

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERBEST VE İMMOBİLİZE TERMOFİLİK GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS
L-ASPARAJİNAZ TİP II ENZİMLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE GIDA
ENDÜSTRİSİNDE AKRİLAMİD GİDERİMİNDEKİ POTANSİYELİNİN
BELİRLENMESİ

BURCU KARAASLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2023

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SERBEST VE İMMOBİLİZE TERMOFİLİK
GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS L-ASPARAJİNAZ
TİP II ENZİMLERİNİN KARAKTERİZASYONU VE
GIDA ENDÜSTRİSİNDE AKRİLAMİD
GİDERİMİNDEKİ POTANSİYELİNİN BELİRLENMESİ**

**BURCU KARAASLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞRETİM ÜYESİ FATMA İNCİ ÖZDEMİR**

**GEBZE
2023**

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**CHARACTERIZATION OF FREE AND IMMOBILIZED
THERMOPHILIC GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS
L-ASPARAGINASE TYPE II ENZYMES AND
DETERMINATION OF THEIR POTENTIAL FOR
ACRYLAMIDE MITIGATION IN THE FOOD INDUSTRY**

BURCU KARAASLAN

A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR

ASSIST. PROF. DR. FATMA İNCİ ÖZDEMİR

GEBZE

2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 02/02/2023 tarih ve 2023/09 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/02/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan BURCU KARAASLAN'ın tez çalışması MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Dr. Öğr. Üyesi F. İnci ÖZDEMİR

ÜYE

: Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Prof. Dr. Deniz YILDIRIM

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

L-asparajinaz enzimi (E.C 3.5.1.1), asparajin amino asidini hidroliz ederek aspartik asit ve amonyak oluşumunu sağlayan önemli bir endüstriyel enzimdir. Günümüzde bu enzim, akut lenfoblastik lösemi (ALL) gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte son yıllarda özellikle gıda endüstrisinde akrilamid giderici ajan olarak dikkatleri üzerine çekmiştir. Akrilamid, gıdaların yüksek sıcaklıklarda kızartılması sonucu asparajin öncül maddesinden oluşmaktadır. L-asparajinaz enziminin asparajini hidroliz ederek oluşan akrilamid miktarını azaltması bir gıda enzimi olarak potansiyelini ve önemini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte gıda endüstrisinde kullanılacak asparajinazların yüksek sıcaklık ve geniş pH aralıklarında kararlı olmaları ve yeniden kullanılabilir olmaları arzu edilen özellikleridir. İstenilen bu özellikler enzimin uygun bir matrise immobilizasyonu ile sağlanabilmektedir. Bu nedenle yapılan tez çalışmasında, termofilik *Geobacillus kaustophilus*'tan elde edilen serbest L-asparajinaz'ın çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) üzerine immobilize edilmesi ve hem serbest hem de immobilize enzimin akrilamid giderim potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda *GkASNaz* enzimi, *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edilerek Ni-NTA afinite kromatografisiyle 6.14 kat saflaştırılmıştır. Saflaştırılan *GkASNaz* enzimi, MWCNT üzerine kovalent olarak immobilize edildikten sonra her iki enzim karşılaştırmalı olarak karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonuçları serbest ve immobilize enzim için optimum pH'ın 8.5 olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte optimum sıcaklık değeri serbest enzim için 55 °C iken immobilize enzim için 65 °C olarak bulunmuştur. Termal inaktivasyon deneyi, immobilize enzimin termal stabilitesinin serbest *GkASNaz*'a kıyasla 65 °C'ta 42.6 kat arttığını göstermiştir. Tekrar eden 20 kullanım sonunda ise immobilize enzim başlangıç aktivitesinin %93'ünü korumuştur. Ayrıca serbest ve immobilize enzimin akrilamid oluşumunu 60 dakikada %100 oranında azalttığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: L-asparajinaz, MWCNT, İmmobilizasyon, Akrilamid giderimi.

SUMMARY

L-asparaginase enzyme (E.C 3.5.1.1) is an important industrial enzyme that hydrolyzes the asparagine to form aspartic acid and ammonia. Today, this enzyme is used as a therapeutic agent in the treatment of various types of cancer, such as acute lymphoblastic leukemia (ALL). However, in recent years, it has attracted attention as an acrylamide mitigation agent, especially in the food industry. Acrylamide is formed from the precursor of asparagine as a result of frying foods at high temperatures. The fact that the L-asparaginase enzyme reduces the amount of acrylamide formed by hydrolysis of asparagine reveals its potential and importance as a food enzyme. However, there is a need for asparaginases that are stable and reusable at high temperatures and wide pH ranges in the food industry. These desired properties can be achieved by immobilization of the enzyme to a suitable matrix. Therefore, in the thesis study, it was aimed to immobilize free L-asparaginase obtained from thermophilic *Geobacillus kaustophilus* on multi-walled carbon nanotube (MWCNT) and to examine the acrylamide mitigation potential of both free and immobilized enzyme. For this purpose, *GkASNase* enzyme was highly expressed in *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) cells and purified 6.14-fold by Ni-NTA affinity chromatography. After the purified *GkASNase* enzyme was covalently immobilized on MWCNT, both enzymes were characterized comparatively. Characterization results showed that the optimum pH for free and immobilized enzyme was 8.5. However, the optimum temperature value was found to be 55 °C for free enzyme and 65 °C for immobilized enzyme. The thermal inactivation experiment showed that the thermal stability of the immobilized enzyme increased by 42.6 folds at 65 °C compared to free *GkASNase*. After 20 repeated uses, the immobilized enzyme preserved 93% of its initial activity. In addition, it was determined that free and immobilized enzyme reduces acrylamide formation by 100% in 60 minutes.

Keywords: L-asparaginase, MWCNT, Immobilization, Acrylamide mitigation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol göstererek bilimsel desteğini sunan, akademik anlamda beni yönlendirerek çalışmama ışık tutan, hoşgörüsünü, anlayışını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, beraber çalışmaktan büyük onur ve mutluluk duyduğum çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi F. İnci ÖZDEMİR'e,

Tez çalışmamın İmmobilizasyon ve Enstrümental Analiz bölümlerinde bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyerek bu konuları öğrenmemde katkıları büyük olan sevgili hocalarım Prof. Dr. Deniz YILDIRIM ve Dr. Ahmet TÜLEK'e,

Yüksek lisans eğitimim sırasında aynı laboratuvarı paylaştığımız, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK'e,

Aynı laboratuvarı paylaşmaktan büyük keyif duyduğum ve birlikte çok güzel zamanlar geçirdiğim sevgili çalışma arkadaşlarım Aslı BAYRAKTAR KAVALCI, Oytun SARIGÖZ, Gözde ŞÜKÜR, Nagihan GENEL, Sude KARA, Leman ÖZEL, Adem DEMİROĞLU ve Halil YILMAZ'a,

Hayatımın her döneminde koşulsuz sevgi ve desteklerini hissettiğim varlıklarıyla bana güven veren ve hep yanımda olan babam Harun KARAASLAN, annem Hatice KARAASLAN ve ağabeyim Burak KARAASLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu tez çalışmasını 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı ve 122Z124 proje no'lu 'Endüstriyel biyoteknolojik uygulamalar için *Geobacillus kaustophilus* L-asparajinaz tip II enziminin immobilize sistemler ile performansının artırılması' başlıklı 1002 Hızlı Destek Programı kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	2
2. L-ASPARAJİNAZ ENZİMİ	4
2.1. L-Asparajinaz Enzim Mekanizması	4
2.2. L-Asparajinaz Enziminin Yapısı ve Sınıflandırılması	5
2.3. L-Asparajinaz Enziminin Elde Edildiği Organizmalar	7
2.4. Termofilik <i>Geobacillus kaustophilus</i> 'un Özellikleri	8
2.5. L-Asparajinaz Üretim Yöntemleri	9
2.6. L-Asparajinaz Enziminin Kullanım Alanları	9
2.6.1. Kemoterapötik Ajan Olarak Kullanımı	9
2.6.2. Biyosensör Uygulamaları	11
2.6.3. Amino Asit Biyosentezi	12
2.6.4. Gıda Endüstrisinde Kullanımı	12
2.7. Enzim İmmobilizasyonu	15
2.8. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri	17
2.8.1. Kovalent Bağlama Yöntemi	17
2.8.2. Çapraz Bağlama Yöntemi	18
2.8.3. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi	18
2.8.4. Enkapsülasyon Yöntemi	18
2.8.5. Tutuklama Yöntemi	19

2.9. L-Asparajinaz İmmobilizasyonu	19
2.9.1. L-Asparajinaz İmmobilizasyonunda Nanotaşıyıcı Malzemeler	19
2.9.2. İmmobilize L-Asparajinazların Gıda Endüstrisindeki Uygulamaları	22
3. MALZEME ve YÖNTEM	25
3.1. Malzemeler	25
3.1.1. Kullanılan Mikroorganizma Suşu ve Plazmit Vektör	25
3.1.2. Kullanılan Enzimler ve Kitler	26
3.1.3. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri	26
3.1.4. Saflaştırmada Kullanılan Malzemeler	27
3.1.5. Kullanılan Besiyerleri	27
3.1.6. Kullanılan Solüsyonlar ve Tamponlar	28
3.1.7. Kullanılan Kimyasallar	30
3.1.8. Kullanılan Cihazlar	30
3.2. Yöntemler	31
3.2.1. Kompetan <i>E. coli</i> Rosetta™ 2 (DE3) Hücrelerinin Hazırlanması	31
3.2.2. pET-22b(+)/GkASNaz ve pET-22b(+) Vektörlerinin Kompetan <i>E. coli</i> Rosetta™ 2 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu	31
3.2.3. Plazmit İzolasyonu	32
3.2.4. pET-22b(+)/GkASNaz ve pET-22b(+) Plazmitlerinin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi	32
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	33
3.2.6. Asparajinaz Enziminin Ekspresyonu	33
3.2.7. Asparajinaz Enziminin Saflaştırılması	34
3.2.8. SDS-PAGE Analizi	35
3.2.9. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	35
3.2.10. Saflaştırılan Asparajinaz Enziminin Karbon Nanotüp Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu	36
3.2.10.1. İmmobilizasyon İçin Karbon Nanotüplerin Hazırlanması	36
3.2.10.2. İmmobilizasyon İşlemi	36
3.2.11. İmmobilize Enzimin Enstrümental Analizi	37
3.2.11.1. SEM, SEM-EDS Analizi	37
3.2.11.2. FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) Analizi	37

3.2.12. Serbest ve İmmobilize L-Asparajinazın Aktivite Tayini	38
3.2.13. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu	38
3.2.13.1. pH'ın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	39
3.2.13.2. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi	39
3.2.13.3. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	39
3.2.13.4. Termal Kararlılığın Belirlenmesi	40
3.2.13.5. Depolama Kararlılığının Belirlenmesi	40
3.2.13.6. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi	41
3.2.14. Akrilamid Giderim Potansiyelinin Belirlenmesi	41
4. SONUÇLAR	42
4.1. <i>GkASNaz</i> Genini İçeren ve İçermeyen pET-22b(+) Vektörlerinin Transformasyonu ve Doğrulanması	42
4.2. <i>GkASNaz</i> Enzimini Kodlayan Genin Ekspresyonu	43
4.3. <i>GkASNaz</i> Enziminin Saflaştırılması	44
4.4. Asparajinaz Aktivitesinin Belirlenmesi	46
4.5. <i>GkASNaz</i> Enziminin İmmobilizasyonu	47
4.6. İmmobilize <i>GkASNaz</i> Enziminin Enstrümental Analizleri	47
4.6.1. SEM, SEM-EDS Analizi	47
4.6.2. FT-IR Analizi	49
4.7. Serbest ve İmmobilize <i>GkASNaz</i> 'ın Biyokimyasal Karakterizasyonu	50
4.7.1. pH'ın Serbest ve İmmobilize <i>GkASNaz</i> Aktivitesi Üzerine Etkisi	50
4.7.2. Sıcaklığın Serbest ve İmmobilize <i>GkASNaz</i> Aktivitesi Üzerine Etkisi	51
4.7.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	51
4.7.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi	53
4.7.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi	55
4.7.6. Serbest ve İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi	55
4.8. Serbest ve İmmobilize Enzimin Akrilamid Giderim Potansiyelinin Belirlenmesi	56
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u> <u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklamalar</u>
~	: Yaklaşık
α	: Alfa
β	: Beta
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
Amp	: Ampisilin
APS	: Amonyum Persülfat
Asn	: Asparajin
ASNaz	: Asparajinaz
Asp	: Aspartat/Aspartik Asit
<i>Bam</i> HI-HF	: <i>Bacillus amyloliquenfaciens</i> H Endonükleaz
Bç	: Baz Çifti
CNT	: Karbon nanotüp
DMSO	: Dimetilsülfoksit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>Gk</i>	: <i>Geobacillus kaustophilus</i>
<i>Gk</i> ASNazII	: <i>Geobacillus kaustophilus</i> L-Asparajinaz
HCl	: Hidroklorik Asit
His	: Histidin
IPTG	: İzopropil-Beta-D-tiyogalaktopiranozit
kDa	: Kilodalton
kV	: Kilo Volt
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani Broth
Lys	: Lizin
M	: Molar

