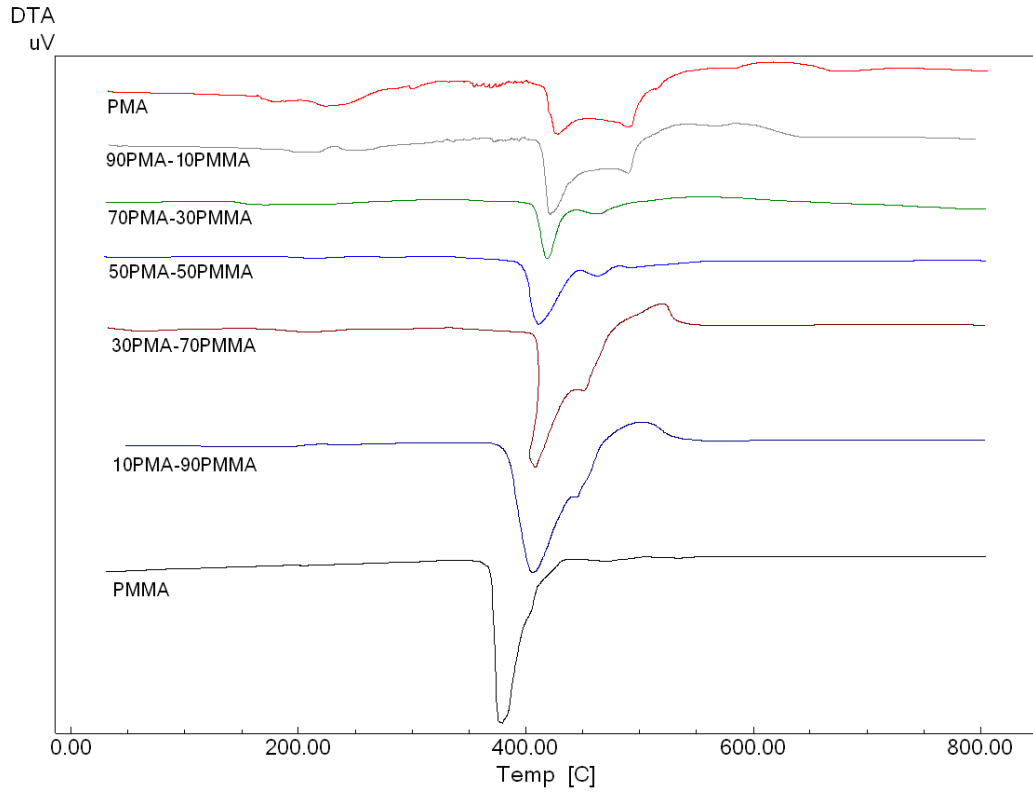
Şekil 4.17. Farklı oranlarda kopolimerleştirilmiş PMA-PMMA polimerlerine ait FT-IR spektrumları (a) PMMA, (b) 90:10 P(MMA:MA), (c) 70:30 P(MMA:MA), (d) 50:50 P(MMA:MA), (e) 30:70 P(MMA:MA), (f) 10:90 P(MMA:MA), (g) PMA

Şekil 4.18'de PMA-PMMA polimerlerinin TGA termogramları kıyaslamalı olarak verilmiştir. Bu termogramlarda PMMA yapısı için daha dik bir termal bozunma kütle kaybı görülürken PMA yapısı için ise iki kademeli bir kütle kaybı görülmektedir. PMA oranı arttıkça 1. kütle kaybı değerinin % 20' ye kadar arttığı görülmektedir. Yine PMA miktarı arttıkça 2. kütle kaybı değeri de bozunma başlangıç sıcaklığı açısından yaklaşık 50 °C'ye kadar daha yüksek sıcaklığa kaymaktadır. Bu zincirler arası etkileşimin artmasından kaynaklı bir sonuçtur. Zaten benzer sonuçlar % kalıntı miktarlarında da bir artış olarak açıkça görülmektedir.



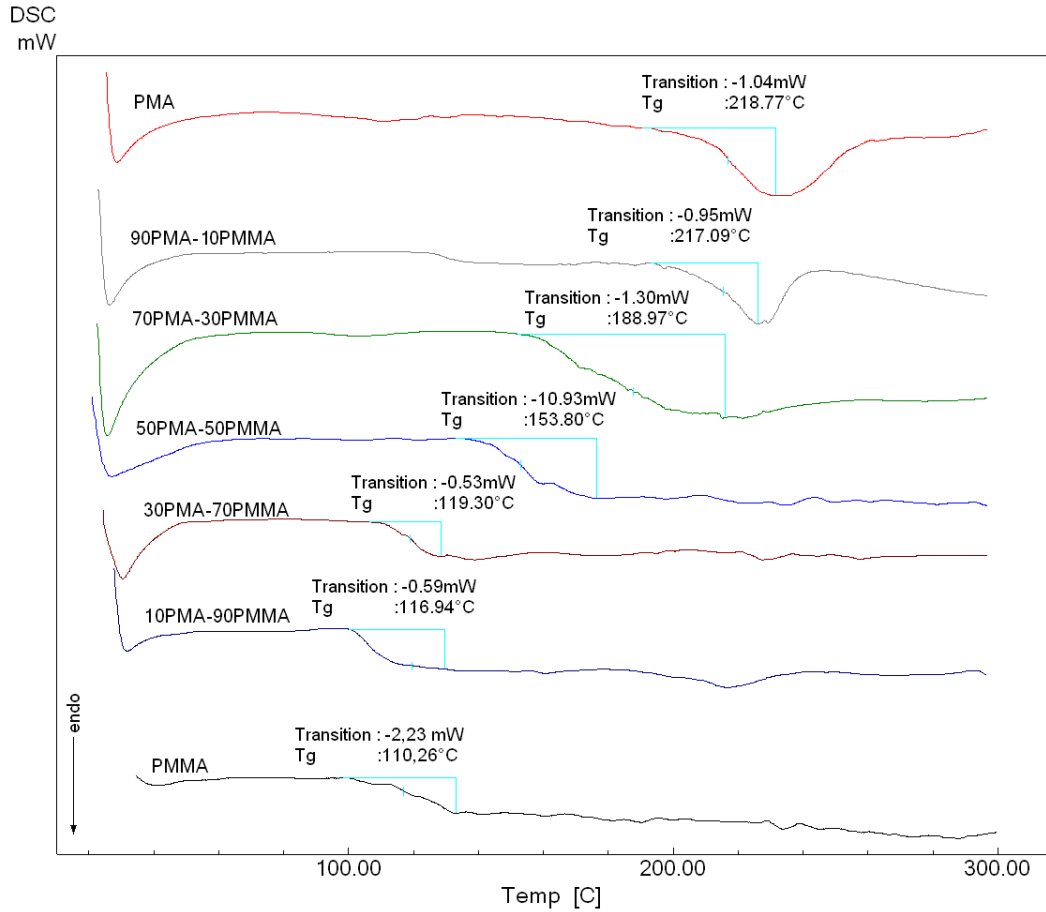
Şekil 4.18. Farklı oranlarda kopolimerleştirilmiş PMA-PMMA örneklerine ait TGA termogramları

PMA-PMMA polimerlerine ait DTA verileri Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Bu termogramlar incelendiğinde PMMA için tek bir endotermik bozunma piki görülürken PMA için iki farklı bozunma piki görülmektedir. Kopolimerlerde yapıdaki moleküler oranlar dikkate alındığında iki farklı bozunma piki görülürken, PMMA miktarı arttıkça 1. bozunma pikinin şiddeti de artmaktadır. Buda yapıdaki MMA miktarının düzenli olarak arttırıldığı anlamına gelmektedir.



Şekil 4.19. Farklı oranlarda kopolimerleştirilmiş PMA-PMMA örneklerine ait DTA termogramları

Aynı yapılarla ait DSC termogramları Şekil 4. 20'de verilmiştir. PMA için 218 °C görülen Tg geçişi PMMA için 110 °C olarak görülmüştür. Kopolimerizasyon sırasında PMA oranı artıkça Tg sıcaklığının büyüdüğü açıkça görülmektedir. PMA'nın yapısı gereği zincirler arası etkileşimi daha büyüktür ve bu polimerin daha sıkı ve sert istiflenmesine neden olmaktadır. Bu da polimer serbest hacim değerinin azalmasına, Tg değerinin ise artmasına yol açmaktadır.



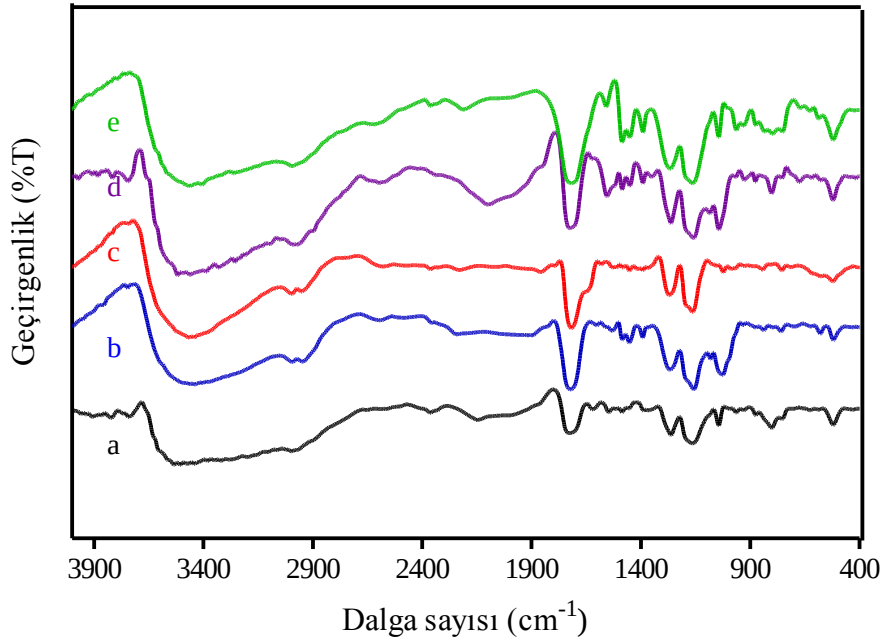
Şekil 4.20. Farklı oranlarda kopolimerleştirilmiş PMA-PMMA örneklerine ait DSC termogramları

Farklı oranlarda metilmetakrilat monomeri ilave edilerek elde edilen kopolimer serisinin çözünürlük testi yapıldığında 70:30 P(MA:MMA) kopolimerinden itibaren kopolimerlerin suda çözünmediği tespit edilmiştir. Ayrıca bu seriye yapılan enzim immobilizasyonu işlemi sonucunda elde edilen enzim immobilize sistemlerden en yüksek aktiviteyi 70:30 P(MA:MMA) kopolimerinin göstermiştir. Dolayısıyla suda çözünmediği ve en yüksek aktiviteyi gösterdiğinden dolayı çalışmalarımıza bu oranlardaki kopolimer ile devam edilmiştir.

4.1.4. Saf ve % 1, % 3, % 5, % 10 nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) karakterizasyonu

Saf 70:30 P(MA:MMA) ve nişasta kompozitlerine ait FT-IR spektrumları Şekil 4.21'de verilmiştir. İlgili şekil incelendiğinde saf polimerik yapıya bakıldığında hem PMMA hem de PMA yapısından kaynaklı pikleri görmekteyiz. İki temel yapı

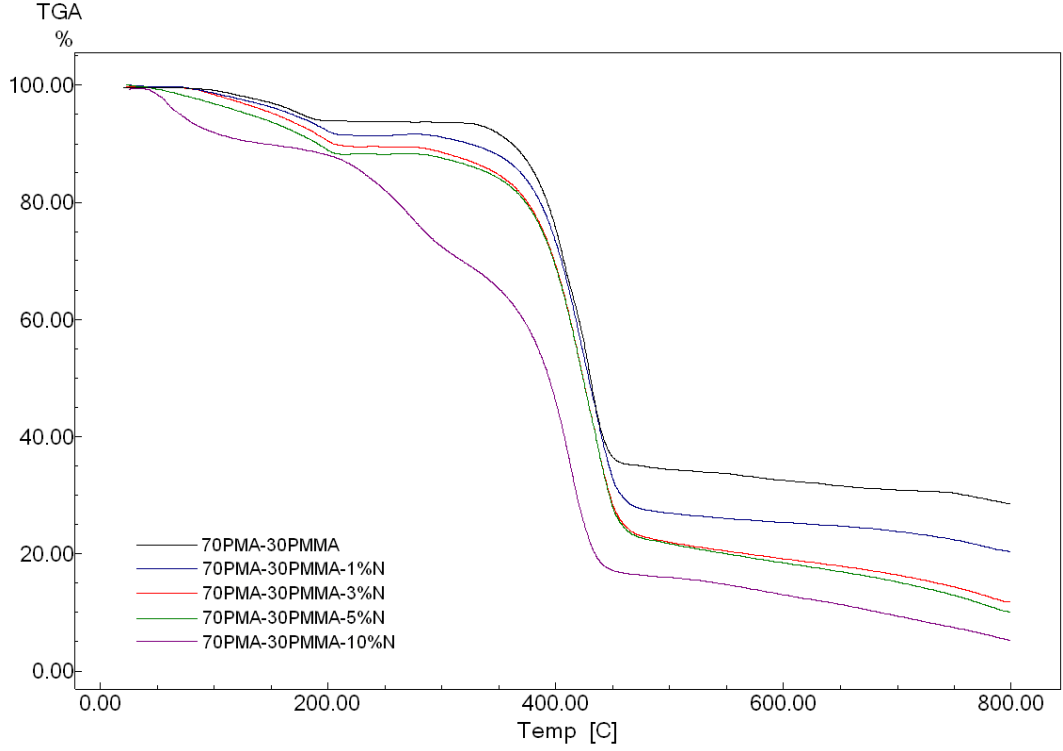
arasında en büyük fark karbonil gruplarının ester ve asit olarak başkalaşmasıdır. Bu nedenle bu polimerik saf türlerin polimerik yapılardan farklı olarak karbonil pikinin daha geniş bir alan kapsamaktadır. Bu pikler ince keskin bir pik değil de bir band spektrumu şeklindedir. Nişasta kompozitlerinde belirgin bir şekilde nişasta yapısından kaynaklı olarak hidroksil grupları gösterdiği hidrojen bağına ait gerilme titreşimi oldukça genişlemektedir. Hatta bu pik % 10 nişasta kompozitinde alifatik CH₂ gerilme titreşimi olan 2850-2950 cm⁻¹'deki pike kadar uzanmaktadır. Yine nişasta yapısı arttıkça 1270 cm⁻¹'deki COC eterik gerilme titreşimi de heksoz yapılarındaki COC bağından kaynaklı olarak artmaktadır. Bu düzenli değişimler istenilen yapıya ulaşıldığını ispatlamaktadır.



Şekil 4.21. Saf ve nişastalı 70:30 P(MA:MMA) örneklerine ait FT-IR spektrumları (a) 70:30 P(MA:MMA), (b) % 1, (c) % 3, (d) % 5, (e) % 10 nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA)

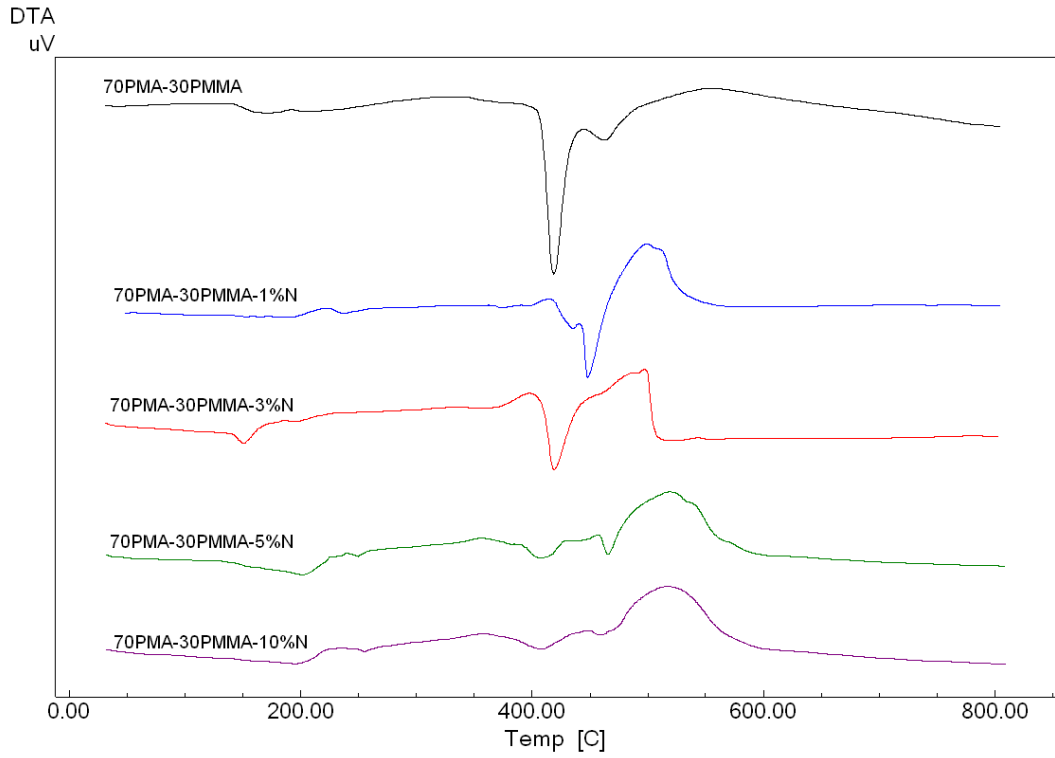
70:30 P(MA:MMA) ve nişastalı kompozitlerine ait TGA verileri Şekil 4.22'de gösterilmiştir. Bu termogramlarda genel olarak 2 temel kütle kaybı görülmektedir. Ancak % 10 nişasta içeren polimerik yapıda 3 farklı kütle kaybı görülür. Nişastanın nem bağlama özelliğinin fazla olmasından dolayı bu polimerde 50-100 °C arasında görülen kütle kaybı genellikle polimerdeki çözücü ve nemden kaynaklanır. İkinci kütle kaybı nişastanın bozunması, 3. ise polimerik yapının bozunmasına aittir. Nişasta kompozitlerinde ise nişasta oranına bağlı olarak artmakta olan ilk kütle kaybı

değeri saf polimerik yapıdaki yan grupların bozunmasından kaynaklı pik şeklinde görülmekte ve % 4 civarında bir değer almaktadır. Tüm polimer ve nişasta kompozitlerin esas bozunma sıcaklığı 350-450 °C arasında olup oldukça keskin bir değerdir.