mL	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
Mw	:	Moleküler ağırlık
MWCNT	:	Çok duvarlı karbon nanotüp
<i>NdeI</i>	:	<i>Neisseria denitrificans</i> I Endonükleaz
Ni	:	Nikel
nm	:	Nanometre
PAGE	:	Poliakrilamit Jel Elektroforezi
Rpm	:	Dakika Başı Dönüş
SDS	:	Sodyum Dodesilsülfat Salt
Ser	:	Serin
SF	:	Submerged Fermentasyon
SOB	:	Süperoptimal Brot
SOC	:	Süperoptimal Brot (Katabolik Baskılama)
SSF	:	Solid State Fermentasyon
TCA	:	Trikloro Asetik Asit
TEMED	:	Tetrametiletilediamin
Thr	:	Treonin
TSS	:	Toplam Katı Solüsyonu
U	:	Ünite
V	:	Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: L-asparajinaz enziminin genel reaksiyon mekanizması.	4
2.2: L-asparajinaz enziminin 2 adımlı etki mekanizması.	5
2.3: L-asparajinaz tipleri.	6
2.4: Normal ve kanser hücrelerinde L-asparajinaz mekanizması.	10
2.5: Maillard reaksiyonu sonucu akrilamid oluşumu.	13
2.6: L-asparajinaz enzimi ile akrilamid gideriminin şematik gösterimi.	14
2.7: Enzim immobilizasyon yöntemleri.	17
3.1: pET-22b(+) vektörünün klonlama ve ekspresyon bölgesi.	25
3.2: pET-22b(+) vektörünün dairesel haritası.	26
3.3: Kullanılan moleküler belirteçler.	27
3.4: <i>GkASNaz</i> immobilizasyonunun şematik gösterimi.	37
4.1: Tek ve çift restriksiyon endonükleaz kesim analizi.	42
4.2: <i>GkASNaz</i> ekspresyonunun SDS-PAGE (%12) görüntüsü.	43
4.3: Rekombinant <i>E. coli</i> Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinden elde edilen hücre özütünün %12'lik SDS-PAGE analizi.	44
4.4: Saflaştırma sonrası elde edilen elüsyon fraksiyonlarının SDS-PAGE analizi.	45
4.5: Saflaştırılmış proteinin SDS-PAGE (%12) analizi.	45
4.6: Farklı büyütme oranlarında alınan SEM görüntüleri.	47
4.7: İmmobilize yapıların EDS spektrumları.	48
4.8: Serbest ve immobilize enzimin FT-IR spektrumları.	49
4.9: Serbest ve immobilize <i>GkASNaz</i> aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.	50
4.10: Serbest ve immobilize <i>GkASNaz</i> aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.	51
4.11: Serbest ve immobilize enzimlerin Lineweaver-Burk grafikleri.	52
4.12: Serbest ve immobilize <i>GkASNaz</i> enzimlerinin termal kararlılıkları.	54
4.13: İmmobilize <i>GkASNaz</i> enziminin tekrar kullanım kararlılığı.	55
4.14: Serbest ve immobilize <i>GkASNaz</i> 'ın depolama kararlılıkları.	56
4.15: Serbest ve immobilize <i>GkASNaz</i> 'ın akrilamid giderim potansiyeli.	57

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: L-asparajinaz enziminin elde edildiği bakteri türleri.	7
2.2: Farklı gıda ürünlerindeki akrilamid miktarları.	13
2.3: Serbest L-asparajinazın gıdalardaki akrilamid giderimi üzerine etkisi.	15
2.4: L-asparajinazın farklı nanomalzemeler üzerine immobilizasyonu.	21
3.1: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.	28
3.2: Kullanılan solüsyon ve tamponlar.	28
4.1: <i>GkASNaz</i> enziminin saflaştırma sonuçları.	46
4.2: Serbest ve immobilize <i>GkASNaz</i> enzimlerinin kinetik parametrelerinin karşılaştırılması.	53
4.3: Serbest ve immobilize <i>GkASNaz</i> enzimlerinin 55 ve 65 °C'taki termal kararlılık parametreleri.	54

1. GİRİŞ

Akrilamid, 1994 yılında Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC) tarafından insanlar için muhtemel kanserojen madde olarak sınıflandırılmış, genotoksik ve nörotoksik etkileri de bulunan toksik bir maddedir. Bundan 20 yıl önce İsveçli bir grup araştırmacının kızartılmış karbohidrat bakımından zengin gıdalarda akrilamid varlığını tesadüfen ortaya koyması gıda güvenliği açısından dünya çapında büyük bir endişeye sebep olmuştur. Akrilamid, günlük olarak tüketilen nişasta içeriği zengin gıdaların yüksek sıcaklıklarda işleme tabii tutulmasıyla birlikte gıdalarda bulunan serbest L-asparajinin, indirgenen şekerle (glikoz ve fruktoz gibi) reaksiyona girmesi sonucu açığa çıkmaktadır [Pedreschi vd., 2010; Adebo vd., 2017].

Akrilamidin özellikle patates cipsi (%6-46), kahve (%13-39), ekmek (%10-30) ve unlu mamuller (%10-20) gibi sıkça tüketilen gıda maddelerinin hazırlanışı sırasında yüksek miktarda oluşması sağlık açısından tehlike arz etmektedir. Bu nedenle yaygın olarak tüketilen bu gıda maddelerinde akrilamidin varlığı endişe uyandırmış ve oluşumunun engellenmesine yönelik stratejilerin geliştirilmesi hız kazanmıştır. Gıdalarda akrilamid oluşumu, indirgeyici şekerlerin içeriğinden, pH, sıcaklık, süre ve nem gibi faktörlerden etkilenmektedir. Bu nedenle akrilamidin oluşumunu önlemek ya da azaltmak için kullanılan yöntemlerin hemen hemen hepsi başlangıç aşamasındaki hazırlık işlem parametrelerine dayanmaktadır. Ancak bu yöntemler akrilamid miktarını azaltmakla birlikte istenmeyen görüntü ve lezzet oluşumuna sebep olmakta ve bundan dolayı tercih edilmemektedir [Sanghvi vd., 2016; Correa vd., 2021].

Son yıllarda gıdaların besleyici özelliklerini etkilemeden akrilamid miktarını azaltmanın en etkili yollarından biri de L-asparajinaz enziminin kullanılmasıdır. L-asparajinaz enzimi, serbest L-asparajinin aspartik asit ve amonyağa dönüşümünü katalizlemektedir. Dolayısıyla gıdaların ısı işlemlerden önce bu enzim ile muamele edilmesi, akrilamidin öncü molekülü olan L-asparajin seviyesini ve oluşan akrilamid miktarını azaltmaktadır [da Cunha vd., 2019]. Bununla birlikte L-asparajinaz enziminin spesifik olarak L-asparajin amino asidini hidroliz etmesi sonucu gıda içeriğindeki diğer amino asitler bu işlemde etkilenmemektedir. Böylece akrilamid miktarı azalırken

besin değerinde herhangi bir kayıp gözlenmemektedir. Ayrıca ısıtma işlemleri sırasında enzimin inaktive olması gıda güvenliği açısından önemli avantaj sağlamaktadır. Günümüzde gıda endüstrisinde akrilamid giderimi için FAO/WHO uzman komitesi tarafından önerilen ve gıda katkı maddesi olarak kullanımı güvenli olan iki ticari L-asparajinaz enzimi bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger* mantarlarından elde edilen Acrylaway® ve PreventASe® enzimleridir [Qeshmi vd., 2018; Jia vd., 2021]. Patateste Acrylaway ticari enziminin kullanılmasıyla akrilamid oluşumunun %67 oranında azaldığı görülmüştür. Aynı enzimin ekmek, cips ve bisküvi gibi gıdalara uygulanması sonucu ise akrilamid miktarının %92'ye kadar azaldığı gözlemlenmiştir [Sivasankari vd., 2018].

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Özellikle gıda endüstrisinde akrilamid giderim potansiyeline sahip olmasından dolayı L-asparajinaz enziminin önemi ortadadır. Bununla birlikte endüstriyel uygulamalar için kullanılacak L-asparajinazların, yüksek sıcaklık ve geniş pH aralıklarında uzun süre stabil olmaları ve yeniden kullanılabilir olmaları istenilen özellikleridir [Nunes vd., 2020]. Ancak mikroorganizmalar tarafından üretilen serbest L-asparajinazların yüksek sıcaklıklarda kararlılıklarını koruyamaması ve yeniden kullanılabilirliklerinin düşük olması enzim kullanımını sınırlamakta ve endüstriyel uygulamalarda maliyeti artırmaktadır. Serbest L-asparajinazların bu dezavantajları göz önüne alındığında özellikle son yıllarda enzim immobilizasyon teknolojisinin gelişimi oldukça heyecan verici olmuştur. Enzim immobilizasyonu, serbest enzimlerin (termal kararlılık ve tekrar kullanım kararlılığı gibi) istenmeyen kısıtlamalarına çözüm sunarken aynı zamanda pH, sıcaklık ve depolama kararlılığı gibi enzim özelliklerini de iyileştirmektedir. Ayrıca immobilize enzimlerin reaksiyon ortamından geri kazanımı tek kullanımlık serbest enzimlere kıyasla çok daha ekonomiktir [Orhan ve Aktaş Uygun, 2020].

Daha önceden laboratuvarımızda termofilik *Geobacillus kaustophilus* organizmasından elde edilen L-asparajinaz II (*GkASNaz*) geni pET-22b(+) vektörüne klonlanmış ve eksprese edilmiştir.

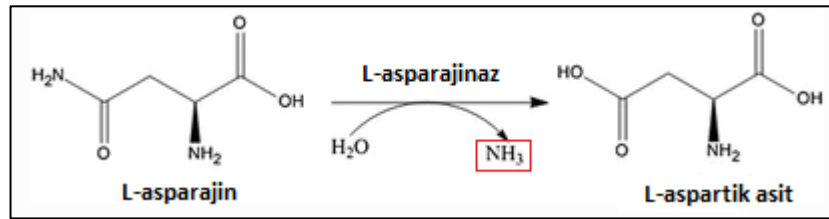
Sunulan bu tez çalışmasında, *GkASNaz* geninin *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edilmesi, üretilen histidin etiketli proteinlerin Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılması, saf bir şekilde elde edilen serbest L-asparajinazın farklı uzunlukta aldehit grupları içeren çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) üzerine kovalent olarak immobilize edilmesi ve ardından hem serbest hem de immobilize enzimin karakterizasyon çalışmalarının (pH, sıcaklık, kinetik parametreler, termal kararlılık ve tekrar kullanım kararlılığı gibi) yapılarak gıda endüstrisinde akrilamid giderim potansiyellerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. L-ASPARAJINAZ ENZİMİ

L-asparajinaz enzimi, ilk olarak 1904 yılında Lang tarafından sığır doku özütlerinde keşfedilmiştir. 1922 yılında guinea pig kan serumunda L-asparajinazın varlığının Clementi tarafından ortaya konması gelecekteki çalışmaların önünü açan önemli bir adım olmuştur [Batoool vd., 2016]. 1953 yılına gelindiğinde L-asparajinazın antitümör etkiye sahip olduğu ilk defa Kidd tarafından keşfedilmiştir. Kidd, yaptığı deneylerde guinea pig kan serumunun fare lenfomalarını öldürebileceğini göstermiştir. Hücre öldürme yeteneğinden sorumlu olan bu faktörün ise serumdaki L-asparajinaz aktivitesine sahip bir enzim olduğu 1961 yılında Broome tarafından bildirilmiştir [Rigouin vd., 2017]. Elde edilen bu sonuçlarla birlikte birçok farklı organizmada L-asparajinaz enziminin varlığı keşfedilmeye başlanmış ve terapötik amaçlı kullanımıyla ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

2.1. L-Asparajinaz Enzim Mekanizması

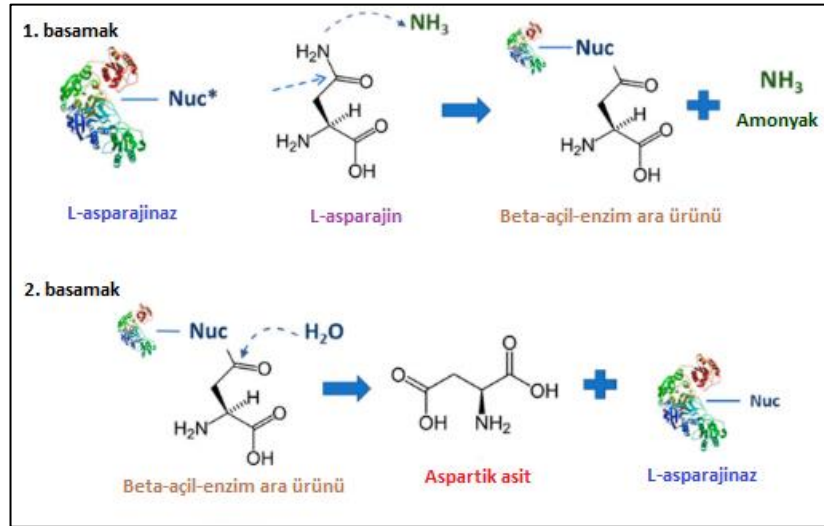
L-asparajinaz enzimi (E.C 3.5.1.1), L-asparajin aminoasidinin hidrolizini spesifik olarak katalizleyerek L-aspartik asit ve amonyak oluşumunu sağlayan bir amidohidrolazdır [Zuo vd., 2015] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: L-asparajinaz enziminin genel reaksiyon mekanizması.

L-asparajinaz tarafından gerçekleştirilen hidroliz işlemi 2 adımda gerçekleşmektedir (Şekil 2.2). İlk adımda; NH_2 (güçlü bir baz) tarafından nükleofilik kalıntısı aktif hale getirilen L-asparajinaz enzimi, substratın (genellikle L-asparajin) amid karbon atomuna saldırarak beta-açıl-enzim ara ürününü oluşturmakta, ikinci

adımında ise; bir su molekülü tarafından aktive edilen nükleofilik kalıntı, beta-açıl-enzim ara ürününün ester karbonuna saldırarak L-aspartik asit ve amonyak açığa çıkarmaktadır [Nunes vd., 2020].



Şekil 2.2: L-asparajinaz enziminin 2 adımlı etki mekanizması.

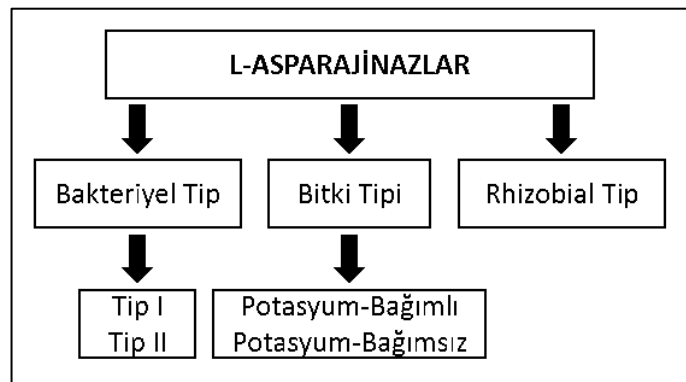
Enzimin çalışma mekanizması, aktiviteleri katalitik üçlü olarak adlandırılan serin-proteazlara oldukça benzemektedir. Bu katalitik üçlü, hidrojen bağlarıyla çevrelenmiş bir nükleofilik (Ser), bir bazik (His) ve bir asidik (Asp) aminoasit kalıntısı içermektedir [Cachumba vd., 2016]. Bununla birlikte L-asparajinaz enzimi, çok düşük verimle de olsa L-glutamin ve β -aspartil peptid amid gibi farklı reaksiyonları kataliz etme yeteneğine sahiptir. Örneğin, *Escherichia coli* ve *Erwinia chrysanthemi* hem asparajinaz hem de glutaminaz aktivitesine sahiptir. Bu bakteriler tarafından üretilen L-asparajinaz enzimleri, L-glutamin aminoasidinin hidrolizini L-asparajin hidrolizine benzer mekanizmayla fakat çok daha düşük verimle (%5) gerçekleştirmektedir [Cachumba vd., 2016; Shakambari vd., 2018].

2.2. L-Asparajinaz Enziminin Yapısı ve Sınıflandırılması

L-asparajinazlar, 4 alt birimin bir araya gelmesiyle oluşan homotetramer yapıya sahip proteinlerdir. Ancak elde edildiği kaynağa bağlı olarak monomerik, dimerik veya heksamerik formlarda da bulunabilmektedir. Enzimin moleküler ağırlığı 140-150 kDa

arasında değişmektedir [Pourhossein ve Korbekandi, 2014]. Her bir monomer, büyük bir N-terminal domaini ile küçük bir C-terminal domaininde düzenlenmiş 8 α -heliks ve 14 β -iplik oluşturan yaklaşık 330 aminoasitten meydana gelmektedir. Enzimin aktif bölgesi iki bitişik monomer arasında bulunmaktadır. Aktif bölgedeki Thr15 ve Thr95 kalıntıları katalitik aktiviteden sorumlu olan aminoasitlerdir [Batool vd., 2016].

Aminoasit dizi bilgilerine, yapısal ve fonksiyonel homolojilerine dayalı olarak asparajinaz enzimleri; bakteriyel tip, bitki tipi ve Rhizobial tip olmak üzere 3 aileden oluşmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: L-asparajinaz tipleri.

Bakteriyel tip L-asparajinazlar, hücrede buldukları bölgeye ve substrata olan afinitilerine göre tip I ve tip II alt gruplarına ayrılmaktadır. Tip I asparajinazlar genellikle dimerik formda bulunan, sitozolik enzimlerken; tip II asparajinazlar tetramer yapıya sahip periplazmik veya membran bağlı enzimlerdir. Tip I L-asparajinazlar, L-glutamine karşı yüksek afinite gösterirken; tip II enzimler, L-asparajine karşı daha yüksek afiniteye sahiptir [Castro vd., 2021].

Yüksek glutaminaz aktivitesine sahip enzimlerin tedavi amaçlı kullanımı vücutta ciddi yan etkilere sebep olabilmektedir. Bu durum, düşük glutaminaz aktivitesine sahip tip II enzimleri klinik uygulamalar için dikkat çekici hale getirmiştir [Lopes vd., 2019]. Bu nedenle özellikle günümüzde terapötik uygulamalar için L-glutamine karşı daha düşük afinite gösteren tip II enzimleri tercih edilmektedir [Safary vd., 2019].

Bitki tipi L-asparajinazlar, yapısal olarak bakteriyel tip asparajinazlardan farklılık göstermektedir. Atmosferik nitrojenin asimilasyonunda yer alan bitki asparajinazları, L-glutamini hidroliz edemezken; özellikle yüksek bitkiler azot metabolizması için L-

asparajini verimli bir şekilde hidroliz edebilmektedir. *Rhizobium etli*'den elde edilen rhizobial tip asparajinazlar ise organizma tarafından karbon ve azot metabolizmasında kullanılmaktadır [Krishnapura vd., 2016].

2.3. L-Asparajinaz Enziminin Elde Edildiği Organizmalar

Doğada bol miktarda bulunan L-asparajinaz enzimi, mikroorganizmalardan (bakteri, mantar, maya ve aktinomiset) daha yüksek organizmalara (bitki, omurgalı ve hayvan dokuları) kadar çok çeşitli kaynaktan elde edilebilmektedir [Muneer vd., 2020]. Bakteri ve mantar kaynaklı L-asparajinazlar basit üretim metotları ile yüksek miktarda üretilebildikleri ve kolay bir şekilde genetik modifikasyona uğratılabildikleri için diğer organizmalardan elde edilen asparajinazlara tercih edilmektedirler [Castro vd., 2021].

Günümüzde klinik uygulamalar için de kullanılan ticari asparajinazların ana üreticileri *E. coli* ve *Erwinia chrysanthemi* bakterileridir. Bununla birlikte mikroorganizmalar tarafından üretilen asparajinazların tedavi amaçlı kullanımı immün inaktivasyonu ve aşırı duyarlılık reaksiyonlarına sebep olabilmektedir. Ayrıca sahip oldukları glutaminaz aktivitesi vücutta yan etkilere neden olabilmektedir. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak için son yıllarda farklı bakteri türlerinden ve ökaryotik organizmalardan daha az yan etkiye sahip L-asparajinaz üretimiyle ilgili çalışmalar devam etmektedir [Chand vd., 2020]. *E. coli* ve *Erwinia chrysanthemi* bakterilerine ek olarak L-asparajinaz üretiminde kullanılan diğer bakteri türlerinin listesi Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1: L-asparajinaz enziminin elde edildiği bakteri türleri.

Bakteriyel L-asparajinaz kaynakları	Referans
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Kishore vd., 2015
<i>Bacillus licheniformis</i> MTCC 429	Sudhir vd., 2016
<i>Pectobacterium carotovorum</i> MTCC 1428	Kumar vd., 2010
<i>Bacillus subtilis</i> hswx88	Jia vd., 2013
<i>Helicobacter pylori</i>	Maggi vd., 2015

Bakteriyel kaynakların yanı sıra ekonomik ve yüksek üretim verimlerinden dolayı bir diğer yaygın asparajinaz üreticileri mantar (*Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* gibi) kaynaklarıdır. Mantarlar tarafından üretilen L-asparajinazların hücre dışına salgılanması saflaştırma aşamalarında oldukça önemli bir avantaj sağlamaktadır. Günümüzde *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger* kaynaklı asparajinazlar gıda sektöründe akrilamid giderimi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [Cachumba vd., 2016].

Bakteri ve mantarların dışında *Streptomyces ginsengisoli*, *Streptomyces griseoluteus* gibi aktinomisetler ve *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* gibi maya türleri de bilinen asparajinaz üreticileridir.

Ekstrem koşullar altında yaşayan termofilik organizmalardan elde edilen termostabil enzimler, yüksek sıcaklıklara karşı dirençli olabilmekte ve aktivitelerini kaybetmeden uzun süre oda sıcaklığında kararlılıklarını koruyabilmektedirler. Özellikle endüstriyel amaçlı kullanılacak enzimler için termofilik organizmalar, potansiyel olarak değerli kaynaklardır. Bu nedenle L-asparajinaz enziminin endüstriyel uygulamalardaki kullanılabilirliğini artırmak, maliyetini düşürmek ve kimyasal denaturantlara karşı dirençliliğini artırmak için yeni termofilik organizmaların keşfedilmesi oldukça önemlidir [Safary vd., 2019].

2.4. Termofilik *Geobacillus kaustophilus*'un Özellikleri

Geobacillus kaustophilus (HTA 426), Mariana Çukuru'nun derin deniz diplerinden izole edilen termofilik, Gram (+) bir bakteridir. Optimum büyüme sıcaklığı 60 °C olmakla birlikte 74 °C sıcaklığa kadar dayanabilmektedir. 3.54 Mb büyüklüğünde halkasal bir kromozoma ve 47.9 kb büyüklüğünde halkasal plazmit DNA'sına sahiptir. Genomunun yaklaşık %86'sına denk gelen 3498 adet protein kodlayan dizisi bulunmaktadır [Takami vd., 2004a; Takami vd., 2004b]. Özdemir vd., 2022 tarafından ilk kez *G. kaustophilus* DSM 7263T suşundan heterolog olarak üretimi gerçekleştirilen ve dizisi belirlenen L-asparajinaz enzimi 323 aminoasitten oluşmaktadır ve yaklaşık büyüklüğü 37 kDa'dur (GenBank: ON035784.1, Protein ID: UUB84579.1, NCBI).

2.5. L-Asparajinaz Üretim Yöntemleri

Hem gıda hem de farmasötik uygulamalar için kullanılacak enzimlerin kolay bir şekilde üretimi, basit saflaştırma metotları ile yüksek verimlilikte elde edilmesi ve üretimde düşük maliyet istenilen özelliklerdendir. L-asparajinaz enzimi günümüze kadar Submerged fermantasyon (SF), Solid-state fermantasyon (SSF) ve rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak birçok farklı organizmadan üretilmiş ve optimize edilmiştir. L-asparajinazın endüstriyel üretiminde, ilk başlarda kolay kullanımı ve büyük ölçekte enzim üretimine olanak sağlamasından dolayı Submerged fermantasyon (SF) tekniği kullanılmıştır. Ancak üretim sonucunda yüksek miktarda atık oluşumu ve üretim maliyetinin fazla olması bu yöntemin kullanımını sınırlandırmıştır. Solid-state fermantasyon (SSF) tekniği de asparajinaz üretiminde kullanılan diğer bir yöntemdir. SSF yönteminin, SF yöntemine kıyasla çok daha yüksek protein verimine sahip olması ve üretimin daha az maliyetle sağlanması bu tekniğin avantajlarından [Batool vd., 2016; Jia vd., 2021].