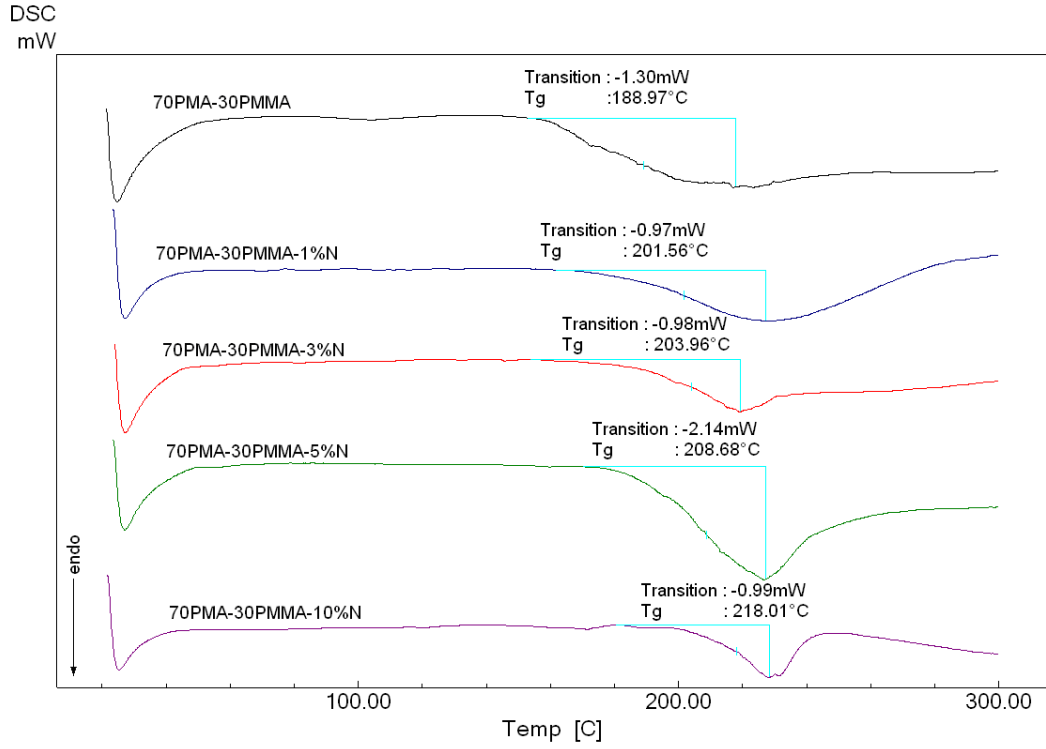
Şekil 4.22. Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) örneklerine ait TGA termogramları

Benzer yorumlamalar Şekil 4.23'de verilen DTA termogramlarında da yapılabilir. Polimerin saf yapısı için tek bir endotermik değer görülürken nişasta miktarı arttıkça 200 °C civarında başlayan ve nişastanın bozunmasından kaynaklı birer ekzoterm oluşmaktadır.



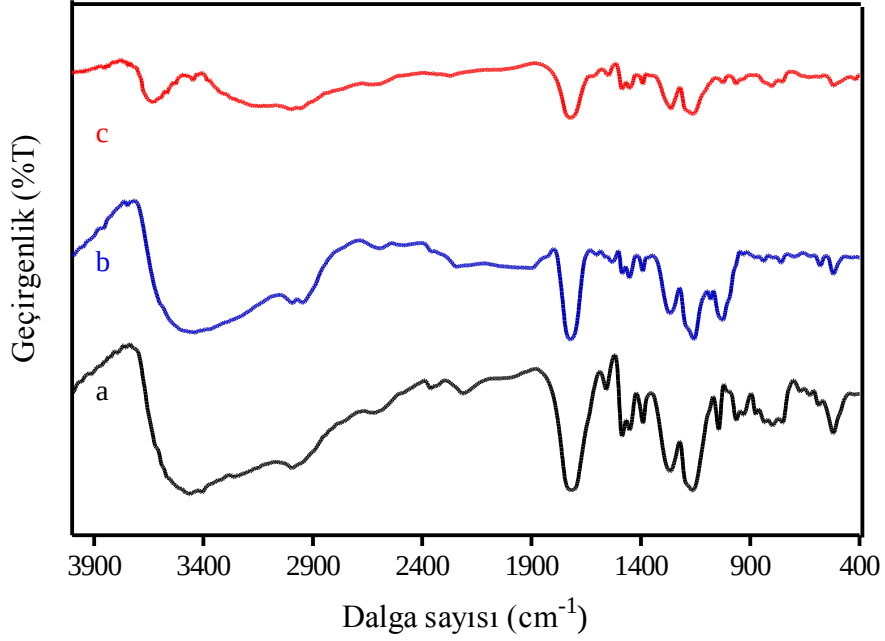
Şekil 4.23. Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) örneklerine ait DTA termogramları

Kopolimerik yapıya ait Tg sıcaklığını veren termogramlar Şekil 4.24'de gösterilmiştir. Saf polimerin Tg sıcaklığı 188 °C iken, nişastalı yapılar için sırasıyla 201, 203, 208, 218 °C olarak görülmektedir. Bu artışın en temel nedeni nişasta ve PMA hidroksilleri arasında oluşan kuvvetli hidrojen bağları ve nişastanın çapraz bağlayıcı bir ajan olarak davranmasıdır. Bu sayede polimer evinimleri (hareketlilikleri) azalacak ve polimerik filmlerin Tg değeri yükselecektir.



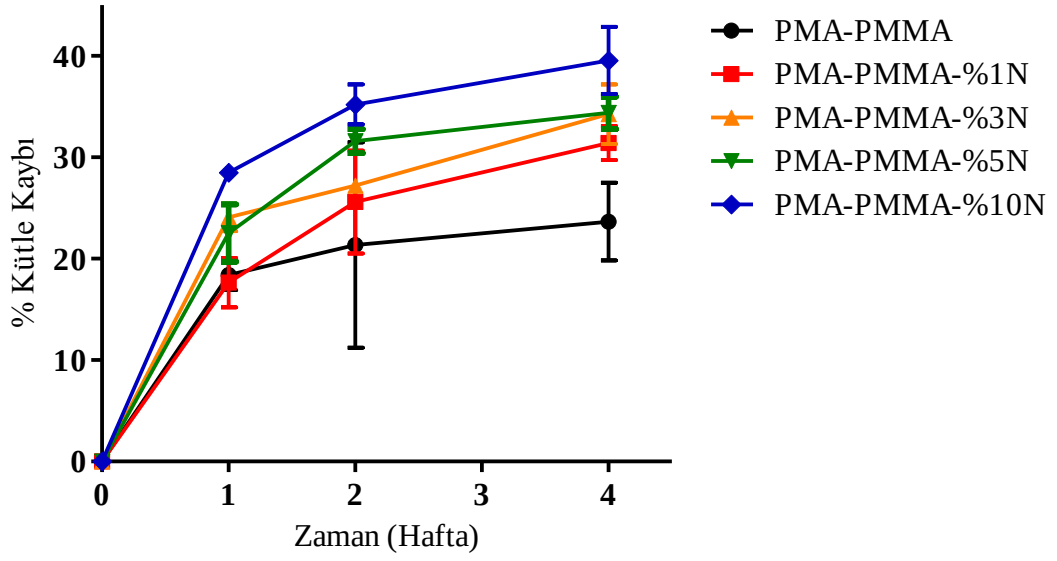
Şekil 4.24. Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) örneklerine ait DSC termogramları

Şekil 4.25 incelendiğinde saf polimerik yapıdan enzim taşıyan yapıya gidildikçe yapıdaki değişim oldukça belirgin olarak görülmektedir. Özellikle polimer yapısına katılanma meydana geldikçe piklerin şiddeti düşmekte ve CO pikinin diğer piklere göre oranı azalmaktadır. Bu değişim polimer yapısı haricindeki maddelerin polimer piklerinin baskılanmasından kaynaklanmaktadır.



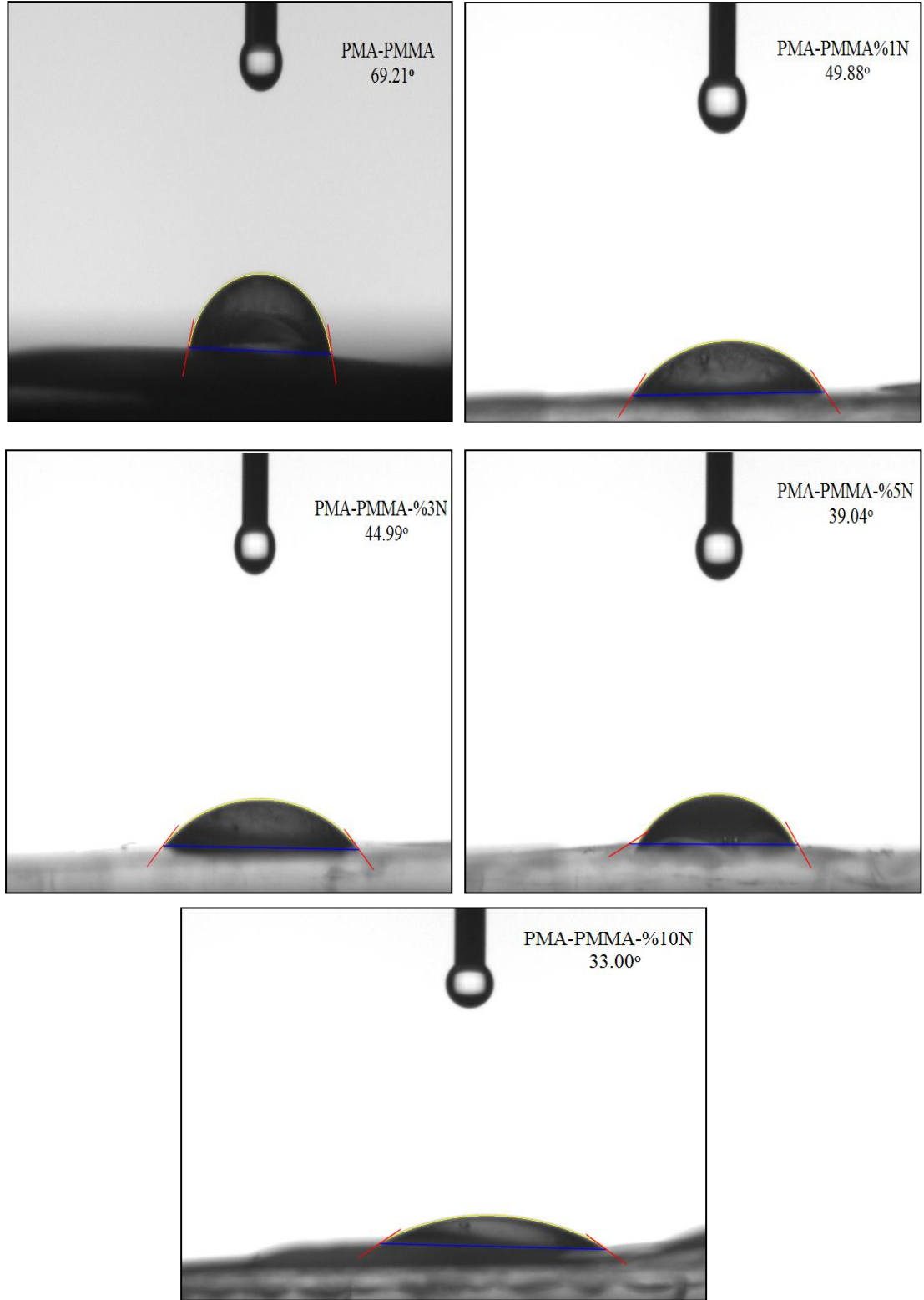
Şekil 4.25. Nişastasız, % 5 nişastalı ve % 5 nişastalı enzimli 70:30 P(MA:MMA) örneklerine ait FT-IR spektrumları (a) 70:30 P(MA:MMA), (b) 70:30 P(MA:MMA)-% 5N, (c) 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn

Şekil 4.26'da saf ve nişasta katkılı polimer örneklerine ait 1, 2 ve 4 haftalık bozunurluk test sonuçları verilmiştir. Yapılan biyobozunurluk testi sonuçlarına göre saf polimer ilk haftada % 18'lik bir kütle kaybı yaşarken, yapıya nişasta katkılanmasıyla bu kaybın daha fazla olduğu görülmektedir. Özellikle en fazla nişasta miktarı taşıyan polimer 1 ay sonunda yaklaşık % 40'lık bir kütle kaybına sahiptir. Bunun açıkça sebebi nişastanın polimerimize katkılanmasıyla bu polimerin canlı sistem koşullarındaki uyumluluğunu ve bozunurluluğunu arttırmasıdır. Bu polimer ayrıca diğer PMMA ve PHEMA ile karşılaştırıldığında en çok bozunan polimer olarak görülmektedir.



Şekil 4.26. Saf ve nişastalı 70:30 P(MA:MMA) kopolimerine ait % bozunurluk sonuçları

Saf ve nişasta katkılı polimerimize ait sıvı temas açıları Şekil 4.27'de verilmiştir. Bu sayede elde edilen polimerlerin hidrofilik karakterleri hakkında bilgi edinildi. Saf polimer için sıvı temas açısı 69.21° olarak belirlenmiştir. Nişasta katkılı polimerler için ise sırasıyla 49.88° , 44.99° , 39.04° ve 33.00° olarak bulunmuştur. Yapıdaki nişasta miktarı arttıkça sıvı temas açısının küçüldüğü görülmektedir. Buradan şu sonuca varabiliriz ki; hidrofilik bir polimer olan nişastanın yapıya katkılanmasıyla yapının hidrofilik karakterinin arttığı ve böylece polimer yüzeyinin daha çok ıslandığını anlamına gelir.



Şekil 4.27. Saf ve nişastalı 70:30 P(MA:MMA) polimer filmlerinin sıvı temas açısı görüntüleri

Bu polimere yapılan çözünürlük test sonuçları sonucunda PMA suda çözünen bir polimer olmasına rağmen MMA ile kopolimerleştirilen polimerin suda

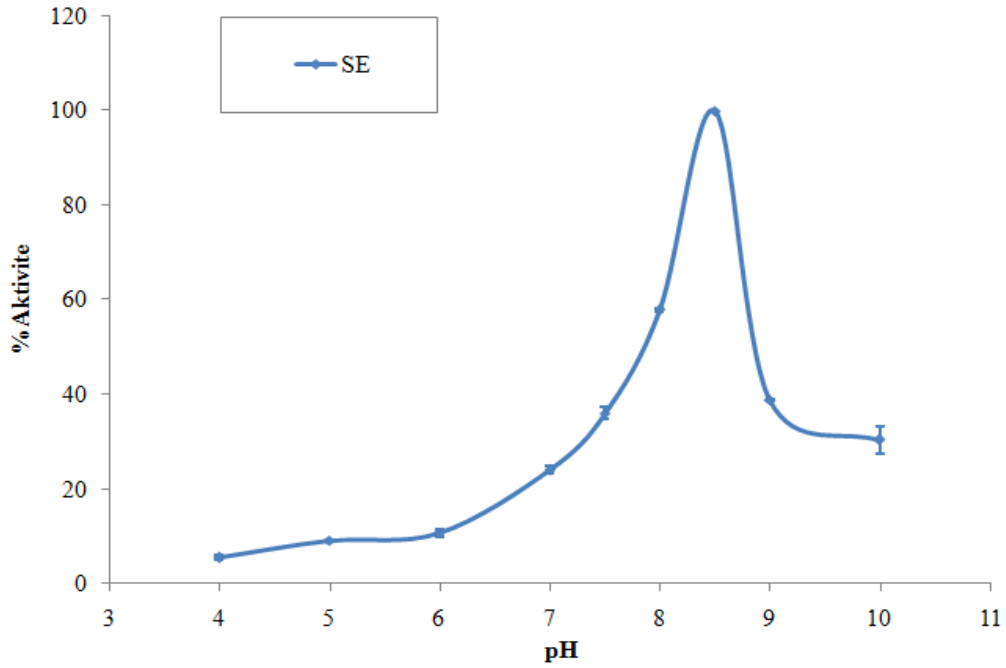
çözünmediği belirlenmiştir. Bu polimerin en fazla DMSO'da çözündüğü görülmüştür.

4.2. Serbest L-asparaginazın Optimum pH'sının Belirlenmesi

Serbest L-asparaginazın optimum pH'sının belirlenmesi için enzim miktarı, substrat derişimi ve sıcaklık sabit tutularak 50 mM farklı pH'larda tampon çözeltilerde (pH:4, 5, 6 asetat tamponu ve pH:7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10 Tris-HCl tamponu) serbest L-asparaginaz aktivite deneyi yapılmış, bulunan aktivite sonuçları pH'ya karşı tabloya geçirilmiştir (Tablo 4.1). Tablodan da görüldüğü gibi serbest L-asparaginazın optimum pH değeri 8.5 olarak bulunmuştur. Enzimin optimum pH'sının üstündeki pH değerlerinde bariz şekilde aktivite kaybettiği görülmektedir.