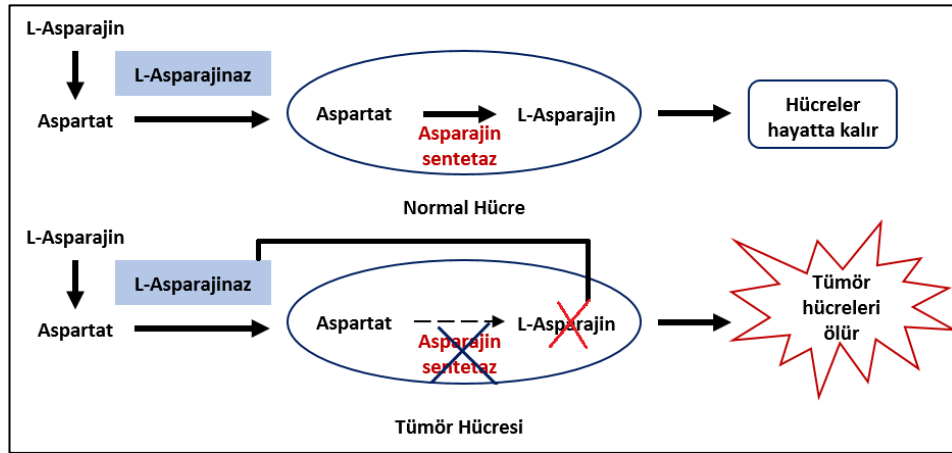
Rekombinant DNA teknolojisi ise son yıllarda yüksek protein verimi, düşük maliyet ve immünojenisite gibi avantajlarından dolayı tercih edilen bir yöntemdir. Bununla birlikte rekombinant DNA teknolojisinin enzim özelliklerini iyileştirmeye yönelik mutasyon yapabilme imkânı sağlamasıyla doğal asparajinazların kısa yarı-ömür ve yüksek immünojenisite gibi dezavantajlarını ortadan kaldırması bir diğer önemli avantajdır [Zuo vd., 2015]. Günümüzde rekombinant L-asparajinaz üretiminde proteinlerin yüksek miktarda ifade edilmesine olanak sağlamasından dolayı *E. coli* konakçı hücresi ve IPTG (izopropil β -D tiogalaktozit) ile indüklenen pET ekspresyon sistemleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

2.6. L-Asparajinaz Enziminin Kullanım Alanları

2.6.1. Kemoterapötik Ajan Olarak Kullanımı

Sağlıklı hücrelerin aksine kanser hücreleri için esansiyel bir amino asit olan L-asparajin, amino asit taşınması/metabolizması ve protein biyosentezi gibi hayati

öneme sahip birçok yolakta görev almaktadır. Başta lenf hücreleri olmak üzere çoğu tümör hücresi, hızlı bir şekilde büyüebilmek ve protein sentezlerini gerçekleştirebilmek için yüksek miktarda asparajin amino asidine ihtiyaç duymaktadır [Shakambari vd., 2018; Özdemir vd., 2022]. Normal hücreler asparajin sentetaz enzimini kullanarak esansiyel olmayan asparajin amino asidini sentezleyebilirken; kanser hücreleri asparajin sentetaz enziminden yoksun oldukları için bu amino asidi sentezleyemezler. Bu nedenle tümör hücrelerinin hayatta kalabilmeleri ve çoğalmaları dolaşımdaki (kan serumu) asparajin seviyesine bağlıdır [Shrivastava vd., 2016]. Terapötik ajan olarak kan dolaşımında L-asparajinaz enziminin varlığı ise buradaki asparajin amino asidini hidroliz ederek kanser hücrelerinin asparajin amino asidinden yoksun kalmalarına dolayısıyla protein sentezinin inhibisyonuna ve hücre apoptozuna neden olmaktadır. Sağlıklı hücreler ise asparajin sentetaz enzimini kullanarak asparajin üretebildikleri için kan serumunda bulunan asparajinaz aktivitesinden etkilenmemektedirler [Chand vd., 2020] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Normal ve kanser hücrelerinde L-asparajinaz mekanizması.

L-asparajinaz enzimi, uzun yıllardır akut lenfoblastik lösemi (ALL), Hodgkin hastalığı, akut miyelositik lösemi ve melanosarkoma gibi hastalıkların tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Günümüzde ALL hastalığının tedavisinde FDA onaylı yaygın bir şekilde kullanılan üç asparajinaz formülasyonu bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla; *E. coli*'den üretilen doğal L-asparajinaz (Elspar®), bu enzimin pegillenmiş formu olan (Oncaspar®) ve *Erwinia chrysanthemi*'den elde edilen L-

asparajinaz (Erwinase®) enzimleridir [Dias G. vd., 2016]. Ancak bu enzimlerin tedavi amaçlı uzun süreli kullanımı aşırı duyarlılık reaksiyonları ve toksisite gibi istenmeyen yan etkilere sebep olmaktadır.

Asparajinazların toksisitesi, enzimin glutaminaz aktivitesiyle ilişkilendirilmektedir. Bu nedenle glutaminaz aktivitesi olmayan ve daha az yan etki oluşturabilecek ökaryotik asparajinazlar ile ilgili çalışmalar hala devam etmektedir. Bununla birlikte son zamanlarda asparajinaz enziminin enkapsülasyonu ve farklı destek materyalleri üzerine immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır. Bu çalışmalar ile asparajinaz enzimi modifiye edilerek özelliklerinin iyileştirilmesi ve immünojenitesinin azaltılması amaçlanmaktadır. Günümüzde nanokapsüllü FDA onaylı asparajinaz enzimi bulunmasa da bu modifikasyonlar, enzimin stabilitesini artırmakla birlikte alerjik reaksiyonlar ve toksisite gibi yan etkileri de ortadan kaldırmaktadır [Darvishi vd., 2022].

2.6.2. Biyosensör Uygulamaları

Hem gıda endüstrisinde hem de ALL ve diğer lenfosarkom hastalıklarının tedavisinde L-asparajinaz bazlı biyosensörler, asparajin seviyesini ölçmek için kullanılmaktadır. Günümüzde L-asparajin analizi için kullanılan XRD, SEM ve TEM gibi spektroskopik yöntemlerin zorluğu ve bazı dezavantajları sebebiyle biyosensör kullanımı bu yöntemlere tercih edilmektedir [Batoool vd., 2016]. Biyosensörün çalışma mekanizması, asparajinazın asparajini hidroliz etmesi sonucu açığa çıkan amonyağın pH'ta bir değişikliğe neden olması bunun sonucunda da renk ve absorpsiyon değişikliğine sebep olmasıdır [Nunes vd., 2020].

2012 yılında Verma ve arkadaşları, gıda örneklerindeki asparajin seviyesini incelemek için L-asparajinaz üreten bakterileri fenol kırmızısı indikatörüyle birlikte bir matriks üzerine immobilize etmiştir. Bunun sonucunda pH değişimiyle birlikte renk değişimini kullanan hücre tabanlı bir biyosensör geliştirmiştir [Krishnapura vd., 2016].

2.6.3. Amino Asit Biyosentezi

L-asparajinaz enzimi, aspartat türevli aminoasitlerin biyosentezinde önemli rol oynamaktadır. Krebs döngüsü ya da asparajinaz enziminin hidrolizi sonucu açığa çıkan aspartik asit; lizin, treonin, metionin ve izolösin amino asitlerinin öncü molekülüdür. Bu nedenle L-asparajinaz enzimi, amino asit metabolizmasında da yer alan önemli bir enzimdir [Qeshmi vd., 2018].

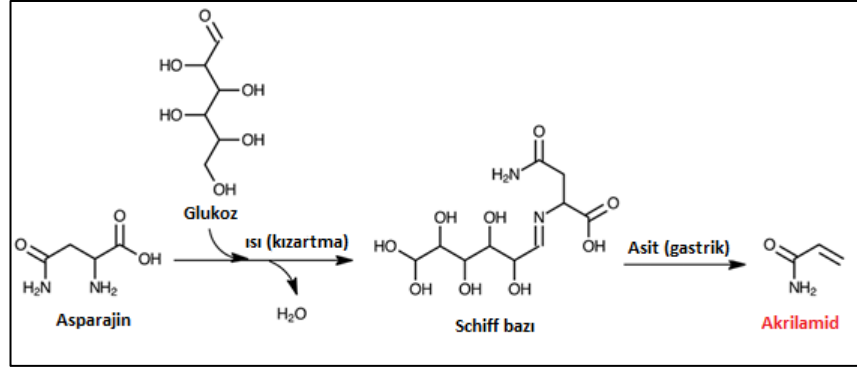
2.6.4. Gıda Endüstrisinde Kullanımı

L-asparajinaz enzimi, son yıllarda gıda endüstrisinde akrilamid giderici ajan olarak dikkatleri üzerine çekmiştir [Krishnapura vd., 2016; Dias vd., 2017; Correa vd., 2021]. 1994 yılında Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından grup 2A'da insanlar için potansiyel karsinogen olarak sınıflandırılan akrilamid; suda çözünebilir, renksiz, kokusuz, nörotoksik ve genotoksik etkilere sahip bir maddedir [Adebo vd., 2017; Munir vd., 2019].

2002 yılında İsveç Ulusal Gıda Otoritesi ve Stockholm Üniversitesi araştırmacılarının patates ve tahıl gibi çok çeşitli gıda ürünlerinde akrilamid varlığını ortaya koyması büyük endişe uyandırmıştır. Bu keşif, bilim insanlarını akrilamid oluşumuna sebep olan faktörleri bulmaya ve akrilamid oluşumunu engellemeye yönelik stratejileri araştırmaya yönlendirmiştir. Akrilamid çığ gıdalarda bulunmamasıyla birlikte özellikle karbohidratça zengin gıdaların (ekmek ve patates cipsi gibi) yüksek sıcaklık ve düşük nem koşullarında pişirilmesi veya kızartılması sonucu açığa çıkmaktadır [Rifai ve Saleh, 2020; Maan vd., 2022].

Yapılan son araştırmalara göre akrilamid oluşum mekanizmalarıyla ilgili en çok kabul gören iki yolak bulunmaktadır. Bunlar; Maillard reaksiyonu ve akrolein yolağıdır. Maillard reaksiyonu, 120 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda işleme tabi tutulan nişastaca zengin gıdalarda doğal olarak bulunan serbest L-asparajinin α -amino grubu ile indirgenen şekerin (glukoz ve fruktoz gibi) karboksil grubu arasında gerçekleşmekte ve reaksiyon sonucunda akrilamid açığa çıkmaktadır [Krishnapura vd., 2016; Sivasankari vd., 2018] (Şekil 2.5). Maillard reaksiyonu, akrilamid oluşumunun yanı sıra

aynı zamanda fırınlanmış gıdalardaki kahverengi renk ve kızarmış lezzetin oluşumundan da sorumludur [Baskar ve Aiswarya, 2018].



Şekil 2.5: Maillard reaksiyonu sonucu akrilamid oluşumu.

Akrilamid, ayrıca yağlı gıdaların ısıtılması sonucu akrolein öncü maddesinden de oluşabilmektedir. Yüksek sıcaklıkta monoaçilgliserolün bozunmasıyla birlikte akrolein oluşmakta ve ardından akroleinin oksitlenmesiyle akrilik asit oluşmaktadır. Serbest asparajin varlığında ise akrilik asitin karbon kaynağı, asparajinin de amino grubu sağlamasıyla birlikte toksik akrilamid oluşumu gerçekleşmektedir [Bachir vd., 2022].

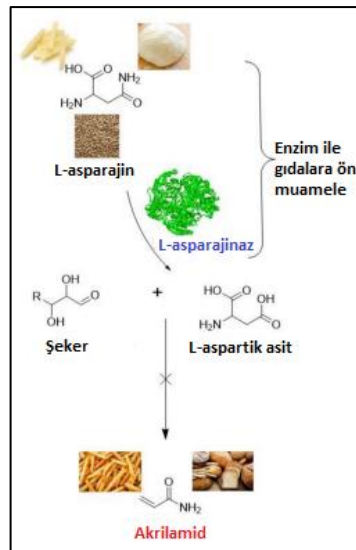
Patates, ekme, bisküvi ve kahve gibi sıkça tüketilen gıdalardaki yüksek akrilamid seviyeleri sağlık için oldukça tehlikelidir. Yetişkin bir insan için günlük ortalama akrilamid alımı 0.3-0.6 mg/kg olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle yaygın olarak tüketilen bu gıdalarda yüksek miktarda akrilamid bulunması endişe uyandırmaktadır [Muneer vd., 2020]. Sıkça tüketilen karbohidratça zengin bazı gıda ürünlerindeki akrilamid içerikleri Tablo 2.2' de verilmiştir.

Tablo 2.2: Farklı gıda ürünlerindeki akrilamid miktarları.

Gıda ürünleri	Akrilamid içeriği (µg/kg)	Referans
Kızarmış patates	375-7024	Adebo vd., 2017
Çikolata	750	
Patates cipsi	90-802	Krishnakumar ve Visvanathan 2015
Ekme	90-802	
Kavrulmuş kahve	45-9359	
Unlu mamul ve bisküvi	18-3324	

Yaygın olarak tüketilen besin maddelerindeki akrilamid miktarını azaltmak için uygulanan stratejilerin çoğu; pişirme sırasında sıcaklığın kontrol edilmesi, pH'ın düşürülmesi ve zamanın kontrol edilmesi gibi işleme süreçlerine dayanmaktadır [Dias vd., 2017]. Patates kızartmasında akrilamid oluşumunu engellemek için ağartma yöntemi kullanılmış ve %20-78 oranında bir azalma gözlemlenmiştir. Ancak bu işlem önemli ölçüde besin kaybına sebep olmuştur [Patial vd., 2022]. Bununla birlikte düşük L-asparajin veya düşük şeker içeriğine sahip hammaddelerin kullanılması gibi yöntemler de akrilamid giderimi için önerilmiştir. Ancak bu yöntemler, akrilamid miktarını azaltsa da gıda ürünlerinin renk, tat ve doku gibi istenilen özelliklerini olumsuz etkilediğinden dolayı tercih edilmemektedir [Cachumba vd., 2016; Xu vd., 2016].

Gıdaların görsel ve besleyici özelliklerini etkilemeden akrilamid miktarını azaltmanın en etkili ve basit yollarından biri ise L-asparajinaz enziminin kullanılmasıdır. Gıdaların kızartılmadan/pişirilmeden önce asparajinaz enzimi ile muamele edilmesi sonucu gıdalarda bulunan L-asparajin, aspartik asit ve amonyağa dönüşmektedir. Sonuç olarak gıda içeriğinde akrilamidin öncü maddesi olan L-asparajin seviyesinin azalmasıyla birlikte Maillard reaksiyonu gerçekleşemediğinden akrilamid oluşumu önemli ölçüde azalmaktadır [Sanghvi vd., 2016; Jia vd., 2021] (Şekil 2.6). Akrilamid gideriminin yanı sıra L-asparajinaz enzimi ile muamele, gıdaların lezzetini artıran glutamik asit içeriğini de artırmaktadır [Munir vd., 2019].



Şekil 2.6: L-asparajinaz enzimi ile akrilamid gideriminin şematik gösterimi.

L-asparajinaz enziminin sahip olduğu bu özellikler, araştırmacıların dikkatini çekmiş ve günümüze kadar birçok farklı mikrobiyal kaynaktan elde edilen asparajinaz enziminin gıdalara muamele edilmesi sonucu akrilamid giderim potansiyelini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3: Serbest L-asparajinazın gıdalardaki akrilamid giderimi üzerine etkisi.

Gıda	Enzim kaynağı	Akrilamid giderimi	Referans
Patates	<i>Acinetobacter soli</i>	% 55.9	Jiao vd., 2020
	<i>Thermococcus zilligii</i>	% 80.5	Zuo vd., 2015
	<i>Pseudomonas oryzaehabitans</i>	% 90	Bhagat vd., 2016
Kahve	<i>Penicillium crustosum</i>	% 75.8	Khalil vd., 2021
Unlu Mamul	<i>Fusarium culmorum</i>	% 86	Meghavarnam ve Janakiraman, 2018
	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	% 60	Hong vd., 2014

Şu anda gıdalardaki akrilamid oluşumunu engellemek için yaygın bir şekilde kullanılan iki ticari enzim bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla *Aspergillus oryzae* ve *Aspergillus niger* mantarlarından elde edilen Acrylaway® ve PreventASe® enzimleridir [Muneer vd., 2020]. Patateste Acrylaway ticari enziminin kullanılmasıyla birlikte akrilamid içeriğinde %67 oranında bir azalma görülmüştür. Aynı enzimin ekmek, cips ve bisküvi gibi gıdalara uygulanması sonucu ise akrilamid miktarının %92'ye kadar azaldığı gözlemlenmiştir [Sivasankari vd., 2018]. L-asparajinaz enzimi, spesifik olarak gıdalardaki serbest asparajinin hidrolizini katalizlediğinden dolayı gıda içeriğindeki diğer amino asitler bu işlemde etkilenmemektedir. Böylece akrilamid miktarı azalırken besin değerinde herhangi bir değişiklik görülmemektedir.

2.7. Enzim İmmobilizasyonu

Birçok kimyasal reaksiyonu kataliz etme yeteneğine sahip olan enzimler; yüksek aktiviteleri ve özgüllüklerinden dolayı çeşitli alanlarda geniş kullanım potansiyeline sahiptirler. Ancak stabilitelelerinin ve yeniden kullanılabilirliklerinin düşük olması, bu

alanlarda kullanımlarını sınırlayan önemli faktörlerdir. Bu nedenle endüstriyel uygulamalarda kullanılacak enzimlerin, geniş sıcaklık ve pH aralıklarında kararlı olmaları ve maliyet açısından tekrar kullanılabilir olmaları arzu edilen özelliklerdendir [Ulu vd., 2016; Nunes vd., 2020].

Mikroorganizmalar tarafından üretilen serbest enzimler, çeşitli endüstrilerde yaygın bir şekilde kullanılsa da yüksek sıcaklıklarda kararlılıklarını koruyamamaları, kısa yarı ömre sahip olmaları ve yeniden kullanılabilirliklerinin olmaması gibi dezavantajlara sahiptirler [Orhan ve Aktaş Uygun, 2020; Noma vd., 2020]. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak ve enzimlerin özelliklerini iyileştirmek için son yıllarda yeni stratejiler geliştirilmektedir. Endüstriyel uygulamalarda serbest enzimlerin sahip olduğu sorunların üstesinden gelmek ve enzimleri daha kullanışlı hale getirmek için geliştirilen en önemli stratejilerden biri, enzim immobilizasyon (hareketsizleştirme) teknolojisidir [Monajati vd., 2018].

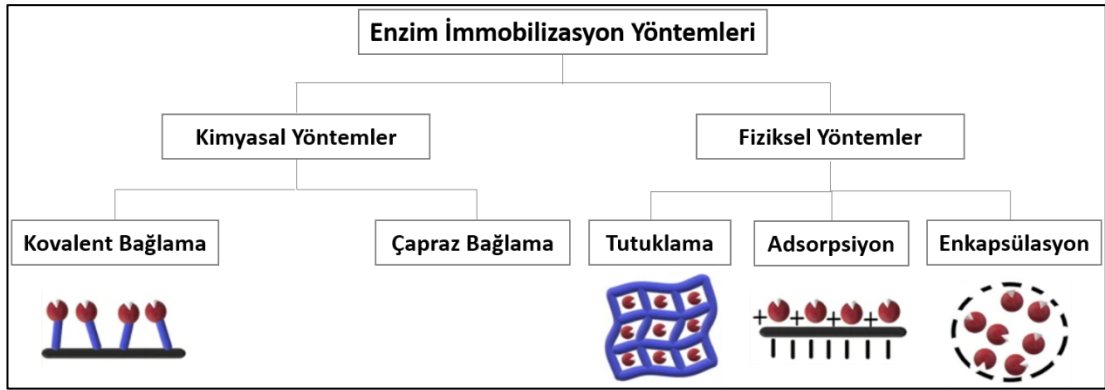
Enzim immobilizasyonu, doğal (native) enzimlerin substrat ve üründen farklı bir taşıyıcı matrikse bağlanması olarak tanımlanmaktadır. Taşıyıcı materyal ve immobilizasyon yöntemi immobilize enzimlerin performansını etkileyen önemli faktörlerdir. Bu nedenle taşıyıcı destek sistemlerinin; biyouyumlu olması, uygun maliyetli olması, yeniden kullanılabilir olması, kolay ulaşılabilir olması ve en önemlisi toksik özellik göstermemesi gerekmektedir [Ulu ve Ateş, 2017].

Enzim immobilizasyonu ile uygun destek sistemlerine bağlanan enzimler, serbest enzimlerin istenmeyen kısıtlamalarına çözüm sunarken, tercih edilen immobilizasyon stratejisine bağlı olarak daha iyi seçicilik, tekrar kullanılabilirlik, depolama kararlılığı, sıcaklık ve pH stabilitesi gibi gelişmiş özellikler de göstermektedir [Basso ve Serban, 2019; Federsel vd., 2021]. Özellikle endüstriyel uygulamalar için maliyet, sınırlayıcı bir faktördür. Bu yüzden tek kullanımlık serbest enzimlere kıyasla immobilize enzimlerin reaksiyon ortamından kolayca uzaklaştırılarak yeniden kullanım için geri kazanımı çok daha ekonomiktir. Ayrıca reaksiyon ürünlerinin, enzim molekülleri ile kontamine olmaması gıda ve sağlık endüstrilerinde immobilize enzimlerin kullanım potansiyelini artırmaktadır [Orhan ve Aktaş Uygun, 2020; Alam vd., 2021].

2.8. Enzim İmmobilizasyon Yöntemleri

Uygun immobilizasyon yönteminin seçimi, belirli bir reaksiyondaki enzim aktivitesinin ve özelliklerinin belirlenmesinde rol oynadığı için oldukça önemlidir. İmmobilizasyon yöntemleri, enzim ve destek sistemi arasındaki etkileşime göre fiziksel ve kimyasal yöntemler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır. Fiziksel yöntemler; hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri ve iyonik bağlanma gibi zayıf etkileşimlerken kimyasal yöntemler; amid bağları gibi kuvvetli kovalent etkileşimlerdir. Dolayısıyla fiziksel immobilizasyon yönteminde enzim ve matriks arasındaki etkileşimler geri dönüştürülebilirken, kimyasal yöntemde enzim matrikse geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanır ve aktivitesini kaybetmeden taşıyıcı matriksten ayrılamaz.

Enzimlerin immobilizasyonunda kullanılan en yaygın teknikler; adsorpsiyon, kovalent bağlama, çapraz bağlama ve tutuklama'dır [Gonçalves Filho vd., 2019]. İmmobilizasyonda kullanılan diğer yöntemler, Şekil 2.7'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.7: Enzim immobilizasyon yöntemleri.

2.8.1. Kovalent Bağlama Yöntemi

Bu yöntemde; enzimler, taşıyıcı destek materyaline kovalent bağlarla geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanmaktadır. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında kovalent bağlar, enzim ile destek arasında güçlü bir bağlanma sağladığından dolayı

enzimin yeniden kullanılabilirliğini artırmakta ve enzimin reaksiyon ortamına kolay bir şekilde salınmasını önlemektedir [Mohamad vd., 2015]. Ayrıca proteinin üç boyutlu yapısını koruduğu için de immobilizasyonda en iyi yöntemlerden biri olmuştur.

2.8.2. Çapraz Bağlama Yöntemi

Çapraz bağlama, enzimlerin stabilitesini artırmak için kullanılan ve enzimlerin bağlanmasında herhangi bir taşıyıcı matriks gerektirmeyen immobilizasyon yöntemidir. Bu immobilizasyon işlemi, enzimin yüzeyinde bulunan spesifik amino asit gruplarıyla çapraz bağlayıcı bir reaktif kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Glutaraldehit, çapraz bağlama yönteminde en yaygın kullanılan bağlayıcı ajandır. Glutaraldehitteki aldehit gruplarının enzimin serbest amino gruplarıyla reaksiyona girmesiyle bağlanma gerçekleşmektedir [Gonçalves Filho vd., 2019].

2.8.3. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi

Yaygın olarak kullanılan bu yöntem, hidrofobik yüzeylere pasif adsorpsiyon veya yüklü yüzeylerle elektrostatik etkileşimleri içermektedir. Kovalent olmayan bu immobilizasyon yöntemi, zayıf ve geri dönüştürülebilirdir. Bu durum enzimlerin destek materyalinden sızmasına ve zamanla enzim aktivitesinin azalmasına sebep olmaktadır [Homaei vd., 2013]. Ancak düşük maliyetli olan bu yöntem ile enzimler kolay bir şekilde destek materyaline yeniden bağlanabilmektedir.

2.8.4. Enkapsülasyon Yöntemi

Bu yöntemde enzimler, küçük moleküllerin geçişine izin veren gözenekli polimerik yapılarda tutulmaktadır. Enzim molekülleri substrat ve ürünlerden daha büyük boyutta olduğundan dolayı membrandan geçemez ve zarın içerisinde kalır. Bu durum enzimlerin uzun süre stabil kalmalarına olanak sağlamaktadır [Gonçalves Filho vd., 2019].

2.8.5. Tutuklama Yöntemi

Tutuklama, enzimin kapalı bir ağ içerisinde fiziksel olarak kısıtlanması şeklinde tanımlanmaktadır. Bu yöntem, substrat ve ürünlerin geçişine izin vermekte ancak iç yapıyı korumaktadır. Böylece enzim sızıntısı en aza indirilirken enzimin polimer yapıyla etkileşime girmemesi denaturasyonu da önlemektedir. Toksik olmaması ve hafif jelleşme özelliğinden dolayı aljinatlar tutuklama yönteminde en yaygın kullanılan polimerlerdendir [Mohamad vd., 2015].

2.9. L-Asparajinaz İmmobilizasyonu

L-asparajinaz enzimi; gıda, farmasötik, ilaç ve biyosensör gibi alanlarda yaygın kullanım potansiyeline sahip endüstriyel bir enzimdir. Bununla birlikte endüstriyel uygulamalarda enzimlerin yüksek sıcaklıklarda işleme tabii tutulması nedeniyle asparajinazların stabilitesi ve yeniden kullanılabilir olması oldukça önemlidir. Bu nedenle immobilizasyon yöntemleri kullanılarak asparajinazların termal stabilitesi, aktivitesi ve substrat afinitesi gibi doğal özellikleri geliştirilmekte ve endüstriyel uygulamalar için daha uygun hale getirilmektedir [Jia vd., 2021].

Günümüze kadar, L-asparajinaz enzimi organik, inorganik ve hibrit malzemeler (kitosan, alüminyum oksit pellet, agaroz küreler ve manyetik nanopartiküller) gibi çeşitli taşıyıcı matriksler üzerine immobilize edilmiştir [Ulu ve Ateş, 2017]. Literatürde L-asparajinazın; biyobozunabilir p(MAA-co-MMA)- nişasta kompoziti (Ulu vd., 2016), alüminyum oksit peletleri (Agrawal vd., 2018) ve NHS-modifiye agaroz küreleri (Li vd., 2020) üzerine immobilizasyonu rapor edilmiştir.

2.9.1. L-Asparajinaz İmmobilizasyonunda Nanotaşıyıcı Malzemeler

Enzimlerin çeşitli matriksler üzerine immobilizasyonu; daha iyi kinetik, stabilite ve yeniden kullanılabilirlik özellikleri kazandırdığı için enzimlerin endüstriyel uygulamalarda kullanımını kolaylaştırmıştır [Alam vd., 2021]. Şu ana kadar yukarıda belirtildiği gibi enzim immobilizasyonu için, organik veya sentetik polimerler,

hidrojeller, silika jeller ve mezogözenekli malzemeler taşıyıcı matriks olarak kullanılmıştır.