Tablo 4.1. Serbest enzimin değişen pH değerlerine karşı aktivite sonuçları

pH	Enzim Hacmi (µl)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
4	50	0.163	9.74±0.64	5.38
5	50	0.243	16.4±0.05	9.07
6	50	0.278	19.3±0.23	10.6
7	50	0.569	43.5±1.06	24.0
7.5	50	0.828	65.1±1.76	36.0
8	50	1.30	104.4±1.70	57.7
8.5	50	2.21	180.8±2.06	100
9	50	0.889	70.2±0.53	38.8
10	50	0.704	54.8±5.95	30.3



Şekil 4.28. Serbest L-asparaginaz aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi

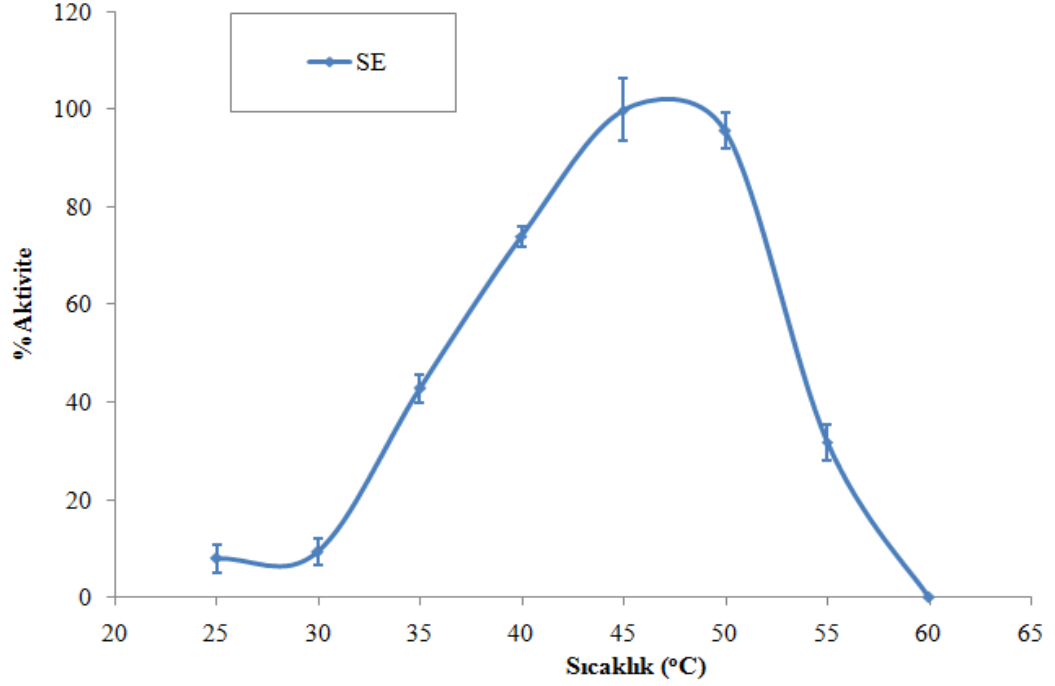
4.3. Serbest enzimin optimum ve maksimum sıcaklığın belirlenmesi

Serbest L-asparaginazın optimum ve maksimum sıcaklığının belirlenmesi için enzim miktarı, substrat derişimi ve pH sabit tutularak farklı sıcaklıklarda (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 ve 60 °C) serbest L-asparaginaz aktivite deneyi yapılmış ve bulunan aktivite sonuçları sıcaklığa karşı tabloya geçirilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Serbest enzimin değişen sıcaklık değerlerine karşı aktivite sonuçları

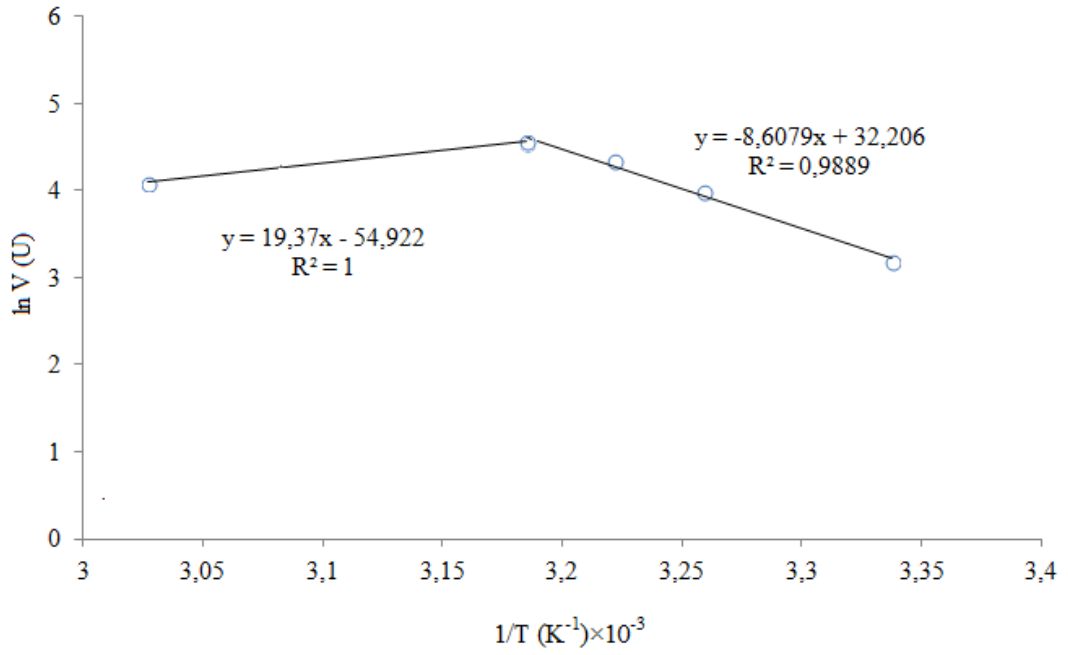
T (°C)	Enzim Hacmi (µl)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
25 °C	50	0.074	2.24±0.48	7.9
30 °C	50	0.078	2.62±0.43	9.2
35 °C	50	0.193	12.16±0.48	42.8
40 °C	50	0.299	21.03±0.77	74.0
45 °C	50	0.388	28.41±1.03	100
50 °C	50	0.373	27.16±0.66	96
55 °C	50	0.155	9.03±0.74	31.8
60 °C	50	0	0	0

Çizelgeden görüldüğü gibi serbest L-asparaginazın optimum sıcaklık değeri 45 °C, maksimum sıcaklık değeri ise 55 °C olarak bulunmuştur. Serbest enzim en iyi aktiviteyi 40-50 °C arasında göstermektedir. 55 °C üzerinde enzimin denatüre olarak aktivitesini tamamen yitirdiğini gözlemlenmiştir.



Şekil 4.29. Serbest L-asparaginaz aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

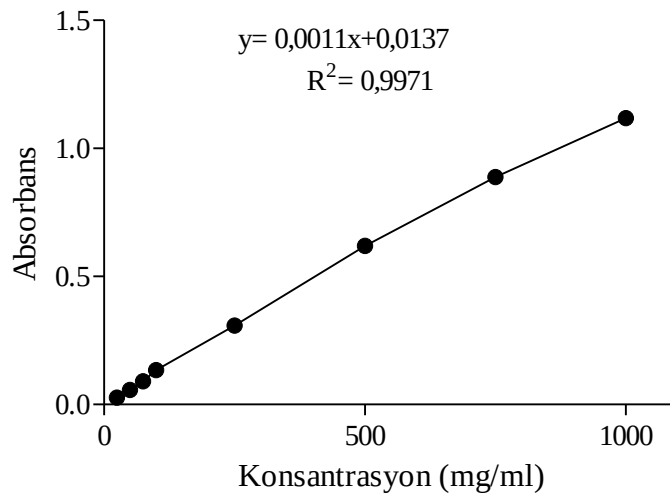
Serbest L-asparaginazın sıcaklığa bağlı olarak değişen aktivite değerleri Arrhenius bağıntısına göre grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.30 elde edilmiştir. Grafikte aktivitenin arttığı ve azaldığı bölgeler ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Aktivitenin sıcaklıkla arttığı doğrunun eğimini kullanarak serbest enzimin aktivasyon enerjisi 72 J mol⁻¹K⁻¹ olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.30. Serbest L-asparaginaz'ın Arrhenius grafiği

4.4. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

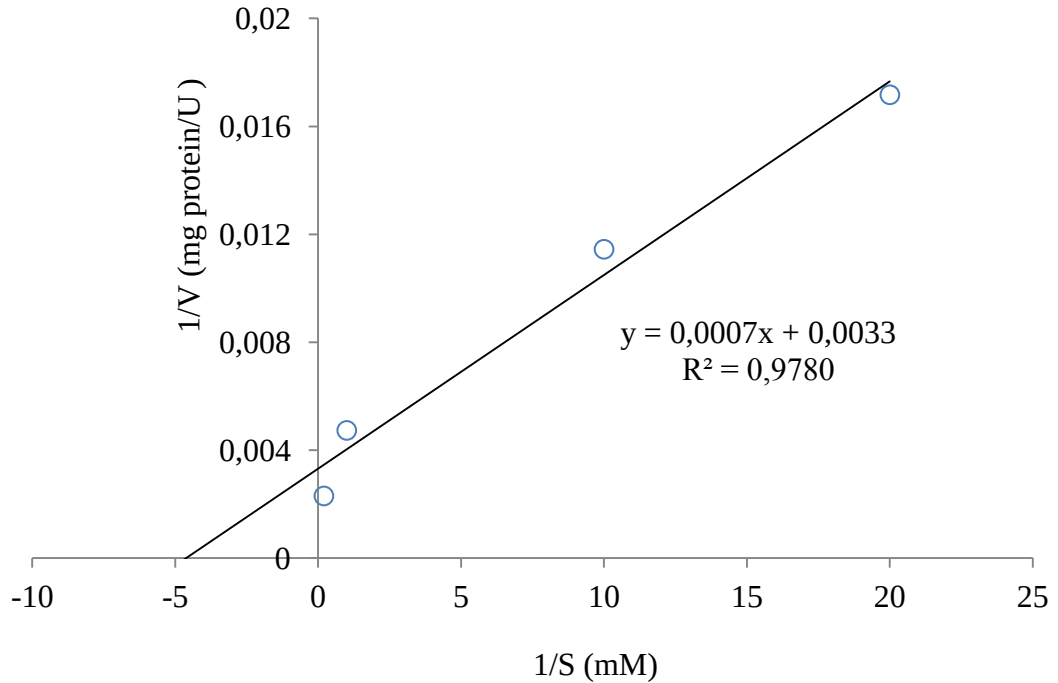
Kantitatif protein tayininde Bradford yöntemi kullanıldı. Standart grafik Bölüm 3.16'de açıklandığı gibi hazırlandı. Serbest enzimin ve immobilize enzimin protein miktarları bu standart grafiğe göre belirlendi. Standart çözeltideki mg proteine karşılık gelen absorbans değerleri Şekil 4.31'de gösterilmiştir.



Şekil. 4.31. Bradford yöntemi ile protein miktarının tayin edilmesinde kullanılan standart grafik

4.5. Serbest enzimin kinetik parametrelerinin hesaplanması

Serbest L-asparaginazın aktivitesine substrat derişiminin etkisi incelemek için 0.1-10 mM aralığında farklı konsantrasyonlarda Tris-HCl (pH:8.5) ile hazırlanan substrat çözeltiler ile enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlardan yararlanarak çizilen Lineweaver-Burk (Şekil 4.32) denkleminde serbest enzime ait K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. Serbest enzim için K_m değeri 0.216 mM, V_{max} değeri ise 301.4 U/mg protein olarak bulunmuştur. Serbest enzime için bulunan K_m ve V_{max} değeri literatür ile uyum içindedir.



Şekil 4.32. Serbest enzime ait Lineweaver-Burk grafiğı

4.6. Serbest enzimin depo kararlılığının belirlenmesi

Serbest L-asparaginazın depo kararlılığı +4 °C ve +25 °C sıcaklıklarında 30 gün boyunca depolanmış ve 1, 2, 3, 4, 7, 15, 30. günlerde serbest enzimin aktivitesi ölçülmüştür. Tablo 4.3 ve 4.4'te elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. Tablo 4.3'e bakıldığında +4 °C'de depolanan serbest enzim başlangıç aktivitesini büyük oranda korumaktadır. 4 hafta süre zarfında enzim % 89 oranında aktivitesini korumuştur.

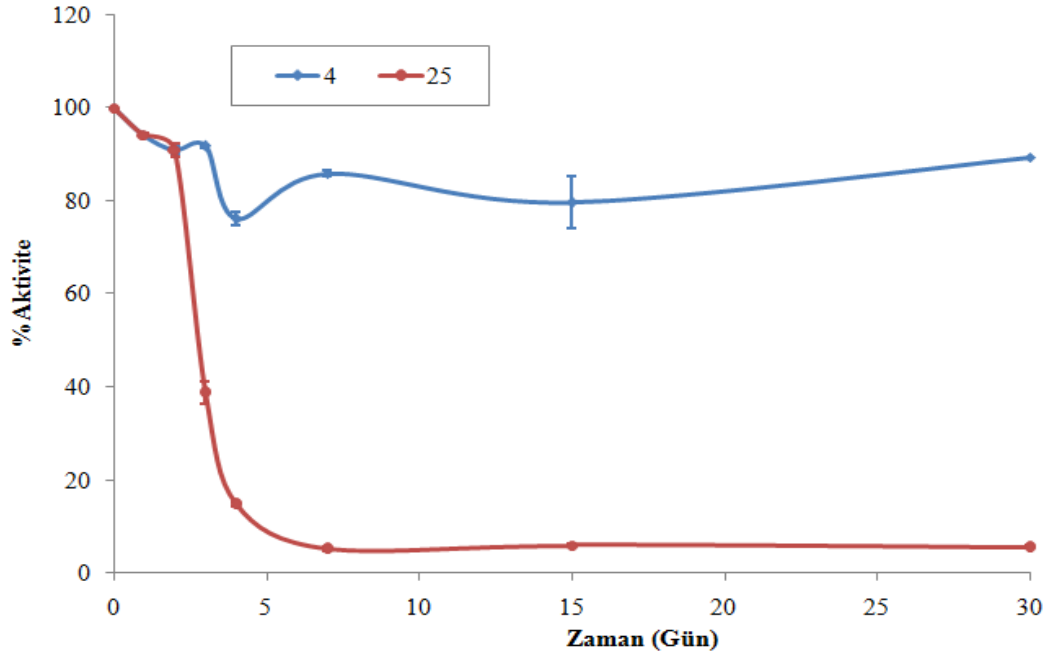
Tablo 4.3. +4 °C'de depolanan serbest enzimin günlere kıyasla aktivite sonuçları

Süre (Gün)	Saklama Koşulu (°C)	Enzim Hacmi (µl)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
0	+4	50	2.695	217.7±0.0	100
1	+4	50	2.492	204.9±1.0	94.1
2	+4	50	2.422	197.95±1.64	90.9
3	+4	50	2.444	199.74±0.88	91.8
4	+4	50	2.287	165.86±3.06	76.2
7	+4	50	2.291	186.99±1.23	85.9
15	+4	50	2.127	173.36±12.3	79.6
30	+4	50	2.382	194.16±0.0	89.3

Tablo 4.4'e bakıldığında ise serbest enzimin +25 °C'de 2-3 gün arasında başlangıç aktivitesinin yarılacağı görülmektedir. 15 gün sonunda ise başlangıç aktivitesinin yaklaşık % 95 oranında kaybetmiştir.

Tablo 4.4. +25 °C'de depolanan serbest enzimin günlere kıyasla aktivite sonuçları

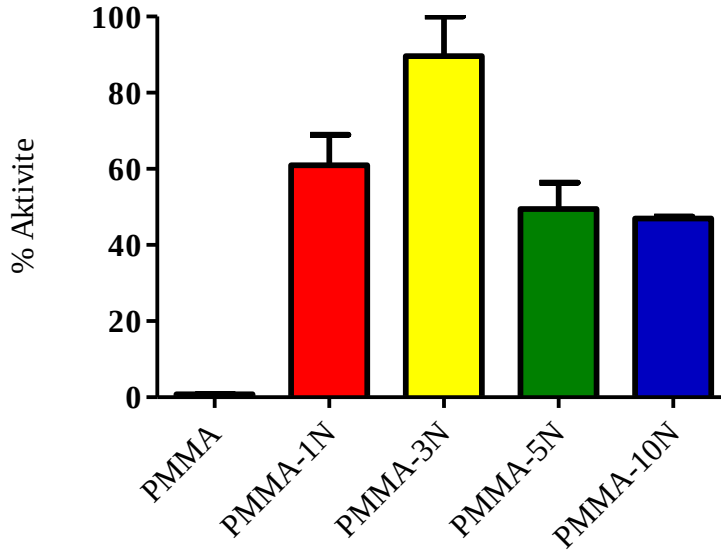
Süre (Gün)	Saklama Koşulu (°C)	Enzim Hacmi (µl)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
0	+25	50	2.659	217.7	100
1	+25	50	2.507	204.9	94.2
2	+25	50	2.423	198	90.9
3	+25	50	1.057	84.2	38.7
4	+25	50	0.429	31.83	14.6
7	+25	50	0.183	11.33	5.20
15	+25	50	0.202	12.9	5.91
30	+25	50	0.190	11.9	5.5



Şekil 4.33. Serbest L-asparaginazın depolama kararlılığı

4.7. Saf ve Nişastalı PMMA Polimerine Enzim İmmobilizasyonu

Saf ve % 1, 3, 5, 10 nişastalı PMMA örneğine immobilize edilen enzime ait aktivite sonuçları Şekil 4.34 ve Tablo 4.5'de gösterilmiştir. % aktivite sonuçlarına bakıldığında saf PMMA örneğine immobilize olan enzimin aktivitesi % 0.89 gibi düşük bir orandadır. Fakat yapıya katılan nişasta sayesinde aktivite artmaktadır. Yapılan nişasta seri çalışmasında en yüksek aktiviteyi % 3 nişasta oranına sahip olan PMMA polimerine immobilize olan enzim vermiştir. Yapıya katılan nişastanın -OH grupları ile enzimde bulunan yüklü gruplar arasındaki ikincil etkileşimlerden dolayı enzim polimerik yapıya daha fazla tutunur ve bunun sonucunda aktivitede belirgin bir artış söz konusu olur. Fakat yapıya katılan nişasta oranı arttıkça aktivitede bir kayıp gözlenmiştir. Bunun sebebi olarak, fazla nişastanın -OH gruplarının fazla olmasının sterik ve difüzyonel gibi etkiler doğurabileceği ve enzimin taşıyıcıya tutuklanma aşamasında bu etkiler yüzünden enzimde bir yanlış konformasyon yönelmesine neden olabilmektedir. Bunun sonucunda enzimde aktivite kaybı olduğu düşünülebilir. Bundan dolayı optimizasyon ve karakterizasyon süreçlerinde çalışmalarımıza en fazla aktiviteyi gösteren % 3 oranında nişasta katkılı PMMA ile devam edilmiştir.



Şekil 4.34. Saf ve nişasta katkılı PMMA örneklerine immobilize edilen enzimin aktivite sonuçlarının sütun grafiği olarak gösterimi

Tablo 4.5. Saf ve nişasta katkılı PMMA örneklerine immobilize edilen enzimin aktivite sonuçları

Örnek	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
PMMA	5	0.015	1.2±0.0035	0.9
PMMA-% 1 N	5	1.15	91.95±0.257	68.9
PMMA-% 3 N	5	1.65	133.62±0.333	100
PMMA-% 5N	5	0.95	75.28±0.221	56.4
PMMA-% 10N	5	0.81	63.62±0.0185	47.5

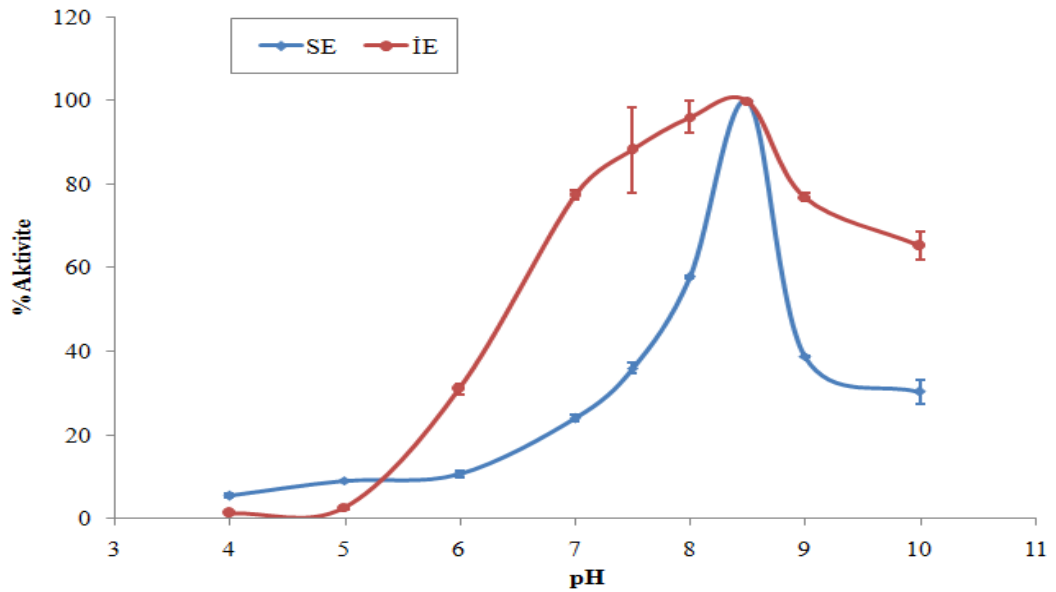
4.7.1. PMMA-% 3N-Asn'nin optimum pH'ın belirlenmesi

Adsorpsiyon yöntemiyle % 3 nişastalı PMMA örneğine immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine pH etkisini incelemek amacıyla örnek miktarı, substrat derişimi ve sıcaklık sabit tutularak 50 mM farklı pH'larda tampon çözeltilerde (pH:4, 5, 6 asetat tamponu ve pH:7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10 Tris-HCl tamponu) immobilize L-asparaginaz aktivite deneyi yapılmış, bulunan aktivite sonuçları Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. PMMA-% 3N-Asn'nin değişen pH değerlerine karşı aktivite sonuçları

pH	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
4	5	0.008	0.49±0.07	1.3
5	5	0.017	1.03±0.25	2.7
6	5	0.186	11.62±1.3	30.9
7	5	0.396	29.12±1.53	77.5
7.5	5	0.445	33.16±6.06	88.2
8	5	0.480	36.11±3.88	96.1
8.5	5	0.498	37.58±2.53	100
9	5	0.394	28.91±2.29	76.9
10	5	0.341	24.53±0.35	65.3

Serbest enzim için optimum pH değeri 8.5 olarak belirlenmiştir. Tablodan da anlaşılacağı üzere immobilize enzim için de optimum pH değeri 8.5 olarak bulunmuştur. Enzim taşıyıcıya adsorpsiyon yöntemi kullanılarak immobilize edildiği için herhangi bir kimyasal bağlanma olmadığından optimum pH değişmemektedir. Yine serbest enzimde olduğu gibi immobilize enzimde optimum pH değerinin altında ve üstünde pH değerlerinde aktivite kaybetmektedir.

**Şekil 4.35.** Serbest enzim ve PMMA-% 3N-Asn'nin aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi

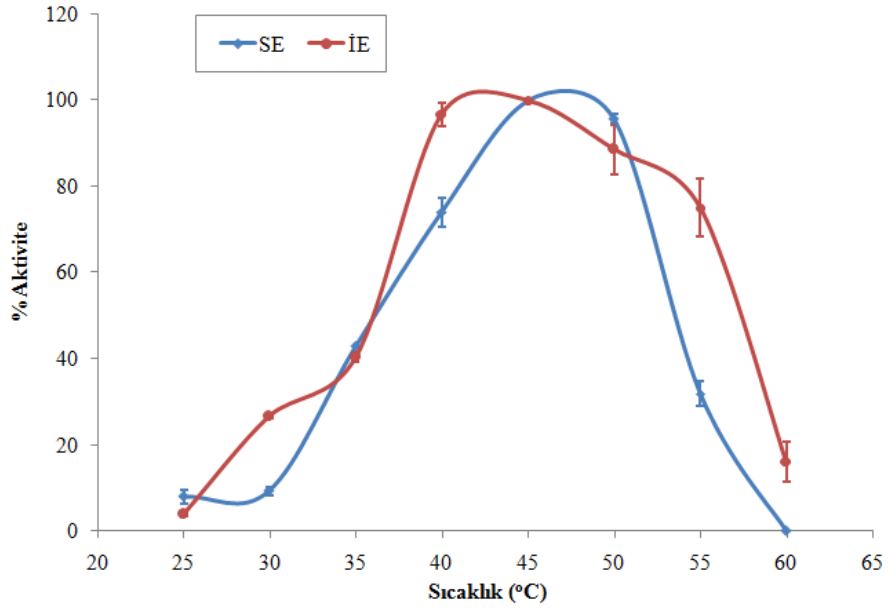
4.7.2. PMMA-% 3N-Asn'nin optimum ve maksimum sıcaklığının belirlenmesi

Adsorpsiyon yöntemiyle % 3 nişasta katkılı PMMA örneğine immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla farklı sıcaklıklarda aktivite ölçümü deneyleri yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. PMMA-% 3N-Asn'nin değişen sıcaklık değerlerine karşı aktivite sonuçları

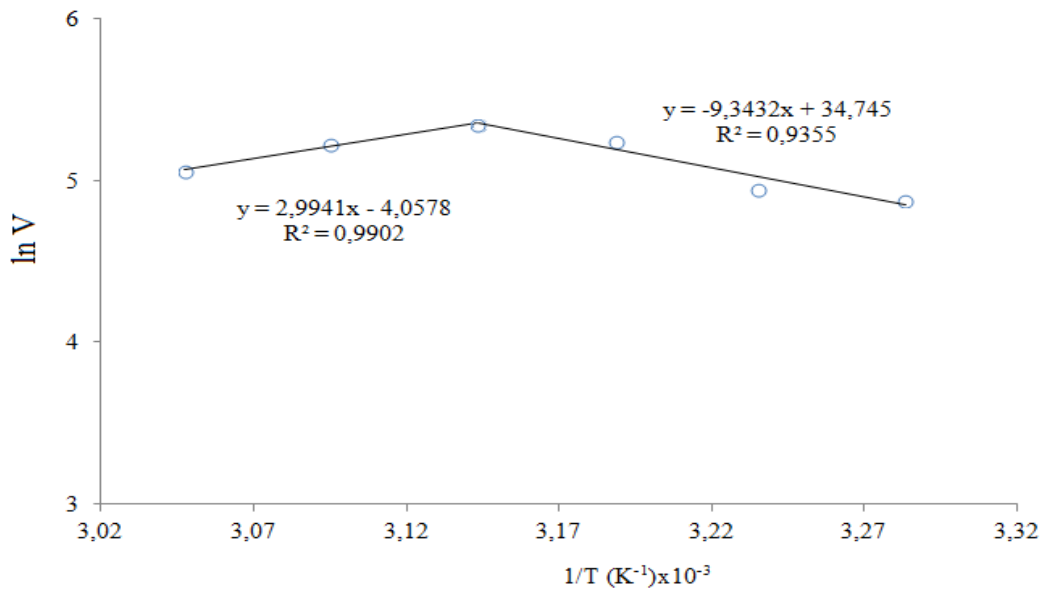
T (°C)	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
25 °C	5	0.145	8.2±0.94	3.9
30 °C	5	0.712	55.45±0.82	26.4
35 °C	5	1.063	84.7±0.0	40.3
40 °C	5	2.482	202.9±0.0	96.7
45 °C	5	2.564	209.6±5.77	100
50 °C	5	2.275	185.7±17.32	88.6
55 °C	5	1.936	157.3±18.6	75
60 °C	5	0.453	33.85±10.5	16.1

Serbest enzim için optimum sıcaklık 45 °C olarak belirlendi. PMMA-% 3N desteklerine immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı da tıpkı serbest enzimde olduğu gibi 45 °C olarak bulundu. Çünkü enzim ile destek arasında kimyasal bir bağlanma söz konusu değildir. Bundan dolayı enzimin yapısında herhangi bir kimyasal modifikasyon olmadığı için optimum sıcaklığın değişmemesi beklenen bir durumdur. Fakat maksimum sıcaklık değişkenlik gösterir. Serbest enzim 55 °C üzerinde denatüre olurken, PMMA-% 3N desteklerine immobilize edilen enzim 60 °C bile % 16.1 oranında aktivitesini korumayı başarmıştır. Bu aktiviteyi korumasının nedeni taşıyıcı destek olarak kullanılan nişastalı PMMA polimerinin bozunma sıcaklığının yüksek olmasıdır. Serbest enzim polimere ikincil etkileşimlerle bağlandığı için aktif merkezini polimer sayesinde sıcaklığa karşı koruyabiliyor ve serbest enzimin denatüre olduğu sıcaklıklarda dahi aktivitesini koruyabilmektedir.



Şekil 4.36. Serbest enzim ve PMMA-% 3N-Asn'nin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

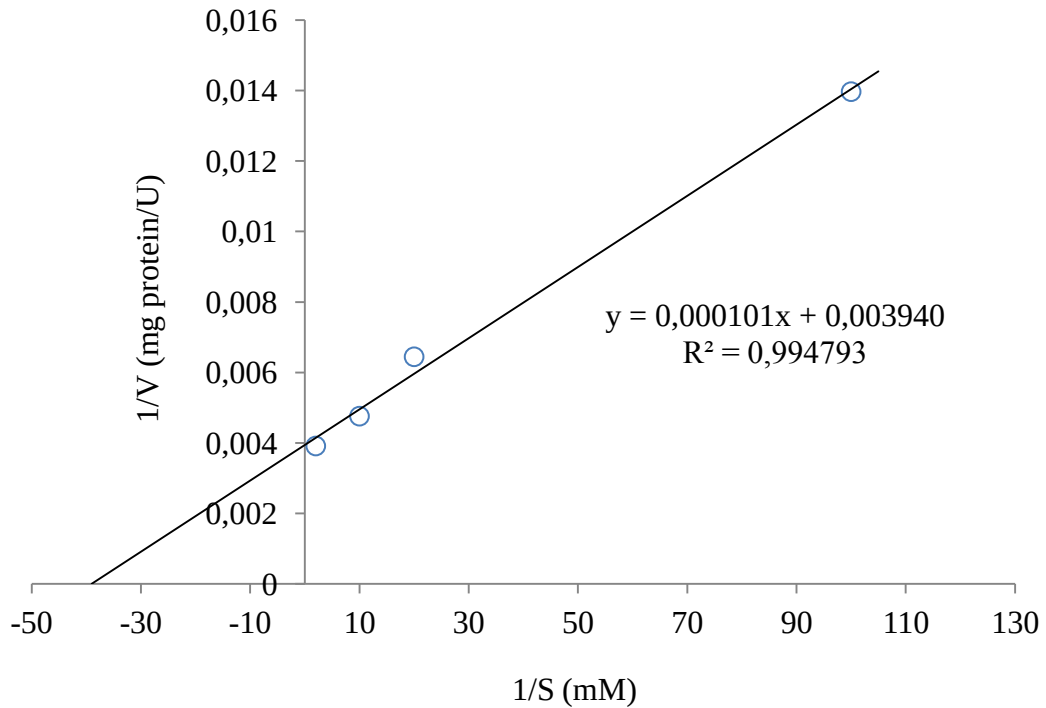
PMMA-% 3N-Asn immobilize enzimine ait Arrhenius grafiği Şekil 4.37'de gösterilmiştir. Aktivitenin sıcaklıkla artışı doğrunun eğimini kullanarak PMMA-% 3N-Asn için aktivasyon enerjisi $77 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değer serbest enzimin aktivasyon enerjisi ile neredeyse aynıdır. PMMA-% 3N polimerine immobilizasyon edilen enzimin aktifleşme enerjisi değişmemiştir.



Şekil 4.37. PMMA-% 3N-Asn'nin Arrhenius grafiği

4.7.3. PMMA-% 3N-Asn'nin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

% 3 nişasta katkılı PMMA örneğine immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimlerde hazırlanan substrat çözeltileriyle enzim aktivite tayini yapılmıştır. Bulunan değerler ile çizilen Lineweaver-Burk grafiğı Şekil 4.38'de gösterilmiştir ve verilen grafik yardımı ile K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. PMMA-% 3N-Asn için K_m değeri 0.0256 mM, V_{max} değeri ise 253.81 U/mg protein olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.38. PMMA-% 3N-Asn'nin Lineweaver-Burk grafiğı

4.7.4. PMMA-% 3N-Asn'nin depo kararlılıının belirlenmesi

% 3 nişastalı PMMA polimerine adsorpsiyon tekniğı ile immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine depolanma süresinin etkisini incelemek amacıyla immobilize enzim +4 °C ve +25 °C sıcaklıklarında karanlık ortamda saklanmıştır. 1., 2., 3., 4., 7., 15., ve 30. günlerde immobilize enzimin aktivitesi ölçülerek depolanma süresinin aktiviteye etkisi Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da sunulmuştur. +4 °C'de depolanan PMMA-% 3N-Asn 2 gün boyunca aktivitesini yüksek oranda korumuştur. 15 gün süre zarfında enzim aktivitesini % 70 oranında korumayı başarmış ve 30 gün sonra bile aktivitesi yarılanmamıştır.

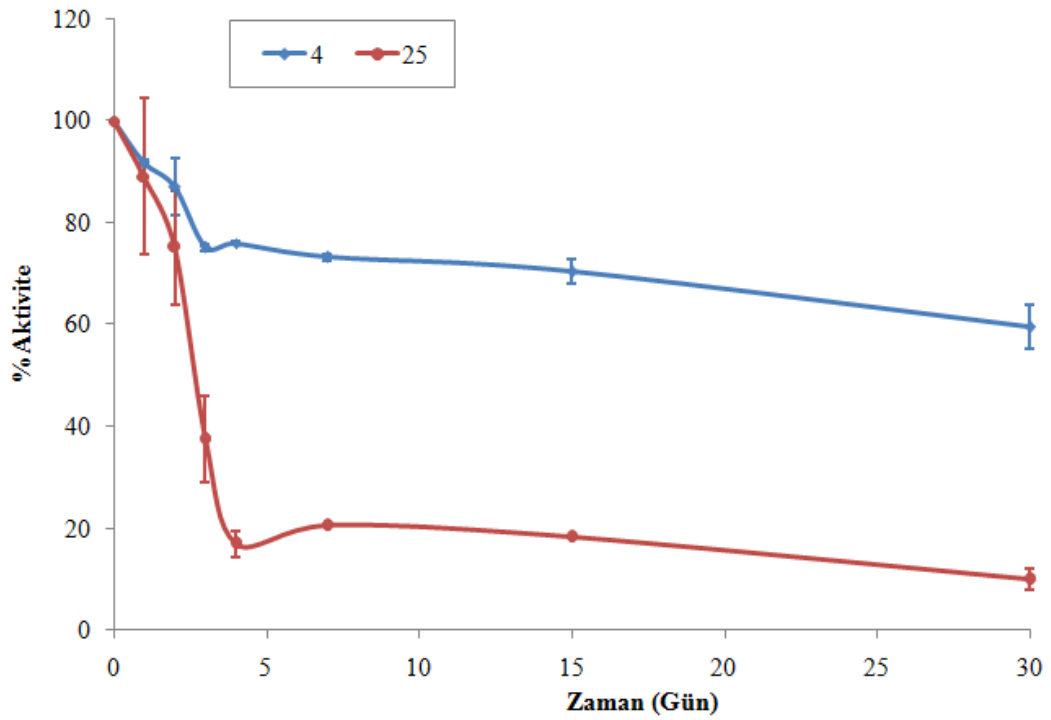
Tablo 4.8. +4 °C'de depolanan PMMA-% 3N-Asn'nin aktivite sonuçları

Süre (Gün)	Saklama Koşulu (°C)	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
0	+4	5	2,564	209.8±0.003	100
1	+4	5	2.365	193.2±3.75	92.1
2	+4	5	2.34	191±2.5	91.0
3	+4	5	1.949	158±9.125	75.3
4	+4	5	1.955	159±2.375	75.7
7	+4	5	1.898	154±22.70	73.4
15	+4	5	1.82	147±20.48	70.1
30	+4	5	1.545	124±19.50	59.1

+25 °C'de depolanan immobilize enzim 2-3 gün arasında aktivitesi yarılanmıştır. 15 gün sonunda aktivitesini % 18 , 30 gün sonunda ise % 9.92 oranında korumayı başarmıştır. Serbest enzim ile kıyaslandığında oda koşullarında kararlılığı daha fazladır.