Son on yılda ise nanomalzemeler ve nanoyapılar, yüksek yüzey alanları, yüksek biyokatalitik verimlilikleri ve yüksek enzim/protein yükleme kapasiteleri nedeniyle enzimler veya proteinler için taşıyıcılar olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [Costa vd., 2018]. Literatürde L-asparajinaz immobilizasyonu için farklı nanomalzemeler katı destek sistemleri olarak bildirilmiştir.

Nanomalzemeler arasında özellikle manyetik nanopartiküller; yüksek yüzey alanı, geniş yüzey/hacim oranı, düşük toksisite, yüksek biyoyumluluk ve süperparamanyetizma gibi benzersiz özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda büyük ilgi görmektedir. Sahip oldukları manyetik özellik sayesinde bir mıknatıs kullanılarak reaksiyon ortamından kolay bir şekilde ayrılabilmeleri yeniden kullanımları açısından önemli avantajlarından biridir. Bununla birlikte manyetik nanopartiküllerin bir polimer ile kaplanarak sentezlenebilmesi ve yüzeyinde farklı fonksiyonel grupları bulundurabilmesi çeşitli alanlarda sıklıkla tercih edilmesini sağlayan önemli özelliklerindedir [Ulu vd., 2019a].

Dikkatleri çeken bir diğer nanomalzeme, grafen oksit (GO)'tir. Ayırt edici elektriksel, termal ve mekanik özelliklerinden dolayı nanoelektronik cihazlarda, nanokompozit malzemelerde ve biyosensör alanlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Grafen oksitlerin işlevselleştirilerek toksisitesinin azaltılması onların enzim immobilizasyonunda taşıyıcı matriks olarak kullanılmasını sağlayan önemli avantajıdır [Monajati vd., 2018].

Son zamanlarda ise özellikle silindirik grafen levhalardan oluşan karbon nanotüp (CNT)'ler; katmanlı içi boş yapıları, düşük maliyeti, yüksek kimyasal ve termal kararlılıkları, yüksek mekanik dayanıklılıkları, yüksek enzim yüklenmesi, biyoyumluluğu ve geniş yüzey alanı gibi olağanüstü özelliklerinden dolayı enzim immobilizasyonunda popüler desteklerden biri olmuştur [Ulu vd., 2019b; Habimana vd., 2021]. Bununla birlikte CNT'lerin toksisitesi, endüstriyel uygulamaları açısından endişeye sebep olmakta ve kullanımlarını kısıtlamaktadır. Ancak CNT yüzeylerinin işlevselleştirilmesi yoluyla toksisitenin azaldığı bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda yüzey karboksil grupları ne kadar fazla ise toksisitenin o kadar az olduğu ve toksisitenin işlevselleştirme yoğunluğuna bağlı olduğu gösterilmiştir. Tüm bu

özellikler, immobilizasyon için CNT'lerin etkili bir destek sistemi olduğunu ortaya koymaktadır [Almeida vd., 2021].

CNT'ler açık veya kapalı uçlu bir (tek duvarlı karbon nanotüp, SWCNT) veya daha fazla katmandan (çok duvarlı karbon nanotüp, MWCNT) oluşan kesintisiz silindirlerle birleştirilmiş karbon atomlarından oluşmaktadır [Cristovao vd., 2020]. Enzimlerin CNT üzerine immobilizasyonu, ya zayıf etkileşimler kullanılarak fiziksel adsorpsiyon yoluyla ya da oksitlenmiş CNT'lerin üzerine kovalent immobilizasyon yoluyla gerçekleşmektedir [Almeida vd., 2021]. Enzimlerin CNT'ler üzerine immobilizasyonu; stabiliteyi, raf ömrünü, depolama kararlılığını, seçiciliği ve yeniden kullanılabilirliği geliştirdiği için önemli destek sistemlerinden biri olmuştur [Costa vd., 2018].

Tüm bu özellikler göz önüne alındığında L-asparajinaz enzimi, daha iyi katalitik etkinlik, termal kararlılık ve yeniden kullanılabilirlik için farklı nanomalzemeler üzerine başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. Bu immobilizasyon çalışmalarından bazıları Tablo 2.4'te özetlenmiştir.

Tablo 2.4: L-asparajinazın farklı nanomalzemeler üzerine immobilizasyonu.

L-asparajinaz Kaynağı	Taşıyıcı Matriks	İmmobilizasyon Yöntemi	Referans
<i>E. coli</i> (Sigma-Aldrich)	Manyetik poli (HEMA-GMA) NP	Kovalent İmmobilizasyon	Orhan ve Aktaş Uygun, 2020
<i>E. coli</i> (Medac®, Wedel)	Aspartik asit işlevselli GO nanotabaka	Fiziksel Adsorpsiyon	Monajati vd., 2018
<i>Aspergillus terreus</i>	Altın nanopartikül (AuNP)	Fiziksel Adsorpsiyon	Baskar vd., 2018
<i>E. coli</i> (Sun-pharma.)	Alüminyum oksit nanopartikül (AONP)	Fiziksel Adsorpsiyon	Agrawal ve Kango, 2019
<i>E. coli</i> (ProSpec)	Fe ₃ O ₄ @ altın nanopartikül	Fiziksel Adsorpsiyon	Tarhan vd., 2020
<i>E. coli</i> (Deltaclon S.L.,)	Çok Duvarlı Karbon Nanotüp (MWCNT)	Fiziksel Adsorpsiyon	Cristovao vd., 2020
<i>E. coli</i> (ProSpec)	Kalsiyum-Aljinat/ MWCNT-COOH	Tutuklama	Ulu vd., 2019b
<i>Aspergillus versicolor</i>	Oksitlenmiş MWCNT	Fiziksel Adsorpsiyon	Haroun vd., 2020
<i>E. coli</i> (ProSpec)	Nitrik asit işlevselli MWCNT	Fiziksel Adsorpsiyon	Almeida vd., 2021

2.9.2. İmmobilize L-Asparajinazların Gıda Endüstrisindeki Uygulamaları

L-asparajinaz enzimi; gıda, farmasötik ve biyosensör gibi alanlarda yaygın kullanım potansiyeline sahip olsa da çevresel koşullardan etkilenmesi ve maliyetinin yüksek oluşu gibi kullanımını kısıtlayan bazı dezavantajlara sahiptir. Son yıllarda bu dezavantajların üstesinden gelmek için enzim immobilizasyon teknolojisi geliştirilmiş ve L-asparajinaz enzimi de farklı taşıyıcı matrisler üzerine başarılı bir şekilde immobilize edilmiştir. İmmobilize asparajinazlarla ilgili çoğu çalışma tıbbi uygulamalara odaklanmıştır. Gıda endüstrisinde kullanımıyla ilgili yalnızca birkaç çalışma bulunmaktadır. Bizim de çalışmamızı oluşturan immobilize L-asparajinazın gıda endüstrisinde akrilamid giderimindeki potansiyelini inceleyen çalışmalardan bazıları bu bölümde sunulmuştur.

Ravi ve Gurunathan (2017), yaptıkları çalışmada *Aspergillus terreus* mantarından elde ettikleri L-asparajinaz enzimini glutaraldehit kullanarak kitosan üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Kitosan-immobilize asparajinazın proton nükleer manyetik rezonans spektroskopu ($^1\text{H-NMR}$), taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopu (FTIR) kullanarak enstrümental analizini gerçekleştirdikten sonra akrilamid giderimini belirlemek için hem serbest hem de kitosan-immobilize asparajinaz enzimini kochchi keşel muz dilimlerine ön muamele etmişlerdir. Kochchi keşel muz dilimleri hem serbest hem de immobilize enzim (5U/mL) süspansiyonlarında 60 °C'ta 20 dakika bekletilmiş ardından 180 °C'ta 25 dakika kızartılmıştır. Serbest enzimle karşılaştırıldığında kitosan-immobilize asparajinaz ile muamele edilen kızarmış kochchi keşel'lerin akrilamid miktarının yaklaşık %49 oranında azaldığı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiştir.

Aiswarya ve Baskar (2017), yapmış oldukları çalışmada *Aspergillus terreus* kaynaklı L-asparajinaz enzimini glutaraldehit kullanarak manyetik nanopartikül üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilizasyondan sonra akrilamid giderimi için immobilize asparajinaz enzimini (4U/mL) patates dilimlerine ön muamele ederek 170 °C'ta 15 dakika kızartmışlar ve akrilamid miktarını HPLC ile belirlemişlerdir. Deney sonucunda patates cipsindeki akrilamid miktarının yaklaşık %75 oranında azaldığını göstermişlerdir.

Agrawal vd., (2018), yaptıkları çalışmada L-asparajinazın stabilitesini, aktivitesini artırmak ve patates cipsinde akrilamid miktarını azaltmak için *E. coli* L-asparajinazını çapraz bağlayıcı ajan olan glutaraldehit kullanarak alüminyum oksit peletleri (Alop) üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. FTIR ve SEM analizleri ile enzim immobilizasyonunu doğruladıktan sonra pH ve sıcaklık gibi karakterizasyon deneylerini yapmışlardır. Immobilize enzimin serbest enzime kıyasla daha iyi sıcaklık ve pH kararlılığı gösterdiğini ve dokuz döngü sonunda bile aktivitesinde çok fazla azalma olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca immobilize enzimle muamele edilen patates cipslerindeki L-asparajin seviyesinin azaldığı ince tabaka kromatografisi (TLC) ile gözlemlenmiştir. Akrilamid miktarının ise %80,5 oranında azaldığı rapor edilmiştir. Elde edilen sonuçlar L-asparajinazın alüminyum oksit peletleri üzerine kovalent immobilizasyonunun nişastalı gıdalardaki akrilamid miktarını azaltmada önemli olduğunu göstermektedir.

Alam vd., (2018), yapmış oldukları çalışmada manyetik (demir oksit) nanopartikülleri APTES (3-Aminopropiltrioksilan) ile modifiye ederek L-asparajinaz immobilizasyonu için taşıyıcı matriks olarak kullanmışlardır. *Bacillus aryabhatai*'den elde ettikleri L-asparajinazı glutaraldehit kullanarak APTES ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküller üzerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin enstrümental analizini (SEM, TEM ve FTIR) ve her iki enzimin karakterizasyonunu yaptıktan sonra serbest ve immobilize enzimin nişasta-asparajin gıda modelinde akrilamid giderimini test etmişlerdir. Immobilize enzimin 5 döngüden sonra %90 aktivitesini koruduğunu ve substratına karşı daha iyi afinite gösterdiğini bulmuşlardır. Akrilamid giderimi için hem serbest hem de immobilize asparajinazı (18U) gıda ile 30 dakika muamele etmişler ve 180 °C'ta 5 dakika kızarttıktan sonra akrilamid oluşumunu HPLC ile belirlemişlerdir. Serbest enzimle muamele edilen gıdada akrilamid oluşumu %60 oranında azalırken, immobilize enzim ile muamele edilen gıdada %99 oranında azaldığı belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler immobilize asparajinazın nişasta-asparajin gıda modelinde akrilamid gideriminde etkili bir biyokatalizör olduğunu göstermektedir.

Li vd., (2020), yaptıkları çalışmada gıda alanında güvenli bir taşıyıcı destek olan N-hidroksisüksinimit (NHS) esterleri ile aktive edilmiş doğal polisakkarit agaroz küreleri L-asparajinaz immobilizasyonunda taşıyıcı matriks olarak seçmişler ve

akışkan gıda modelinde akrilamid miktarını azaltmak için kullanmışlardır. Satın aldıkları ticari L-asparajinazı hazırladıkları bu matrikse kovalent olarak immobilize etmişler ve sonrasında immobilize enzimin karakterizasyonunu ve yapısal analizlerini (SEM, FTIR) gerçekleştirmişlerdir. İmmobilize enzimin 6 döngü sonunda aktivitesini %93 koruduğunu ve 28 gün boyunca depolamadan sonra aktivitesini %72 oranında koruduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca immobilize asparajinazın (96U) 0.1 M nişasta ile muamele edilerek 180 °C'ta 10 dakika kızartıldıktan sonra akrilamid oluşumunun %89 oranında azaldığını göstermişlerdir.

Alam vd., (2021), yapmış oldukları çalışmada amin-işlevli silan değiştirici olan APTES'i kullanarak, *E. coli* L-asparajinazını manyetik nanopartikül üzerine immobilize etmişlerdir. Enzimin taşıyıcı matriks üzerine immobilizasyonunu SEM, TEM, FTIR ve XRD kullanarak doğrulamışlardır. Sonrasında serbest ve immobilize enzimin kinetik parametrelerini, termal kararlılıklarını, yeniden kullanılabilirliklerini ve patates cipsinde akrilamid giderimini incelemişlerdir. 12 U serbest ve immobilize enzimi patates ile 20 dakika muamele ettikten sonra 180 °C'ta 5 dakika kızartmışlar ve akrilamid giderimini HPLC ile analiz etmişlerdir. Serbest enzim ile muamele edilen patates cipslerinde akrilamid oluşumu %45 azalırken, immobilize enzim ile muamele edilen patates cipslerinde akrilamid oluşumunun %95'ten fazla azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda immobilize enzimin gıda endüstrisinde akrilamid gideriminde umut verici olduğu düşünülmektedir.