Tablo 4.9. +25 °C'de depolanan PMMA-% 3N-Asn'nin aktivite sonuçları

Süre (Gün)	Saklama Koşulu (°C)	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
0	+25	5	2.181	177.8±0.0	100
1	+25	5	1.948	158.5±27.4	89.1
2	+25	5	1.649	133.5±20.1	75.1
3	+25	5	0.846	66.6±14.9	37.4
4	+25	5	0.408	30.08±4.6	16.9
7	+25	5	0.485	36.53±0.48	20.5
15	+25	5	0.435	32.41±0.05	18.2
30	+25	5	0.259	17.66±3.47	9.92

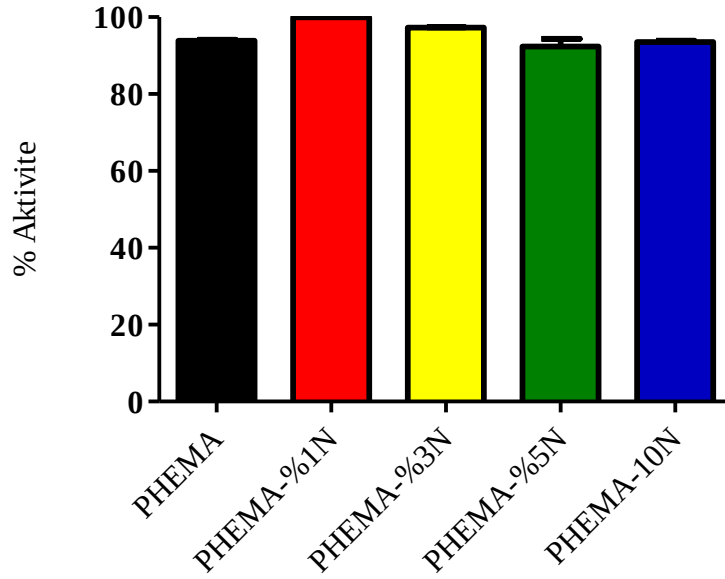


Şekil 4.39. PMMA-% 3N-Asn'nin depolama kararlılığı

4.8. Saf ve Nişastalı PHEMA Polimerine Enzim İmmobilizasyonu

Saf ve % 1, 3, 5, 10 nişastalı PHEMA örneğine immobilize olan enzime ait aktivite sonuçları Şekil 4.40 ve Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

İlgili şekil ve tablo incelendiğinde hem saf polimer hem de nişastalı kompozitlerine adsorpsiyon tekniği ile immobilize edilen enzim yüksek oranda aktivite göstermiştir. HEMA yapısı gereği nişasta gibi hidroksil grupları barındırdığında L-asparaginaz enzimi ile etkileşimi PMMA polimerine kıyasla daha fazladır. Bu yüzden saf PHEMA polimerik yapısına da enzim iyi bir şekilde adsorplanmıştır. Nişastalı kompozitli polimerler yine aynı şekilde nişastanın da etkisiyle immobilizasyon verimi yüksektir. İlgili tabloya bakıldığında bütün polimerlere tutuklanmış enzim % 90 civarında aktivite göstermiştir. En yüksek aktiviteyi % 1 oranında nişasta katkılanmış polimere immobilize edilen enzim göstermiştir. Çalışmalarımızı kendi aralarında standart bir şekilde karşılaştırmak için bir önceki polimerde olduğu gibi yine % 3 oranında nişasta katkılanmış polimer kullanarak çalışmalarımıza devam edilmiştir.



Şekil 4.40. Saf ve nişastalı PHEMA örneklerine immobilize edilen enzimin aktivite sonuçları

Tablo 4.10. Saf ve nişastalı PHEMA yapılarına immobilize edilen enzimin aktive sonuçları

Örnek	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
PHEMA	5	2.596	212±0.283	90.1
PHEMA-% 1N	5	2.873	235.5±0.035	100
PHEMA-% 3N	5	2.798	229.3±0.053	97.4
PHEMA-% 5N	5	2.659	217.6±1.93	92.4
PHEMA% 10N	5	2.691	220.3±0.3	93.6

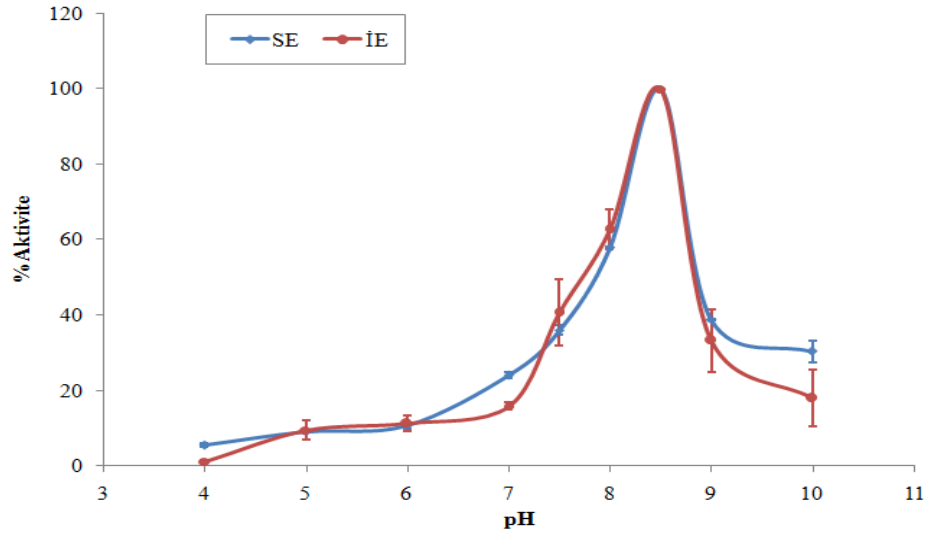
4.8.1. PHEMA-% 3N-Asn'nin optimum pH'ın belirlenmesi

Adsorpsiyon yöntemiyle % 3 nişastalı PHEMA örneğine immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine pH etkisini incelemek amacıyla örnek miktarı, substrat derişimi ve sıcaklık sabit tutularak 50 mM farklı pH'larda tampon çözeltilerde (pH:4, 5, 6 asetat tamponu ve pH:7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10 Tris-HCl tamponu) immobilize L-asparaginaz aktivite deneyi yapılmış, bulunan aktivite deneyleri % aktivite cinsinden pH'ya karşı tabloya geçirilmiştir (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. PHEMA-% 3N-Asn'nin değişen pH değerlerine karşı aktivite sonuçları

pH	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
4	5	0.024	1.46±0.0	1.1
5	5	0.201	12.9±0.2	9.4
6	5	0.231	15.4±1.64	11.3
7	5	0.307	21.6±4.65	15.9
7.5	5	0.711	55.4±3.77	40.6
8	5	1.074	85.6±16.8	62.8
8.5	5	1.684	136.3±37.8	100
9	5	0.590	45±1.4	33.2
10	5	0.341	24.5±3.12	18

% 3 nişastalı PHEMA örneğine immobilize edilen enzimin optimum pH değeri Tablo 4.11'den 8.5 olarak görölmektedir. Serbest enzim ve PMMA örneğine immobilize enzim içinde optimum pH değeri 8.5 olarak bulunmuştur. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH değerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Enzim taşıyıcıya fiziksel bir tutturma yöntemi olan adsorpsiyon tekniği kullanılarak immobilize edildiğinden enzimin optimum pH değerinde bir değişiklik olması beklenen bir durum değildir.



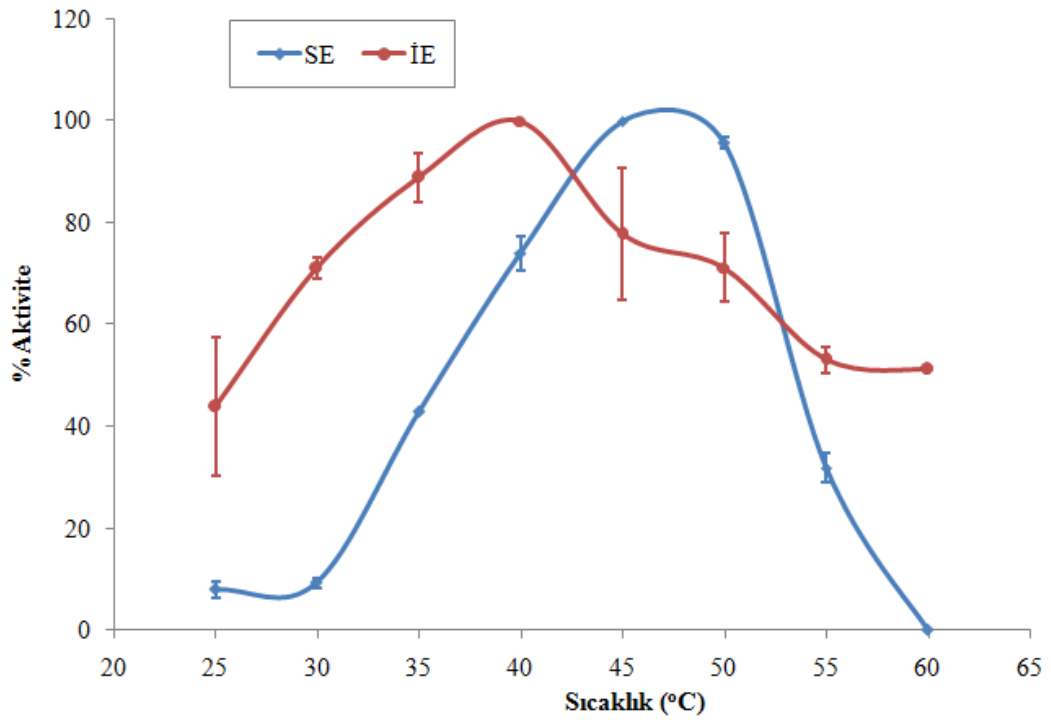
Şekil 4.41. Serbest enzim ve PHEMA-% 3N-Asn'nin aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi

4.8.2. PHEMA-% 3N-Asn'nin optimum ve maksimum sıcaklığının belirlenmesi

Adsorpsiyon yöntemiyle % 3 nişasta katkılı PHEMA örneğine immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla farklı sıcaklıklarda aktivite ölçümü deneyleri yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.12'de verilmiştir.

Tablo 4.12. PHEMA-% 3N-Asn'nin değişen sıcaklık değerlerine karşı aktivite sonuçları

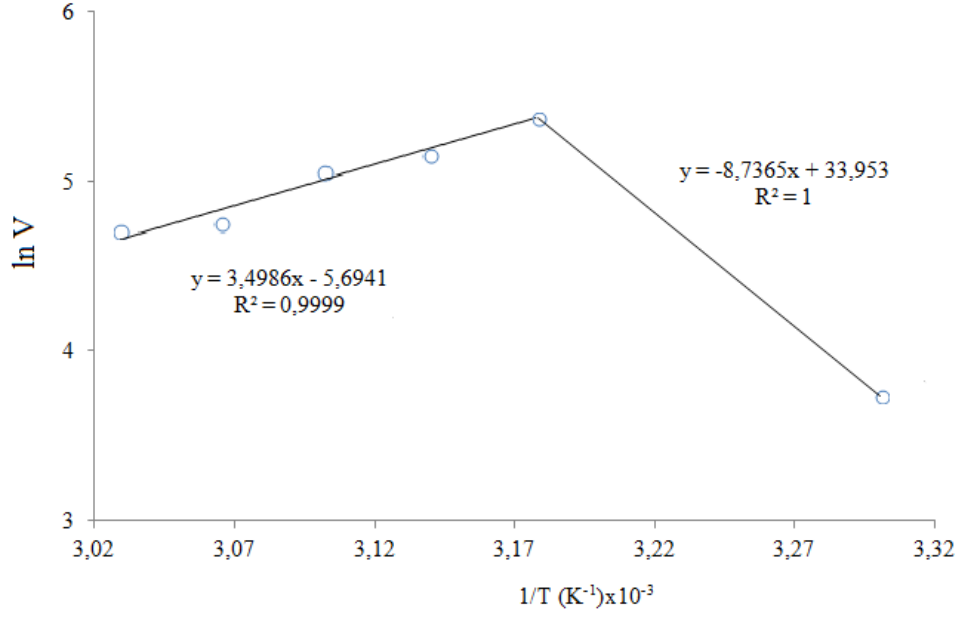
T (°C)	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
25 °C	5	1.30	104.6±32.4	43.7
30 °C	5	2.08	169.6±5.0	70.9
35 °C	5	2.6	212.4±11.4	88.9
40 °C	5	2.91	239±0.0	100
45 °C	5	2.28	185.7±31.2	77.7
50 °C	5	2.08	170±16.08	71.1
55 °C	5	1.56	126.7±6.18	53
60 °C	5	1.51	122.2±0.05	51.2



Şekil 4.42. Serbest enzim ve PHEMA-% 3N-Asn'nin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

İlgili şekil ve tablo incelendiğinde PHEMA-% 3N-Asn'nin optimum sıcaklık değeri 40 °C olarak görülmektedir. Serbest enzim ile kıyaslandığında optimum sıcaklık değişmemiştir. Bu enzim ile polimer arasında kimyasal bir etkilşimin olmadığını, enzim ile polimer arasında sadece ikincil etkileşimlerin olduğunu göstergesidir. İmmobilize enzim sıcaklığa karşı kararlılığı serbest enzime göre daha fazladır. Serbest enzimin 60 °C denatüre olduğu gözlenirken PHEMA-% 3N-Asn'nin aynı sıcaklıkta % 50 oranında yüksek bir aktivite göstermektedir. Bunun en temel nedeni taşıyıcı matriks olarak kullanılan polimerdir.

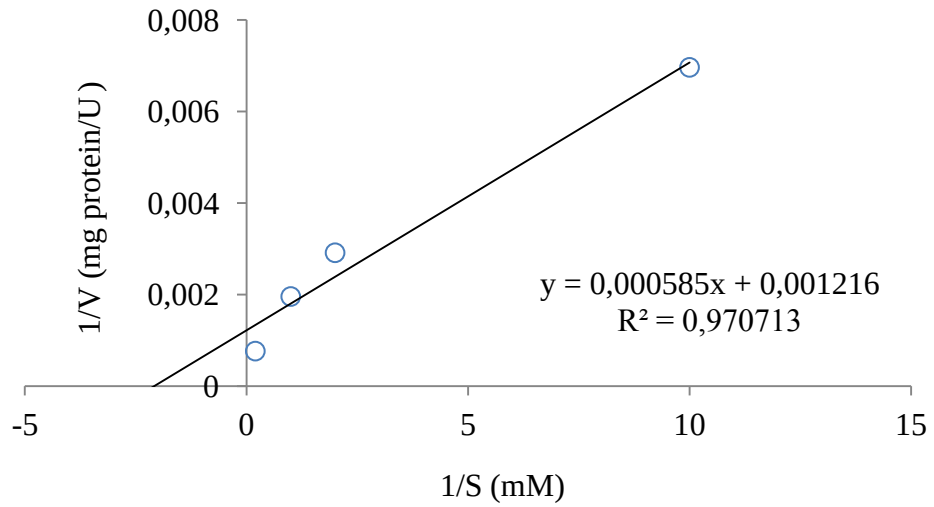
PHEMA-% 3N-Asn'nin aktivasyon enerjisini hesaplamak için çizilen Arrhenius grafiği Şekil 4.43'de gösterilmiştir. Grafiğin sıcaklıkla arttığı bölgenin eğimini kullanarak hesaplanan aktivasyon enerjisi $72.6 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Serbest enzim ile kıyaslandığında aktivasyon enerjisinde bir değişiklik yoktur.



Şekil 4.43. PHEMA-% 3N-Asn'nin Arrhenius grafiği

4.8.3. PHEMA-% 3N-Asn'nin kinetik parametrelerinin belirlenmesi

% 3 nişasta katkılı PHEMA örneğine immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimlerde hazırlanan substrat çözeltileriyle enzim aktivite tayini yapılmıştır. Bulunan değerler ile çizilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.44'de gösterilmiştir ve verilen grafik yardımı ile K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. K_m değeri 0.48 mM bulunurken, V_{max} değeri 822.3 U/mg protein olarak bulunmuştur.



Şekil 4.44. PHEMA-% 3N-Asn'nin Lineweaver-Burk grafiği

4.8.4. PHEMA-% 3N-Asn'nin depo kararlılığının belirlenmesi

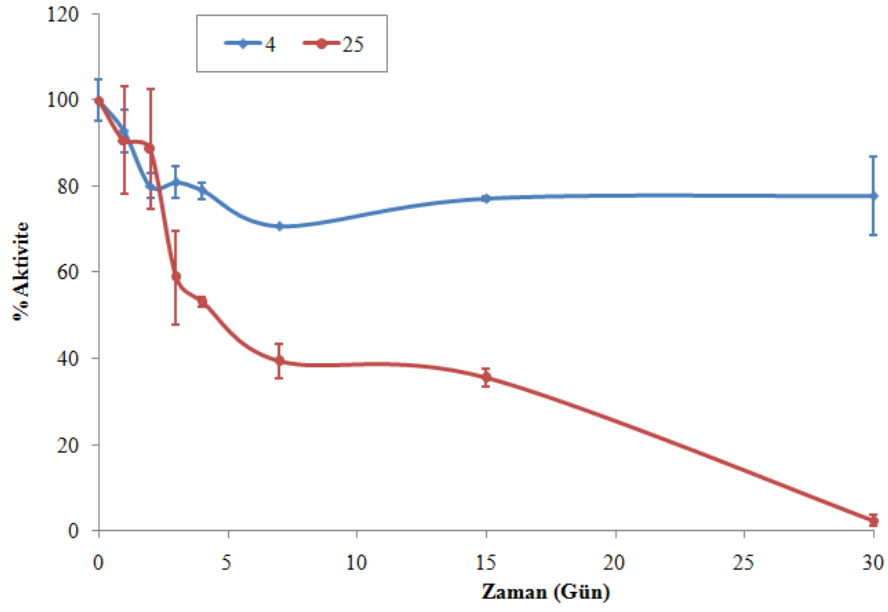
% 3 nişastalı PHEMA polimerine adsorpsiyon tekniği ile immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine depolanma süresinin etkisini incelemek amacıyla immobilize enzim +4 °C ve +25 °C sıcaklıklarında karanlık ortamda saklanmıştır. 1., 2., 3., 4., 7., 15., ve 30. günlerde immobilize enzimin aktivitesi ölçülerek depolanma süresinin aktiviteye etkisi Tablo 4.13. ve Tablo 4.14.'te sunulmuştur.