Yassin vd., (2022), yaptıkları çalışmada *Aspergillus fumigatus* mantarından elde ettikleri L-asparajinazı, biyoyumlu dekstran ve kitosan polimerlerine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. FTIR analizi ile immobilizasyon işlemi doğrulandıktan sonra hem serbest hem de immobilize enzimin biyokimyasal özelliklerini ve kinetik parametrelerini belirlemişlerdir. İmmobilize asparajinazın kızarmış patatesteki akrilamid giderimini belirlemek için hem serbest hem de immobilize enzimler patates dilimleri ile 40 °C'ta 1 saat inkübe edildikten sonra 180 °C'ta 5 dakika kızartılmış ve akrilamid içerikleri HPLC ile belirlenmiştir. Serbest enzimle muamele edilen patates cipsinde akrilamid oluşumu %48 azalırken kitosan-immobilize asparajinaz ile muamele edilen patates cipsinde bu oran %87-90 olarak tespit edilmiştir.

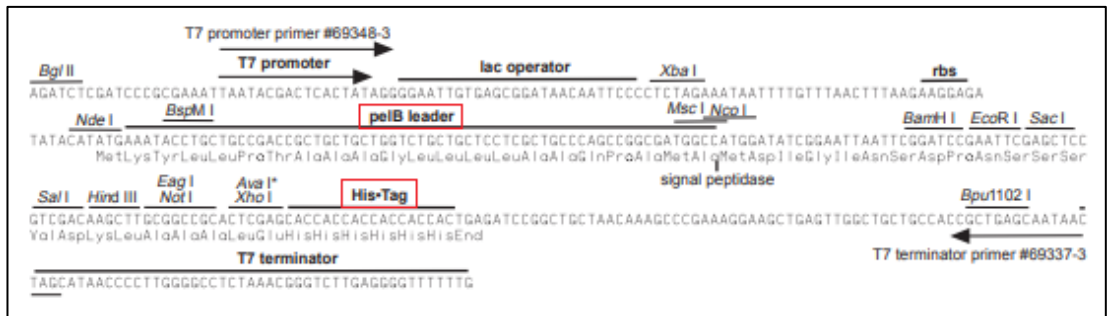
3. MALZEME ve YÖNTEM

3.1. Malzemeler

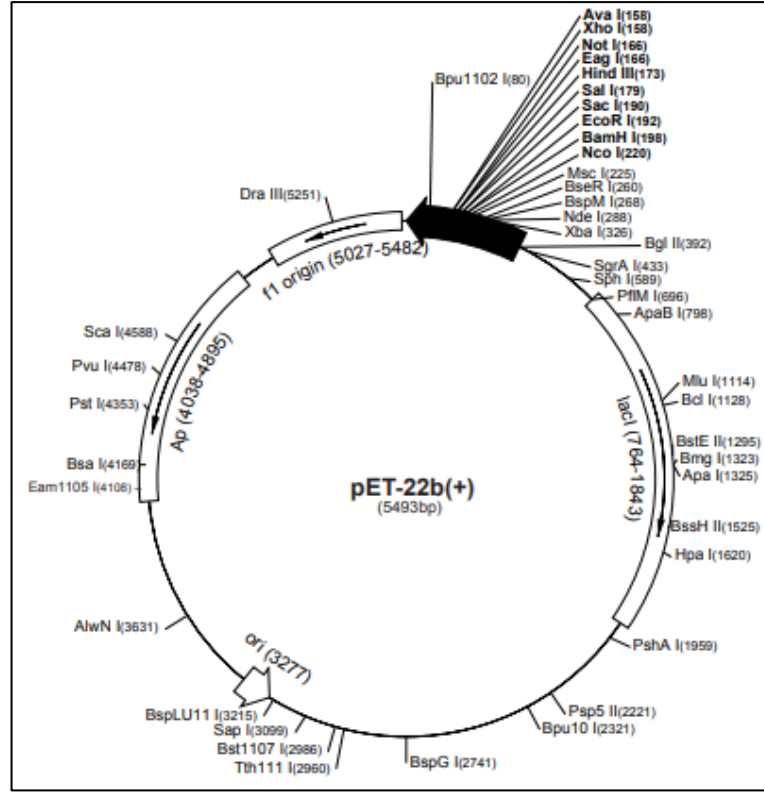
3.1.1. Kullanılan Mikroorganizma Suşu ve Plazmit Vektör

Yüksek miktarda gen ekspresyonu için kullanılan *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücreleri ve rekombinant *Geobacillus kaustophilus* L-asparajinaz (*GkASNaz*) geninin ekspresyonu için kullanılan pET-22b(+) vektörü Novagen, Merck (Cat. No. 69744-3) firmasından temin edilmiştir. pET-22b(+) vektörü, proteinlerin periplazmik bölgeye lokalizasyonunu sağlayan bir N-terminal pelB sinyal dizisine ve proteinlerin saflaştırılmasında kullanılabilir C-terminal His-tag dizisine sahiptir. Vektöre klonlanan genler, T7 promotor bölgesi içerdiğinden dolayı konakçı T7 RNA polimerazları tarafından eksprese edilmektedir (Şekil 3.1 ve 3.2).

pET-22b(+)/*GkASNaz* rekombinant suşu daha önceden laboratuvarımızda elde edilmiştir. *GkASNaz* geni vektörde *Nde*I/*Bam*HI-HF restriksiyon enzim kesim bölgeleri arasına klonlanmıştır.



Şekil 3.1: pET-22b(+) vektörünün klonlama ve ekspresyon bölgesi.



Şekil 3.2: pET-22b(+) vektörünün dairesel haritası.

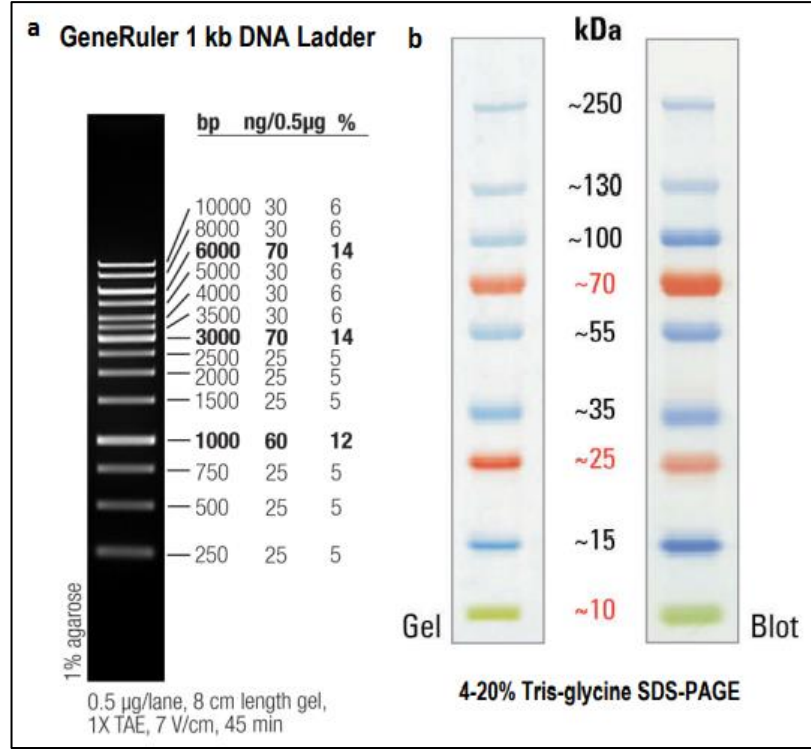
3.1.2. Kullanılan Enzimler ve Kitler

Sonikasyondan önce hücreleri parçalamak için kullanılan Lizozim enzimi Thermo Scientific™ (Waltham, Massachusetts) firmasından, *Bam*HI-HF Restriksiyon Endonükleaz, *Nde*I Restriksiyon Endonükleaz ve 10X CutSmart tampon NEB, BioLabs (USA) firmasından temin edilmiştir.

Plazmit izolasyonu için kullanılan (Monarch® Plasmid Miniprep Kit) NEB, BioLabs (USA) firmasından, BCA yöntemi ile protein miktar tayin kiti (Pierce™ BCA Protein Assay Kit) Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan DNA ve Protein Moleküler Belirteçleri

Agaroz jel elektroforezi görüntüleri için GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) ve SDS-PAGE görüntüleri için PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Scientific, USA) moleküler belirteçleri kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Kullanılan moleküler belirteçler. a) Moleküler DNA belirteci (Thermo Scientific, 1 kb DNA Ladder); b) protein moleküler belirteci (Thermo Scientific).

3.1.4. Safılaştırmada Kullanılan Malzemeler

Proteini saflaştırmak için HisTrap™ FF, 5 mL (GE Healthcare Biosciences) kolonu kullanılmıştır. HisTrap™ FF kolonu, Ni²⁺ metal iyonlarını içermektedir. Böylece saflaştırılacak rekombinant proteinde bulunan histidin aminoasitlerine kovalent olarak bağlanarak bu proteinlerin kolona tutunmasını sağlamaktadır.

Safılaştırma sonrasında tampon değişimi için kullanılan (10 kDa Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit), Merck firmasından temin edilmiştir.

3.1.5. Kullanılan Besiyerleri

Bu çalışmada kullanılan besiyerleri ve içerikleri Tablo 3.1’de listelenmiştir. Tüm besiyerleri kullanımdan önce 121 °C’ta 20 dakika boyunca otoklav ile sterilize edilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.

Besiyeri	İçerik
Luria-Bertani (LB) Broth (pH 7.5)	5 g maya özütü, 10 g tripton ve 10 g NaCl karıştırılarak distile su ile 1 L'ye tamamlanır.
Luria-Bertani (LB) Agar (pH 7.5)	LB sıvı besiyerine %1,5 oranında agar eklenerek hazırlanır.
SOB Besiyeri	%2 tripton, %0,5 maya özütü, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ ve 10 mM MgSO ₄ karıştırılarak distile su ile 1 L'ye tamamlanır.
SOC Besiyeri	SOB besiyerine son konsantrasyonu 20 mM olacak şekilde filtre ile sterilize edilmiş glikoz eklenerek hazırlanır.
TSS Tamponu	%10 Polietilen glikol (PEG) 6000 g/mol, %5 DMSO ve 50 mM MgCl ₂ karıştırılarak LB sıvı besiyeri ile 50 mL'ye tamamlanır.

3.1.6. Kullanılan Solüsyonlar ve Tamponlar

Tez çalışmasında kullanılan solüsyon ve tamponların içerikleri Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan solüsyon ve tamponlar.

Protein Saflaştırmada Kullanılan Solüsyonlar		
Lizis Tamponu (pH 8.0)	Bağlanma Tamponu (pH 7.4)	Elüsyon Tamponu (pH 7.4)
NaH ₂ PO ₄ 20 mM	NaH ₂ PO ₄ tamponu 20 mM	NaH ₂ PO ₄ tamponu 20 mM
NaCl 500 mM	İmidazol 20 mM	İmidazol 500 mM
İmidazol 5 mM	NaCl 0.5 M	NaCl 0.5 M
Agaroz Jel Elektrofrezisi İçin Kullanılan Solüsyonlar		
50X TAE Tamponu (200 mL)	%0,8'lik Agaroz Jel (40 mL)	
Tris 48,4 g	Agaroz 0,32 g	
Glasiyal Asetik Asit 11,42 mL	1X TAE tamponu 40 mL	
0,5 M EDTA (pH 8.0) 20 mL	RedSafe 3 µL	

Tablo 3.2: Devam.

SDS-PAGE İçin Kullanılan Solüsyonlar		
10X SDS Yürütme Tamponu (1 L)		4X Örnek Tamponu (10 mL)
Tris 30,3 g		1 M Tris-HCl (pH 6.8) 2 mL
Glisin 144,4 g		SDS 0,8 g
SDS 10 g		%100 Gliserol 4 mL
		14,7 M β -merkaptoetanol 0,4 mL
		0,5 M EDTA 1 mL
		1,194 M Bromofenol mavisi 8 mg
Coomassie Blue Boyama Solüsyonu (1 L)		Boya Uzaklaştırma Solüsyonu (1 L)
Coomassie Brilliant Blue R250 1 g		Metanol 50 mL
Metanol 450 mL		Asetik asit 70 mL
Glasiyal Asetik Asit 100 mL		Distile su 880 mL
%12'lik SDS-PAGE		
Ayırma Jeli (Alt Jel)		Yükleme Jeli (Üst Jel)
Distile su 3,2 mL		Distile su 2,975 mL
%30 Akrilamid 4 mL		%30 Akrilamid 0,67 mL
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2,6 mL		0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0,625 mL
%10 SDS 100 μ L		%10 SDS 50 μ L
%10 APS 100 μ L		%10 APS 50 μ L
TEMED 10 μ L		TEMED 5 μ L
Asparajinaz Aktivite Tayini İçin Kullanılan Solüsyonlar		
50 mM Tris-HCl (pH 8.5)	40 mM L-asparajin Solüsyonu	1.5 M TCA Solüsyonu
0,605 g Tris	0,05 g L-asparajin	2,45 g TCA
100 mL distile su	10 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)	10 mL distile su
Stok Ampisilin (100 mg/mL, 10 mL)		Stok IPTG (0.5 M, 5 mL)
1 g ampisilin 10 mL distile su ile çözülür.		0,59 g IPTG 5 mL distile su ile çözülür.
0,22 μ M'lik filtre ile sterilize edilir.		0,22 μ M'lik filtre ile sterilize edilir.