Tablo 4.13. +4 °C'de depolanan PHEMA-% 3N-Asn'nin aktivite sonuçları

Süre (Gün)	Saklama Koşulu (°C)	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
0	+4	5	2,695	220.7±0.0	100
1	+4	5	2.500	204.45±15.3	92.7
2	+4	5	2.160	176.1±0.17	80.1
3	+4	5	2.181	177.9±4.53	80.9
4	+4	5	2.128	173.5±2.07	78.9
7	+4	5	1.904	154.8±0.61	70.7
15	+4	5	2.08	169.5±0.59	77.1
30	+4	5	2.094	170.6±0.0	77.6

Tablo 4.14. +25 °C'de depolanan PHEMA-% 3N-Asn'nin aktivite sonuçları

Süre (Gün)	Saklama Koşulu (°C)	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
0	+25	5	1.15	92.6±7.07	100
1	+25	5	1.05	83.9±5.12	90.6
2	+25	5	1.03	82±6.65	88.6
3	+25	5	0.7	54.4±5.89	58.7
4	+25	5	0.63	49.1±2.74	53
7	+25	5	0.48	36.4±0.97	39.3
15	+25	5	0.44	32.8±0.58	35.4
30	+25	5	0.03	2.23±1.2	2.04



Şekil 4.45. PHEMA-% 3N-Asn'nin depolama kararlılığı

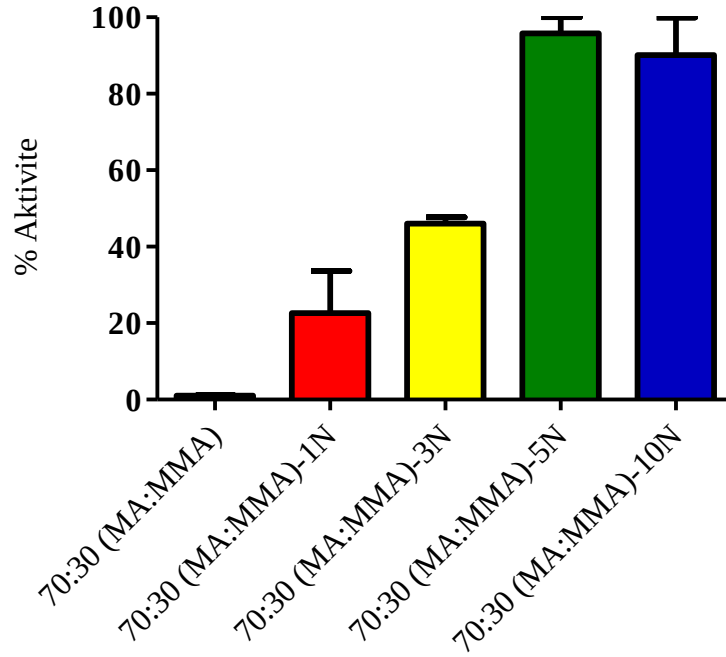
PHEMA-% 3N-Asn'nin depolama koşullarına ait tablolar ve şekil incelendiğinde +4 °C'de depolanan immobilize enzim başlangıç aktivitesini büyük oranda korumuştur. İlk günden itibaren geçen 15 ve 30 gün süre zarfında bile aktivitesinin % 70 gibi yüksek bir oranda muhafaza eden immobilize enzim oda koşullarında 4-7 gün arasında aktivitesini yarılamış ve 15 günün sonunda % 35 oranında aktivite göstermiştir.

4.9. Saf ve Nişasta Katkılı 70:30 (MA:MMA) Polimerine Enzim İmmobilizasyonu

70:30 (MA:MMA) polimerine immobilize edilen enzim aktivite sonuçları Tablo 4.15 ve Şekil 4.46 ile gösterilmiştir.

Tablo 4.15. 70:30 (MA:MMA)-Asn'nin aktivite sonuçları

Örnek	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
P(MA:MMA)	0.034	2.17±0.0	1.0
P(MA:MMA) -% 1 N	0.873	68.8±12.7	35
P(MA:MMA) -% 3 N	1.182	94.6±8.1	18.1
P(MA:MMA) -% 5N	2.404	196.4±5.4	100
P(MA:MMA) -% 10N	2.273	185.5±35	94.4



Şekil 4.46. Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) polimerine immobilize edilen enzimin aktivite sonuçları

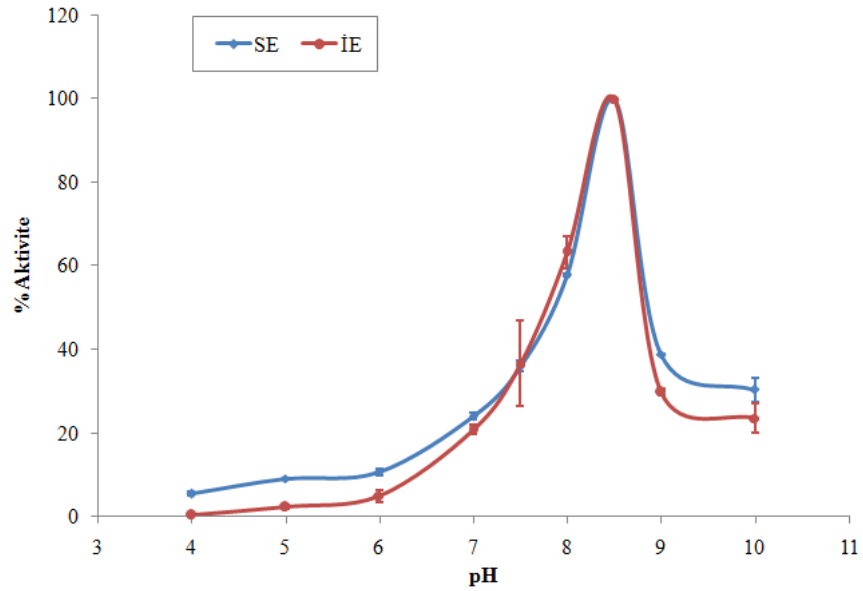
Saf ve nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) polimerine immobilize edilen enzimin aktivite sonuçlarına bakıldığında nişasta oranı arttıkça aktivitede de bir artış vardır. Nişastalı seriden en yüksek aktiviteyi gösteren % 5 oranında katkılanmış örneğe immobilize edilen enzimdir. Bundan dolayı optimum koşulların ve kinetik parametrelerin belirlenmesinde bu örnek kullanılmıştır.

4.9.1. 70:30 P(MA:MMA) -% 5N-Asn'nin optimum pH'ın belirlenmesi

Adsorpsiyon yöntemiyle % 5 nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) örneğine immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine pH etkisini incelemek amacıyla örnek miktarı, substrat derişimi ve sıcaklık sabit tutularak 50 mM farklı pH'larda tampon çözeltilerde (pH:4, 5, 6 asetat tamponu ve pH:7, 7.5, 8, 8.5, 9, 10 Tris-HCl tamponu) immobilize L-asparaginaz aktivite deneyi yapılmış, bulunan aktivite deneyleri % aktivite cinsinden pH'ya karşı tabloya geçirilmiştir (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin değişen pH değerlerine karşı aktivite sonuçları

pH	rnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
4	5	0.053	0.53±0.3	0.27
5	5	0.098	4.28±0.17	2.17
6	5	0.162	9.61±0.47	4.9
7	5	0.536	40.74±0.11	20.73
7.5	5	0.909	71.86±0.36	36.5
8	5	1.537	124.2±3.18	63.2
8.5	5	2.405	196.5±0.0	100
9	5	0.75	58.5±0.74	29.8
10	5	0.60	46.1±0.06	23.4



Şekil 4.47. Serbest enzim ve 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin aktivitesinin pH'ya bağlı olarak değişimi

70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'ye ait pH tablo ve şekil incelendiğinde immobilize enzimin optimum pH'sının 8.5 olduğu ve serbest enzim ile karşılaştırıldığında optimum pH'sında bir değişiklik olmadığı görülmektedir.

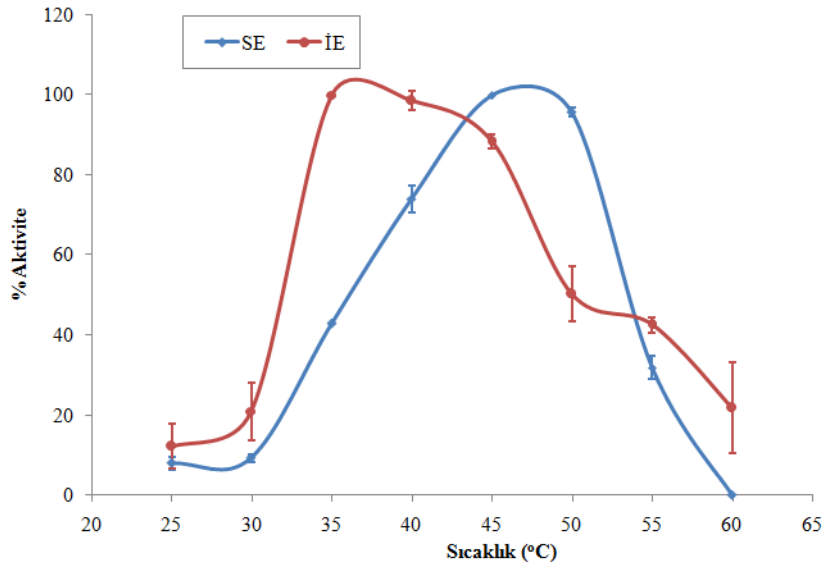
4.9.2. 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin optimum ve maksimum sıcaklığının belirlenmesi

Adsorpsiyon yöntemiyle % 5 nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) örneğine immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla farklı sıcaklıklarda aktivite ölçümü deneyleri yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.17'de ile Şekil 4.48'de verilmiştir.

Tablo 4.17. 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin değişen sıcaklık değerlerine karşı aktivite sonuçları

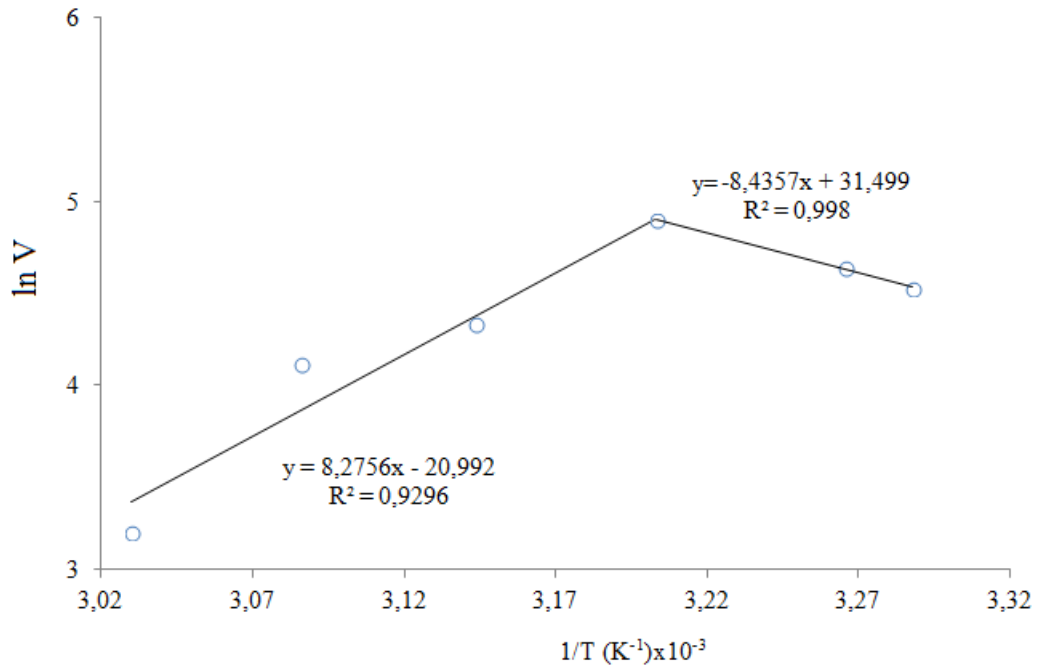
T (°C)	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
25 °C	5	0.333	23.86±8.25	12.1
30 °C	5	0.541	41.2±9.33	20.9
35 °C	5	2.404	196.5±3.87	100
40 °C	5	2.055	167.4±26.21	85.1
45 °C	5	1.779	144.4±28.46	73.4
50 °C	5	1.23	98.6±8.0	50.1
55 °C	5	1.047	83.5±1.37	42.4
60 °C	5	0.558	42.6±13.83	21.6

İmmobilize enzime ait tablo ve şekile bakıldığında bu 70:30 P(MA:MMA)-% 5N örneklerine immobilize edilen enzim için optimum sıcaklık 35 °C olarak belirlenmiştir. 60 °C'de bile immobilize enzim % 21 oranında aktivite göstermiştir. Serbest enzim bu sıcaklıkta denetüre olduğu halde immobilize enzim aktivitesini sürdürmektedir. İmmobilizasyon tekniğinin termal kararlılık üzerine etkisi açıkça görülmektedir.



Şekil 4.48. Serbest enzim ve 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin aktivitesinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

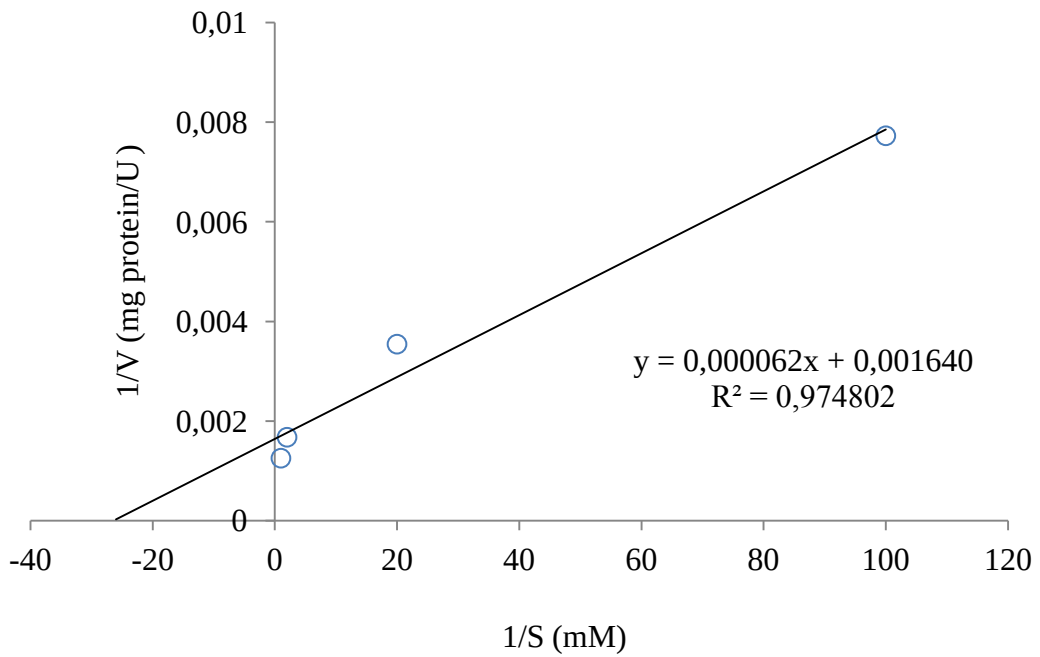
70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin aktivasyon enerjisini hesaplamak için çizilen Arrhenius grafiği Şekil 4.49'de gösterilmiştir. Grafiğin sıcaklıkla artışı bölgenin eğimini kullanarak hesaplanan aktivasyon enerjisi $70.1 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Serbest enzim ile kıyaslandığında aktivasyon enerjisinde bir değişiklik yoktur.



Şekil 4.49. 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin Arrhenius grafiği

4.9.3. 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin kinetik parametelerinin belirlenmesi

70:30 P(MA:MMA)-% 5N örneğine immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine substrat derişiminin etkisini incelemek amacıyla çeşitli derişimlerde hazırlanan substrat çözeltileriyle enzim aktivite tayini yapıldı.. Bulunan değerler ile çizilen Lineweaver-Burk grafiğı Şekil 4.50'de gösterilmiştir ve verilen grafik yardımı ile K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn için K_m değeri 0.0378 mM, V_{max} değeri ise 609,75 U/mg protein olarak hesaplandı.



Şekil 4.50. 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin Lineweaver-Burk grafiğı

4.9.4. 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin depo kararlılığının belirlenmesi

% 5 nişasta katkılı 70:30 P(MA:MMA) polimerine adsorpsiyon tekniğı ile immobilize edilen L-asparaginazın aktivitesine depolanma süresinin etkisini incelemek amacıyla immobilize enzim +4 °C ve +25 °C sıcaklıklarında karanlık ortamda saklandı. 1., 2., 3., 4., 7., 15., ve 30. günlerde immobilize enzimin aktivitesi ölçülerek depolanma süresinin aktiviteye etkisi Tablo 4.18. ve Tablo 4.19.'da sunulmuştur.

Tablo 4.18. +4 °C'de depolanan 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin aktivite sonuçları

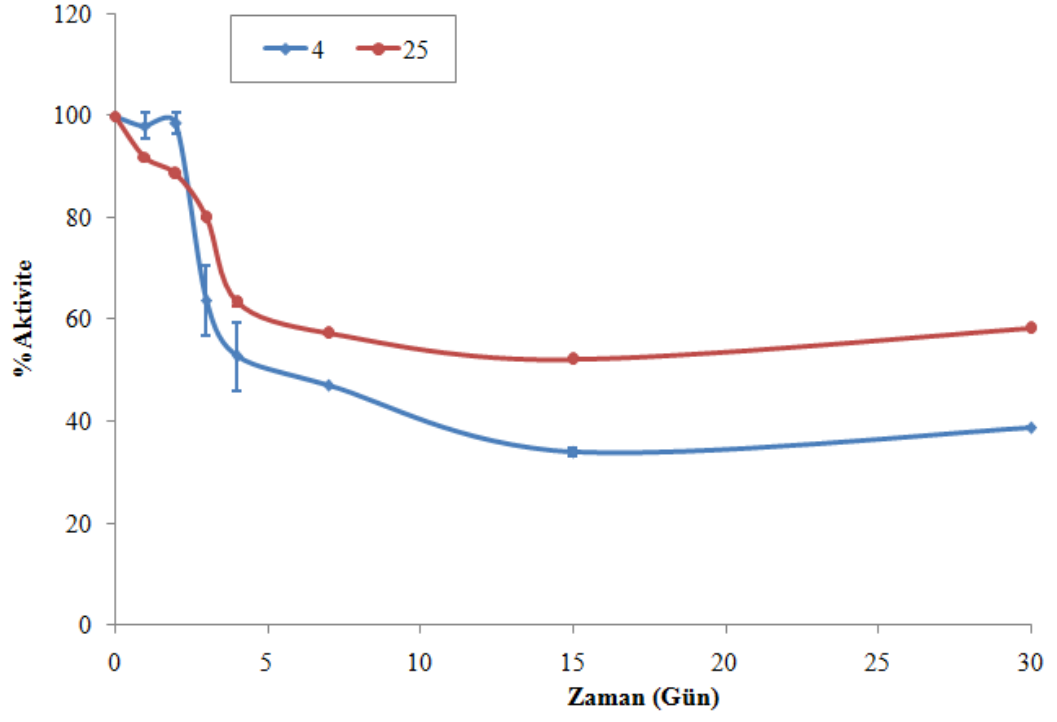
Süre (Gün)	Saklama Koşulu (°C)	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
0	+4	5	2.453	200±0.23	100
1	+4	5	2.405	196±5.48	97.9
2	+4	5	2.419	197±4.30	98.5
3	+4	5	1.578	127±13.7	63.6
4	+4	5	1.315	105±13.5	52.7
7	+4	5	1.18	94.5±0.11	47.1
15	+4	5	0.864	68.1±1.6	33.9
30	+4	5	0.976	77.5±0.3	38.6

Tablo 4.19. +25 °C'de depolanan 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin aktivite sonuçları

Süre (Gün)	Saklama Koşulu (°C)	Örnek Miktarı (mg)	A ₄₈₀	Aktivite (U/dk)	% Aktivite
0	+25	5	2.407	196.7±0.23	100
1	+25	5	2.216	180.8±0.29	91.9
2	+25	5	2.136	174.1±0.17	88.5
3	+25	5	1.934	157.3±0.41	79.9
4	+25	5	1.541	124.5±1.29	63.3
7	+25	5	1.397	112.5±0.29	57.2
15	+25	5	1.276	102.4±0.29	52.1
30	+25	5	1.422	114.6±0.11	58.2

70:30 P(MA:MMA)-% 5N örneklerine immobilize edilen enzimin depo kararlılıkları incelendiğinde +4 °C'de depolanan immobilize enzimin yarılanma ömrünün 4-7 gün arasında olduğu ve 1 ay sonunda % 38 oranında aktivite

gösterebildiği gözlemlendi. +25 °C'de depolanan enzimin ise 30 günün sonunda % 58.2 oranında aktivite gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.51. 70:30 P(MA:MMA)-% 5N-Asn'nin depo kararlılığı

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

L-asparaginaz enzimi kemoterapötik bir ajan olması nedeniyle oldukça yüksek ticari öneme sahip bir enzimdir. Başta çocuk lösemisi (akut lenfoblastik lösemi, ALL) olmak üzere birçok kanser türünde birincil kemoterötik ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu kullanımındaki en önemli neden, kanserli hücrelerin büyümek için ihtiyaç duyduğu kandaki L-asparagini ortadan kaldırmasıdır. Bir çok kana verilen ilaçta olduğu gibi L-asparaginaz içinde bir immün yanıt gelişmekte ve kana verilmiş olan L-asparaginazın yarı ömrü kısaltılmaktadır. Bu nedenle L-asparaginazın vücudun immün yanıtından korunabilmesi için farklı koruyucu ajanlarla kana verilmesi konusundaki çalışmalar sürmektedir. Ticari kullanım formunda bu koruyucu yapı yüksek biyoyumumluluğu nedeniyle birçok ilaçta olduğu gibi PEG'dir. Bununla beraber enzimi kanserde daha etkin bir kullanıma sahip kılmak ve bunun sonucunda da maliyeti düşürmek için alternatif taşıyıcı yapılara ihtiyaç vardır. Bu amaçla çalışmamız, sentezini ve karakterizasyonunu tez kapsamında yaptığımız polimetilmetakrilat (PMMA), polihidroksietilmetakrilat (PHEMA), polimetakrilik asit-co-polimetilmetakrilat (P(MA:MMA)) polimerleri ve bu polimerlere farklı oranlarda katkılanmış nişasta içeren serilere L-asparaginazın immobilizasyonu ve kullanım parametrelerinin araştırılmasını içermektedir. Bu kapsamda PMMA, PHEMA, P(MA:MMA) polimerleri ve bunların sırasıyla % 1, 3, 5, 10 nişasta içeren yapıları sentezlenip FTIR, TGA, DTA, DSC, sıvı temas açısı ve biyobozunurluk testi ile karakterize edildi. Nişasta içeren karakterize edilmiş bu polimer yapılarına L-asparaginazın immobilizasyon etkinliği araştırılmış en yüksek sonuçlar PMMA ve PHEMA için % 3, P(MA:MMA) için ise % 5 nişasta içeren yapılar bulundu. En etkin immobilizasyon oranları elde ettiğimiz polimer/nişasta/enzim yapıları için depolama, pH ve termal kararlılık gibi ileri karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Ayrıca immobilize enzimin kinetik parametreleri (K_m , V_{max}) ve aktivasyon enerjisi belirlendi.

İmmobilizasyonda kullanılacak nişasta katkılı sistemler sentezlenmiş ve sentezlerin gerçekleştiği FT-IR ile karakterize edildi. Polimerlerden PMMA ve nişasta katkılı sistemlere ait spektrum incelendiğinde saf PMMA yapısından kaynaklı alifatik CH_2 grupları $2899-2950\text{ cm}^{-1}$ aralığında geniş bir pik olarak görülmektedir (Şekil 4.1). Ester grubuna bağlı $C=O$ titreşimi 1890 cm^{-1} 'de görülmektedir. Yine ester bağ titreşimleri 1274 cm^{-1} 'de polimerin karakterizasyonunu

doğrulamaktadır. Farklı oranlarda nişasta katkılı polimerlere ait FT-IR spektrumları ise Şekil 4.1 b, c, d ve e'de verilmiştir. Nişasta yapısındaki serbest hidroksil gruplarına ait titreşimler $3200-3600\text{ cm}^{-1}$ 'de birer pik vermektedir. Nişasta miktarı arttıkça pik şiddeti artmakta buda nişastanın düzenli olarak yapıya girdiğini ispatlamaktadır. Polimerlerin termal özelliklerine ait grafiklere baktığımızda ise bozunma, nişasta oranı artışına bağlı olarak geniş bir sıcaklık aralığında gözlenmektedir. Ayrıca Tg değerlerinde bir artış olduğu gözlenmekte olup bu artışın sebebi artan nişasta miktarına bağlı olarak zincirler arasındaki etkileşimlerin artmasıyla yapının daha sert ve sıkı bir hal almasıdır.

İmmobilizasyonda kullanılan ikinci polimer olan PHEMA ve nişasta içeren PHEMA kompozitlerine ait FT-IR spektrumları incelendiğinde, PHEMA yapısının sentezlendiği ve ayrıca nişasta oranı arttıkça nişastanın yapısında bulunan OH gerilme titreşimlerinden kaynaklı olarak $3000-3680\text{ cm}^{-1}$ aralığında geniş bir band vermektedir (Şekil 4.9). Yine termal karakterizasyon sonuçları incelendiğinde nişastanın yapıya girmesiyle malzemenin bozunma sıcaklığı daha da düşük değerlere kaymaktadır. % 10 nişasta taşıyan örneklerde $50-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında % 10'luk bir net kütle kaybı nişastanın yapıya girdiğini bize göstermektedir. TGA ile orantılı olarak $230-450\text{ }^{\circ}\text{C}$ arasında net bir bozunma piki tespit edilmiştir. Tg değerleri % 1, 3, 5, 10 nişasta içeren yapılar için sırasıyla 119, 125, 149 ve $165\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir.

İmmobilizasyonda kullanılmak için üçüncü polimer olarak serbest -OH uçları nedeniyle PMA kullanılmak istenmiş bununla beraber sentezlenen PMA yapısının suda çözündüğü tespit edilmiştir. Bu nedenle PMMA ve PMA'nın farklı oranlarındaki polimerleri sentezlenerek çözünürlük problemi ortadan kaldırılmıştır. PMA-PMMA kopolimerleri P(MA-MMA) hazırlanmış ve FT-IR spektrumlarında saf PMMA için keskin ve belirgin olan alifatik CH_2 gerilme titreşimleri 2960 cm^{-1} 'de bariz görülürken, metakrilik asit miktarı arttıkça bu pikin kaybolduğu spektrumdan tespit edilmiştir. 1700 cm^{-1} 'de gözüken karbonil pikinin metakrilik asit miktarının artmasıyla şiddetinde düşme ve keskinliğinin azaldığı FT-IR spektrumunda görülmektedir. $1000-1400\text{ cm}^{-1}$ aralığında gelen eterik bağ pikinin de pik şiddetindeki azalma benzer şekilde görülmektedir. Kopolimerlerde iki farklı bozunma piki görülürken, PMMA miktarı arttıkça 1. bozunma pikinin şiddeti de düzenli olarak artmaktadır. PMA için $218\text{ }^{\circ}\text{C}$ görülen Tg geçişi PMMA için $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak görülmüştür. Farklı oranlarda metilmetakrilat monomeri ilave edilerek elde edilen kopolimer serisinin çözünürlük testinde, 70:30 P(MA:MMA) oranına sahip

kopolimerden itibaren suda çözünmediği ve ayrıca bu seriye yapılan enzim immobilizasyonu işlemi sonucunda ise en yüksek aktiviteyi 70:30 P(MA:MMA) kopolimerinin gösterdiği belirlendi. Buda yapıdaki -OH oranının fazlalığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca bu kopolimerlere yine diğer polimer örneklerinde olduğu gibi nişasta katkılı ve hem FT-IR hem de termal olarak karakterize edilmiştir.

Ayrıca sentezlenen tüm polimerlerde nişasta oranına bağlı olarak sıvı temas açısı düşüp biyobozunurluk artmıştır. Bunun nedeni yapıya giren nişastanın su ile etkileşimi arttırması ve yapının daha fazla hidrofilik karakter kazanması ile açıklanabilir.

Çalışmanın ikinci aşamasında sentezlediğimiz ve karakterizasyonlarını yaptığımız polimerlere L-asparaginaz başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. Hem serbest enzim hem de immobilize enzim örnekleri enzim aktivitesi, optimum pH ve sıcaklık, depolama süresi, yarı ömrü ve kinetik parametreler açısından incelendi. Kullandığımız L-asparaginazın optimum pH değerini 8.5 olarak belirlendi. Sırasıyla PMMA-3N, PHEMA-3N ve 70:30 P(MA:MMA)-5N polimerlerine immobilize edilen enzimlerin de serbest enzim gibi optimum pH'sını 8.5 olduğu belirlendi. Literatüre bakıldığında enzim ile taşıyıcı arasında herhangi bir bağlanma olmayan sadece moleküller arası ikincil etkileşimlerin olduğu immobilizasyon tekniklerinde serbest enzim ile immobilize enzimin optimum pH değeri genellikle değişmemektedir. Yu-Qing Zhang ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada ipek mikropartiküllerine L-asparaginaz enzimini immobilize etmişler ve serbest L-asparaginaz ile karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda serbest enzimin pH aralığını 6.5-8.0, immobilize enzimin ise 6.0-8.0 olarak kaydetmişlerdir (Yu-Qing Zhang ve ark., 2004). Yine benzer şekilde Vina ve çalışma ekibi 200 yılında polisakkarit tabakalarına L-asparaginazı immobilize etmişler ve optimum pH değerinin hem serbest hem de immobilize enzim için 8.0 olarak rapor etmişlerdir (Vina ve ark., 2001). Bizim sonuçlarımız bu literatür sonuçları ile paralellik içermektedir.

Çalışmalarımız doğrultusunda bir sonraki aşama serbest ve immobilize enzimin değişen sıcaklığa karşı kararlılığını belirlemek olmuştur. Yaptığımız çalışmalarda 25-60 °C sıcaklık aralığında serbest ve immobilize enzimin artan sıcaklığa bağlı olarak aktivitesi belirlendi. Serbest enzimimizin optimum sıcaklık değerinin 45 °C, maksimum sıcaklık değerini ise 55 °C olduğunu ve bu sıcaklıktan sonra enzimimizin denatüre olduğunu yaptığımız deneyler ile tespit edildi. Taşıyıcı olarak kullandığımız

polimerlere immobilize edilen enzim ise her bir polimer için farklılık göstermektedir. Bu farklılığın temel nedeni kullandığımız polimerlerin termal kararlılıklarının değişken olmasıdır. Sırasıyla PMMA-3N polimerine immobilize edilen enzimin optimum sıcaklığı 45 °C, PHEMA-3N için 40 °C ve 70:30 P(MA:MMA)-5N polimeri içinse 35 °C olarak kaydedildi. Serbest enzim 55 °C'den sonra aktivitesinin yitirirken immobilizasyon sayesinde L-asparaginase 60 °C'de bile aktivite göstermiştir. Bulduğumuz sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında Yu-Qing Zhang ve ekibi 2006 yılında yaptıkları araştırmada ipek biyokonjugatlarına immobilize edilen L-asparaginaz enzimini karakterize etmişlerdir. Sıcaklık ile yaptıkları çalışmada serbest enzim için optimum sıcaklığı 50 °C olarak rapor etmişlerdir. Immobilize enzimin ise optimum sıcaklığını 50 °C kaydederken 80 °C'ye çıkıldığında dahi immobilize enzimin % 70 gibi yüksek oranda aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir (Yu-Qing Zhang, 2006). Ahmad ve çalışma ekibi ise *Bacillus licheniformis* STRAIN HSA3-1a termofilik bakterisinden saflaştırılan L-asparaginaz enzimini glutaraldehit-karbon taşıyıcısına immobilize ederek optimum koşullarını belirlemişlerdir. Sonuçlara göre; bakteriden saflaştırılan serbest enzimin optimum sıcaklığı 50 °C iken, immobilize enzimin optimum sıcaklığı ise 60 °C olarak saptamışlardır. (Ahmad, Patta ve Natsır, 2013). Bu açıdan bizim serbest enzim için bulduğumuz optimum sıcaklık değeri ve immobilize enzimin sıcaklığa karşı kararlılığı literatür ile tamamen benzerlik göstermektedir.

Serbest enzim ve immobilize enzime dair depolama kararlılıklarını gerçekleştirmek amacıyla serbest enzimi ve her bir polimere immobilize edilen enzimlerin başlangıç aktivitelerini belirledikten sonra ayrı ayrı +4 °C ve +25 °C'de karanlık ortamlarda depolandı. Depolandığı günden itibaren 1., 2., 3., 4., 7., 15., ve 30. günlerde her bir enzimin aktivitesi tayin edildi. Serbest enzim +4 °C'de ilk bir haftada başlangıç aktivitesinin % 85.9 oranında, 2 hafta içerisinde ise % 79.6 oranında korumuştur. +25 °C'de saklanan serbest enzim ise 2 gün boyunca yüksek aktivite gösterebilmiştir. 3. gün alınan ölçümlerde enzimin % 38.7 oranında aktivite gösterdiği, 2 haftanın sonunda sadece % 5 oranında aktivitesi gösterdiği kaydedilmiştir. L-asparaginazın depolama kararlılığı ile ilgili literatüre bakıldığında enzimin saflaştırıldığı kaynak burda önemli bir faktör haline gelmektedir. Örneğin, *Proteus vulgaris* kökenli enzimin 3.5 M amonyum sülfat solüsyonunda 5 °C'de 1 yıl boyunca karalı olduğu, *Lupinus polyphyllus* kökenli enzimin 4 °C'de 4 gün boyunca kararlı olduğu, *E.coli*'den saflaştırılan enzimin ise 4 °C'de 3 hafta boyunca

aktivitesini koruduğu, 5 hafta sonunda ise % 80 oranında aktivite kaybettiği bilgileri mevcuttur. L-asparaginazın yarı ömrünün ise 4 °C'de depolandığında 2 hafta olarak rapor etmişlerdir. Stecher ve ekibi ise yaptıkları çalışmada serbest L-asparaginazın 8 °C'de depolandığında 7 gün boyunca kararlı olduğunu rapor etmişlerdir (Stecher, 1999). Bu açıdan çalışmalarımız esnasında kullandığımız L-asparaginaz enzimine ait veriler literatür araştırmaları ile benzerlik göstermektedir. İmmobilize ettiğimiz enzimin depo kararlılığı için sonuçlar şöyledir; PHEMA-% 3N polimerine immobilize edilen enzim +4 °C'de depolandığında 1 ay sonunda % 77.6 oranında aktivitesini korurken, +25 °C'de depolandığında ise 2 hafta içersinde % 35.4 oranında aktivitesini korumaktadır. PMMA-% 3N polimerine immobilize edilen enzim +4 °C'de 1 ay sonunda % 59.1, +25 °C'de ise 2 hafta süresince depolandığında % 18 değerinde kararlılığını sürdürmektedir. P(MA:MMA)- % 5N polimerine immobilize edilen enzim için +4 °C'de 30 gün sonraki kararlılığı % 38.6 iken, +25 °C'de 15 gün sonraki kararlılığı % 52'dir. Özellikle tüm immobile enzim örnekleri serbest enzime göre +25 °C'de 5-7 kat daha kararlı hale gelmiştir. Ayrıca serbest enzimin yarı ömrü +25 °C'de 2-3 gün iken immobilize sistemlerimizde 30 güne kadar uzatılmıştır.

L-asparaginazın kararlılığını ve yarı ömrünü arttırmak için çeşitli immobilizasyon tekniklerinin uygulanması araştırmacılar tarafından çalışılan bir konudur. Yu-Qing Zhang ve çalışma arkadaşları 2005 yılında biyoyumlu materyallere immobilize edilen L-asparaginazın serbest enzime göre termal kararlılığının arttığını, proteinleri parçalayan enzimlere karşı daha dayanıklı hale geldiğini ve yarı ömrünün 33 saatten 63 saate çıktığını rapor etmişlerdir (Yu-Qing Zhang, 2005). Vina ve çalışma ekibi 2001 yılında polisakkarit tabakalarına immobilize edilen enzimin 1 ay boyunca kararlı olduğunu söylemişlerdir (Vina, 2001). L-asparaginazın *in vivo* çalışmalarında yapılmıştır. Poznansky RI tümörlü hücrelere sırasıyla serbest ve albümin proteinine immobilize edilmiş L-asparaginaz vermiştir. L-asparaginaz enjekte edildikten sonra 15, 24 ve 48 saat sonra enzimin % kalan aktivitesini tayin etmiştir. Sonuçlar serbest enzim için korunan aktivite sırasıyla % 9, 4 ve 3 olarak bulurken immobilize enzim için % 41, 17 ve 11 olarak rapor etmiştir (Poznansky, 1982).

Serbest ait Km ve Vmax değeri Lineweaver-Burk grafiğinden hesaplanmış olup Km değeri 0.216 mM, Vmax değeri ise 301.4 U/mg protein olarak kaydedildi. Sinha ve ekibi L-asparaginazın Km değerinin ve spesifik aktivitesinin saflaştırıldığı bakterilerin farklı olması sebebiyle Km değerinde farklılandığını rapor etmiştir.

Km için en küçük 0.00016 (*Pectobacterium carotovorum*) en yüksek ise 6.6 (*Lupinus arboreus*) mM olarak belirtmişlerdir (Sinha, 2013). Bizim enzime ait bulduğumuz Km değeri literatürde verilen bu aralığa girmektedir. Kullandığımız PMMA-3N, PHEMA-3N ve 70:30 P(MA:MMA)-5N polimerlerine immobilize edilen enzim için Km değerleri sırasıyla 0.0256, 0.48 ve 0.0378 mM Vmax değerleri ise sırasıyla 253.81, 822.3 ve 609.75 U/mg protein olarak kaydedilmiştir. Km değerlerimiz PMMA-3N ve 70:30 P(MA:MMA)-5N polimere immobilize ettiğimiz sistemde azalmış, PHEMA-3N polimeri için ise artmış olduğu tespit edilmiştir. Vmax değerleri ise PMMA-3N polimerine immobilize edilen enzim için azalmış, PHEMA-3N ve 70:30 P(MA:MMA)-5N polimere immobilize ettiğimiz sistemde artmıştır. Kinetik parametreler ile alakalı literatürdeki çalışmalar bakıldığında Ghosh ve arkadaşlarının 2012 yılında polianilin nanofiberlerine L-asparaginaz enzimi immobilize etmişlerdir. Sonuçlara bakıldığında serbest enzim için Km değeri 3.705 mM L⁻¹, Vmax değerini 48.04 µM min⁻¹ mg⁻¹, immobilize enzim için ise 1.809 mM L⁻¹, Vmax değerini ise 90.57 µM min⁻¹ mg⁻¹ olarak bulunmuş ve immobilizasyon sonrasında Km değerinin 2.05 kat azaldığını Vmax değerinin ise yaklaşık 2 kat arttığını rapor etmişlerdir (Ghosh, 2012). Vina ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada polisakkarit tabakalarına L-asparaginaz immobilize etmişler ve immobilize enzimin serbest enzimim Km değerinden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Vina, 2001). Yu-Qing Zhang ve ekibi 2006 yılında yaptıkları çalışmada ise immobilizasyon işleminden sonra L-asparaginazın Km değerinin 65 kat azaldığını tespit etmişlerdir. (Yu-Qing Zhang, 2006). Literatür çalışmalarından kinetik parametrelerin bazı çalışmalarda arttığı, bazılarında ise azaldığı açıkça görülmektedir. Bu değişkenliğin sebebi olarak taşıyıcı olarak kullanılan matriks sistemi, kullanılan enzimin saflaştırıldığı kaynak, optimum koşullar ve çevresel faktörlerin etkili olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak L-asparaginaz enzimi üç farklı polimere başarılı bir şekilde immobilize edilerek karakterize edilmiştir. Çalışma ile biyoyumluluğu bilinen polimerlerden yine biyoyumlu bir doğal polimer olan nişasta katkılanarak enzim immobilizasyonu için uygun sistemler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu sistemlerde serbest enzime göre bir çok özelliği iyileştirilmiş immobilize L-asparaginazlar oluşturulmuştur. Bu nedenle L-asparaginazın ticari ve hayati önemi düşünüldüğünde çalışma oldukça değerlidir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmad, A., Patta, A.M., Natsır, H. (2013). Purification and immobilization of l-asparaginase enzyme from the thermophilic bacteria *Bacillus licheniformis* strain HSA3-1a. *Int J Pharm Bio Sci.* 4(4): (B) 274 - 280.
- Ahmad, N., Pandit, N.P., Maheshwari, S.K. (2012). L-asparaginase gene - a therapeutic approach towards drugs for cancer cell . *International Journal of Biosciences (IJB)*. ISSN: 2220-6655 (Print) 2222-5234 (Online) Vol. 2, No. 4, p. 1-11.
- Anese, M., Quarta, B., Frias, J. (2011). Modelling the Effect of Asparaginase in Reducing Acrylamide Formation in Biscuits. *Articles School of Food Science and Environmental Health*.
- Anonymous. (2010). <http://www.medwelljournals.com/fulltext/?doi=rjbsci.2010.565.575> (on-line access on 15 Jun, 2014).
- Anonymous. (2012). <http://www.csgid.org/deposits/view/1220> (on-line access on 15 Jun, 2014).
- Aksoy, S., Tumor, H., Hasirci, N. (1998). Stability of α -amylase immobilized on poly(methyl methacrylate-acrylic acid) microspheres. *Journal of Biotechnology*, 60: 37-46.
- Ashrafi, H. Amini, M. Samani, S. Azadi, Y. Tabandeh, M. Sarvestani, E. Daneshamouz, S. (2013). Nanostructure L-asparaginase-fatty acid bioconjugate: Synthesis, preformulation study and biological assessment. *International Journal of Biological Macromolecules*. Volume 62, November 2013, Pages 180–187.
- Ates, B. (2007). *Antikanserojenik L-asparaginazın farklı gram-negatif bakterilerde üretimi, kimyasal karakterizasyonu ve invitro uygulaması*. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Batista-Viera, F.. Brena, Beatriz M. (2006). Immobilization of Enzymes. *Immobilization of Enzymes and Cells Methods in Biotechnology*. Volume 22, pp 15-30.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Brady, D., Jordan, A. (2009). Advances in enzyme immobilization. *Biotechnol Lett.*, 31, 1639- 1650.
- Campbell, P. N., Brew, K. (1967). Studies on the Biosynthesis of Protein by Lactating Guinea-Pig, *Biochem. J.* 102, 265.

- Carlsson, J., Batista-Viera, F. (1998). Polyethylene glycol as a spacer for solid-phase enzyme immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. Volume 33, Issue 7, Pages 890-898.
- Ciesarová, Z., Kiss, E., Boegl, P. (2006). Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products. *Journal of Food and Nutrition Research* Vol. 45, 2006, No. 4, pp. 141-146.
- Dhanam, J.G., Kannan, S. (2013). L-asparaginase- types, perspectives and applications. *Advanced Bio Tech*. ISSN: 2319-6750 Vol.13 Issue 05.
- El-Sayed, S., Fyiad, A., Gamal-Eldeen, M. (2012). Immobilization, Properties and Anti-tumor Activity of L-asparaginase of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* Seeds. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(3): 785-794.
- Gemeiner, P., (1992). Materials for enzyme engineering. In: *Gemeiner P (Ed) Enzyme engineerin Ellis Horwood*, New York, pp.13–119.
- Ghosh, S., Chagantib, S., Prakashamb, R.S. (2012). Polyaniline nanofiber as a novel immobilization matrix for the anti-leukemia enzyme l-asparaginase *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74:132– 137.
- Górecka E, Jastrzębska M (2011). Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnol. Food Sci*. 75:65-86.
- Huang, J., Liu, G., Song, C., Saiz, E., Tomsia, A.P. (2012). Role of Molecular Chemistry of Degradable pHEMA Hydrogels in Three-Dimensional Biomimetic Mineralization. *Chem. Mater*. 2012, 24, 1331–1337.
- Idris, A., Zain, N.A.M., Suhaimi, M.S. (2008). Immobilization of Baker's yeast invertase in PVA–alginate matrix using innovative immobilization technique. *Process Biochemistry*, 43: 331-338.
- Jean-Francois, J., and Fortier, G. (1997). Immobilization of L-asparaginase into a biocompatible poly(ethylene glycol)-albumin hydrogel: I: Evaluation of performance in vivo. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 26(3): 203– 212.
- Kar, A., Sambamurthy K., (2006). “ *Pharmaceutical Biotechnology*” New Age.
- Karamitros, C.S., Yashchenok, A.M., Möhwald, H., Skirtach, A.G., Konrad, M. (2013). Preserving Catalytic Activity and Enhancing Biochemical Stability of the Therapeutic Enzyme Asparaginase by Biocompatible Multilayered Polyelectrolyte Microcapsules. *Biomacromolecules*, 2013, 14 (12), pp 4398–4406.
- Kukurová K, Morales FJ, Bednáriková A, Ciesarová Z. (2009). Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. *Mol Nutr Food Res*. Dec;53(12):1532-9. doi: 10.1002/mnfr.200800600.

- Kumar, R.S.S., Vishwanath, K.S., Singh, S.A., Rao, A.G.A. (2006). Entrapment of α -amylase in alginate beads: Single step protocol for purification and thermal stabilization. *Process Biochemistry*, 41: 2282-2288.
- Kumar, N. S., Shimray, Crassina A., Indrani, D., Manonmani, H. K. (2013). Reduction of Acrylamide Formation in Sweet Bread with L-Asparaginase Treatment *Food and Bioprocess Technology*. Volume 7, Issue 3, pp 741- 748.
- Kumar, N. S., Kishore,V., Manonmani, H. K. Chemical modification of L-asparaginase from *cladosporium* sp. for improved activity and thermal stability. (2014). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. Volume 44, Issue 5, 2014 pages 433-450.
- Loubat, C., Boutevin, B. (2001). Synthesis of poly(methylmethacrylate) macromonomers prepared by radical chain transfer reaction H NMR study of macromonomer end-groups *Polymer Bulletin*. 45, 487–494.
- Lubkowski, J., Dauter, M., Aghaiypour, K., Wlodawera, A., Dautera, Z. (2003). Atomic resolution structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase, *Biological Crystallography*. ISSN 0907-4449.
- Luisi, PL. Magid, LJ. Fendler, JH. (1986). Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solution. *Critical Reviews*.
- Martin, DC., Semple JL., Sefton MV. (2010). Poly(methacrylic acid-co-methyl methacrylate) beads promote vascularization and wound repair in diabetic mice. *J Biomed Mater Res A*. May;93(2):484-92. doi: 10.1002/jbm.a.32528.
- Maysa EM, Amira M, Gamal E, Sanaa T, Sayed EI. (2010). Production immobilization and antitumour activity of L-asparaginase of *Bacillus* sp R36. *Journal of American Science*; 6 (8):157-165.
- Nelson, J. M., Griffin Edward G. (1916). Adsorption of invertase. *J. Am. Chem. Soc.*, 1916, 38 (5), pp 1109–1115. New Delhi,.
- Nisha, S., Arun, Karthick. S., Gobi, N. (2012). A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. *Chemical Science Review and Letters* ISSN 2278-6783 *Che Sci Rev Lett* 1(3), 148-155.
- Pedreschi, F., S. Mariotti, K. Granby, and J. Risum. (2011). Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *Lwt-Food Science and Technology* 44: 1473–1476.
- Poznansky, M., Shandling, M., Salkie, A. (1982). Advantages in the Use of L-Asparaginase-Albumin Polymer as an Antitumor Agent. *Cancer Res* 1982;42:1020-1025.

- Ramya, L.N., Doble, M., Rekha, V.P.B., Pulicherla, K.K. (2012). L-Asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Appl Biochem Biotechnol.* 167: 2144–2159.
- Roy, I., Sardar, M., Gupta, M.N. (2003). Evaluation of Smart Bioconjugate of Pectinase for Chitin Hydrolysis. *Biochemical Engineering Journal*, 16:329- 335.
- Ryting, M.E. (2012). Role of L-asparaginase in acute lymphoblastic leukemia: focus on adult patients. *Blood and Lymphatic Cancer: Targets and Therapy.* 2:117–124.
- Sacak, M., (2004). “*Polimer Kimyası*”, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Ankara, 1-63 .
- Shepherd, R., Reader, S., Falshaw A. (1997). Chitosan functional properties Industrial Research Limited. *Glycoconjugate Journal.* 14: 535—542.
- Sinha, R., Singh, H.R., Jha, S.K. (2013). Microbial l-asparaginase: present and future prospective. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology (An ISO 3297: 2007 Certified Organization).* Vol. 2, Issue 11.
- Stecher , A.L. Morgantetti de Deus P., Polikarpov , I., Abrah~ao-Neto J. (1999). Stability of L-asparaginase: an enzyme used in leukemia treatment. *Pharmaceutica Acta Helvetiae.*74: 1–9.
- Sundaramoorthi C, Rajakumari R, Abhay Dharamsi, Venkadeshprabu K. (2012). Production and immobilization of L asparaginase from marine source. *Int J Pharm Pharm Sci:* 4: 229-232.
- Tabandeha, M.R., Aminlaria, M. (2009). Synthesis, physicochemical and immunological properties of oxidized inulin–l-asparaginase bioconjugate . *Journal of Biotechnology* 141 :189–195.
- Telefoncu, A., (1997). *Enzimoloji.Yüksek Lisans Yazokulu.* 21-27 Eylül 1997. Kuşadası, Aydın, Türkiye.446 s.
- Teodor, E., Litescu, S., Lazar, V., Somoghi, R. (2009). Hydrogel-magnetic nanoparticles with immobilized L-asparaginase for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine.* Volume 20, Issue 6, pp 1307-1314.
- Terbojevich, M., Muzarelli, R.A.A. (2000). Chitosan. *Woodhead Publishing Ltd. Press.*
- Tomar, N., Tomar, M., Gulati, N., Nagaich, U. (2012) pHEMA hydrogels: Devices for ocular drug delivery. Volume : 1, Issue : 4 Page : 224-230.

- Uygun, M., Uyun, D.A, Karagözler, A.A. (2012). PVA-Aljinat Küreler Üzerine α -Amilaz Enziminin İmmobilizasyonu, *Tralleis Elektronik Dergisi*, 45-50.
- Verma, N., Kumar, K., Kaur, G., Anand, S. (2007). L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. *Critical Reviews in Biotechnology*. 27:45–62.
- Vina, I., Karsakevich, A., Bekers M., . (2001). Stabilization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Volume 11, Issues 4–6, 22, Pages 551–558.
- Yadav, S., Verma, S.K., Singh, J., Kumar, A. (2014). Industrial production and clinical application of l-asparaginase: a chemotherapeutic agent. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Medical, Pharmaceutical Science and Engineering* Vol:8 No:1.
- Zhang, Y., Zhoua, W., Shen, W., Chena, Y., Zha, X., Shirai, K., Kiguchi, K. (2005). Synthesis, characterization and immunogenicity of silk fibroin-l-asparaginase bioconjugates. *Journal of Biotechnology* 120 315–326.
- Zhang, Y., Tao, M., Shen, W., Mao, J., Chen, Y. (2006). Synthesis of silk sericin peptides–Lasparaginase bioconjugates and their characterization. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81:136–145 (2006) DOI: 10.1002/jctb.1370.
- Zhang, Y., Wang, Y., Wang, H., Zhu, L., Zhou, Z. (2011). Highly efficient processing of silk fibroin nanoparticle-L-asparaginase bioconjugates and their characterization as a drug delivery system. *Soft Matter*, 7, 9728.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Ahmet ULU

Doğum Yeri ve Tarihi: Havza / 03.10.1986

Adres: İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

E-Posta: ahmet.ul@inonu.edu.tr

Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi (2004-2008)

Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi (2012-2014)

Mesleki Deneyim ve Ödüller:

Kimyager (İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Şubat-2009-...)

Yayın Listesi:

ULU, Ahmet. The Effect of Heat-Treatment on Antioxidant Properties of Honey Obtained from Different Region in Turkey, 44th World Chemistry Congress, Istanbul, 2013.