3.1.7. Kullanılan Kimyasallar

Nessler ayırıcı, agaroz, sodyum dodesil sülfat (SDS), β -merkaptoetanol, sodyum klorür (NaCl), magnezyum klorür ($MgCl_2$), sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), polietilen glikol (PEG), Coomassie Brilliant Blue-R250, 2-propanol, etanol, metanol ve asetik asit kimyasalları Merck (Germany) firmasından; RedSafe (Intron) Fisher Bioreagents (USA) firmasından; agar, tripton ve yeast extract Biolife (Italiana) firmasından; IPTG, Ampisilin ve lizozim neoFroxx (GmbH) firmasından; amonyum persülfat (APS), glisin, TEMED, EDTA ve Bis-akrilamid AppliChem (Germany) firmasından; DMSO, gliserol, potasyum klorür (KCl) ve sodyum fosfat (NaH_2PO_4) Riedel-de-Haen (Germany) firmasından; Imidazol, tris, bovine serum albümin (BSA), bromofenolblue, akrilamid, glikoz, trikloroasetik asit (TCA) ve L-asparajin kimyasalları Sigma-Aldrich (USA) firmasından; MWCNT-OH destek sistemi Nanografi (Türkiye) firmasından temin edilmiştir.

3.1.8. Kullanılan Cihazlar

+4 °C ve -20 °C buzdolabı (Arçelik), -80 °C derin dondurucu (Thermo, Forma-86 °C ULT Freezer), steril kabin (Heraeus, HP48), masa üstü santrifüj (VWR, Microsent 17R), çalkalayıcı inkübatör (New Brunswick Scientific Innova®40 Incubator Shaker Series), manyetik karıştırıcı (Heidolph MR Hei-Standard), ultrasantrifüj (Beckman Coulter® Optima™ Max-XP Ultracentrifuge), sonikatör (Branson 450 Digital Sonifier® Cell Disruptor), spektrometre (SHIMADZU UV-1280 UV-VIS Spectrometer), güç kaynağı (BIO-RAD, PowerPac Basic), otoklav (HIRAYAMA, HICLA HVE-50), dikey elektroforez sistemi (Bio-Rad Mini-Slab Cell CT), UV görüntüleme cihazı (Azure Biosystems, Gel Imaging System c600), pH metre (Hana Instruments, pH 211 Microprocessor pH Meter), su banyosu (TECHNE, TE-10A Tempette), buz makinası (BAR-LINE BF85), floresan spektrometre (FLUOstar Omega, BMG Labtech), mikrodalga fırın (Samsung), bloklı ısıtıcı (WiseTherm), AKTA Prime Plus Purification system (Cytiva Life Science, GE Healthcare), HPLC (SHIMADZU Prominence HPLC UFLC

20), taramalı elektron mikroskobu (SEM, Philips XL30 SFEG), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR).

3.2. Yöntemler

Daha önceden laboratuvarımızda *Geobacillus kaustophilus* L-asparajinaz tip II geni (*GkASNazII*), pET-22b(+) vektörüne klonlanmış ve *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) ekspresyon hücrelerine transforme edilmiştir. Bu tez çalışmasında *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) ekspresyon hücreleri, yeniden asparajinaz genini içeren pET-22b(+)/*GkASNazII* ve geni içermeyen pET-22b(+) vektörleri ile transforme edilmiştir. Geni içermeyen pET-22b(+) vektörü, asparajinaz ekspresyonunda kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

3.2.1. Kompetan *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetan *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinin hazırlanmasında Chung ve ark. (1993) tarafından tarif edilen TSS tamponu ile kompetan hücre hazırlama yöntemi kullanılmıştır. Taze katı besiyerinden alınan *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücreleri 1 mL Luria-Bertani (LB) sıvı besiyerine ekilerek 1 gece boyunca 37 °C'ta 200 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün bu kültürden 100 µL alınarak 10 mL LB sıvı besiyerine ekim yapılmış ve optik yoğunluğu (OD) 600 nm dalga boyunda 0.4'e gelene kadar 37 °C'ta inkübe edilmiştir. Kültür, istenilen yoğunluğa ulaştıktan sonra +4 °C'ta 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Hücre peletine, son kültür hacminin %10'u kadar TSS tamponu eklenmiş ve buz içerisinde yavaşça çözdürülmüştür. Hazırlanan kompetan hücreler daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'ta saklanmıştır.

3.2.2. pET-22b(+)/*GkASNaz* ve pET-22b(+) Vektörlerinin Kompetan *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) Hücrelerine Transformasyonu

2 µL pET-22b(+)/*GkASNaz* ve pET-22b(+) vektörü, taze hazırlanmış 50 µL *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) kompetan hücrelerine eklenerek hafifçe karıştırılmış ve buz içerisinde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 42 °C'ta 45 saniye ısı şoku

uygulanmış ve ardından buz üzerinde 2 dakika bekletilmiştir. Isı şokundan sonra hücrelerin üzerine 950 µL SOC besiyeri eklenerek 80 dakika boyunca 37 °C'ta, 150 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler 3000 g'de 2 dakika çöktürülerek süpernatantın bir kısmı atılmıştır. Kalan besiyeri ile hücreler çözdürüldükten sonra 100 µg/mL ampisilin içeren katı LB besiyerine ekilmiş ve 37 °C'ta 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün oluşan rekombinant koloniler yeni katı LB besiyerine (100 µg/mL Amp) ekilerek saf kültür elde edilmiştir. pET-22b(+)/GkASNaz ve pET-22b(+) vektörlerini içeren kolonileri doğrulamak için bu kültürlerden plazmit izolasyonu yapılmış ve elde edilen plazmitler, uygun restriksiyon endonükleazları ile kesilmiştir.

3.2.3. Plazmit İzolasyonu

pET-22b(+)/GkASNaz ve pET-22b(+) plazmitini taşıyan rekombinant kolonilerden plazmit DNA izolasyonu, kit (Monarch® Plasmid Miniprep Kit, BioLabs) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen plazmitler, *Bam*HI-HF ve *Nde*I restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir.

3.2.4. pET-22b(+)/GkASNaz ve pET-22b(+) Plazmitlerinin Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi

İzole edilen plazmitlerin doğruluğunu kanıtlamak için hem tek (*Bam*HI-HF) hem de çift (*Bam*HI-HF ve *Nde*I) restriksiyon endonükleazları ile kesim reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Tek kesim için 2 µL plazmit DNA, 10X CutSmart tampon (NEB, BioLabs), 20U *Bam*HI-HF (NEB, BioLabs) endonükleaz içeren 10 µL'lik reaksiyon karışımı 37 °C'ta 1 saat inkübe edilmiştir. Çift kesim için 2 µL pET-22b(+)/GkASNaz plazmiti, 10X CutSmart tampon (NEB, BioLabs), 20U *Bam*HI-HF ve 20U *Nde*I (NEB, BioLabs) endonükleazlarını içeren 10 µL'lik reaksiyon karışımı 37 °C'ta 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra enzim kesimleri %0,8'lik agaroz jel elektroforezine moleküler DNA belirteci ile yüklenmiştir. Restriksiyon kesimleri ile geni içeren (pET-22b(+)/GkASNaz) ve içermeyen plazmitler doğrulandıktan sonra ekspresyon ve saflaştırma çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Restriksiyon enzim kesimi uygulanan plazmitler, 6X DNA yükleme boyası ile karıştırılarak 3 µL RedSafe (Intron) içeren 40 mL %0,8'lik agaroz jele yüklenmiş ve 1X TAE tamponu içerisinde 90 Volt'ta 45 dakika boyunca yürütülerek moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır. Jel görüntülemek için Azure biosystem c600 görüntüleme cihazı kullanılmıştır. DNA belirteci olarak 1 kb DNA Marker (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır.

3.2.6. Asparajinaz Enziminin Ekspresyonu

L-asparajinaz enzimini kodlayan geni yüksek miktarda eksprese edebilmek için rekombinant pET-22b(+)/GkASNaz plazmitini içeren *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücreleri 100 µg/mL ampisilin içeren katı LB besiyerine ekilmiş ve 37 °C'ta bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün katı besiyerinden alınan rekombinant koloniler sıvı LB besiyerine (100 µg/mL ampisilin) ekilerek 16 saat boyunca 37 °C'ta, 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerinde inkübasyondan sonra 1:100 oranında taze LB besiyerine ekilen ikincil kültürler OD₆₀₀ değeri 0.5-0.6'ya gelene kadar 37 °C'ta büyümeye bırakılmışlardır. İstenen OD değerine ulaşan kültürler, son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde izopropil-1-thio-β-D-galaktozit (PTG) ile uyarılarak 4 saat 37 °C'ta büyütülmüştür. IPTG ile uyarılmadan önce ve uyarıldıktan sonra 2. ve 4. saatlerde kültürlerden örnekler alınmıştır. 4. saatin sonunda hücre kültürleri toplanarak +4 °C'ta, 4000 rpm'de, 30 dakika santrifüj ile çöktürülmüştür. Hücre peletleri saflaştırma yapılına kadar -20 °C'ta saklanmıştır.

Kontrol grubu olarak, hem GkASNaz genini içermeyen pET-22b(+) plazmiti ile transforme edilmiş *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücreleri (Yöntem 3.2.2) hem de plazmit taşımayan boş *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücreleri kullanılmıştır. Tüm kültürler benzer şekilde 1 mM IPTG ile uyarılarak 4 saat 37 °C'ta büyütülmüştür. Kültürlerin IPTG ile uyarım öncesi ve sonrasındaki ekspresyon profilleri %12'lik sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile görüntülenmiştir.

3.2.7. Asparajinaz Enziminin Saflaştırılması

Saflaştırma öncesi hücre peletleri buz içerisinde alınarak gram başına 4 mL olacak şekilde liziz tamponu (pH 8.0; 5 mM imidazol, 500 mM NaCl ve 20 mM Sodyum fosfat tamponu) ile çözündürülmüştür. Hücre çözeltisine 1 mg/mL lizozim enzimi eklenerek buz içerisinde 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler, buz içerisinde 20 saniye atış - 10 saniye bekleme olacak şekilde 4 dakika boyunca sonikasyona tabii tutularak parçalanmıştır. Elde edilen homojenat, +4 °C'ta, 10 000 rpm'de, 1 saat santrifüj edilerek hücre kalıntılarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Rekombinant proteinin olduğu düşünülen sıvı üst faz -20 °C'ta saflaştırma yapılarına kadar saklanmıştır. Ayrıca 6xHis-GkASNaz proteinlerini içeren hücre özütleri SDS-PAGE ile görüntülenmiştir.

C-terminalinde 6xHis kuyruğu içeren GkASNaz proteinleri, hücre özütünden HisTrapFF™ (5 mL) kolonu kullanılarak bir immobilize metal afinite kromatografi (IMAC) yöntemi olan Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır (AKTA Prime Plus Purification sistem). Sistem, sırasıyla 5 kolon hacminde %20 etanol ve ultra saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kolon, 5 kolon hacminde 5 mL/min akış hızında, 20 mM imidazol içeren bağlanma tamponu (pH 7.4) ile dengeye getirilmiştir. Ardından 0.45 µM'lik filtreden geçirilen protein örneği kolona yüklenmiştir. Bağlanmayan proteinleri uzaklaştırmak için kolon, 5 kolon hacminde bağlanma tamponu ile yıkanmıştır. Spesifik olarak kolona bağlanan 6xHis-GkASNaz proteinleri ise 500 mM imidazol içeren elüsyon tamponu (pH 7.4) ile kolondan ayrıştırılarak 1 mL'lik elüsyon fraksiyonları halinde toplanmıştır. Toplanan elüsyon fraksiyonları %12'lik SDS-PAGE ile analiz edildikten sonra ilgili proteinin olduğu elüsyonlar bir araya getirilmiştir.

Elüsyon tamponunun içerdiği fosfat, enzimin aktivitesini negatif etkileyebileceğinden dolayı elüsyon hacminin 3 katı kadar 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) tamponu ile 10 000 MWCO'luk ultrafiltrasyon falkonu (10 kDa Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Merck) kullanılarak +4 °C'ta tampon değişimi yapılmış ve protein konsantre edilmiştir. Protein konsantrasyonu BCA kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.8. SDS-PAGE Analizi

SDS poliakrilamid jel elektroforezi, proteinleri moleküler büyüklüklerine göre ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. %0,1'lik anyonik deterjan (SDS) varlığında %12'lik ayırma ve %5'lik yükleme jeli hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Dikey jel elektroforezi için Bio-Rad Mini-Slab Cell CT (Bio-Rad Laboratories, USA) sistemi kullanılmıştır.

15 µL protein örnekleri, 5 µL 4X örnek tamponu ile karıştırılmış ve proteinlerin denaturasyonu için 95 °C sıcaklıktaki su banyosunda 5 dakika bekletilmiştir. Ardından örnekler, protein moleküler ağırlık belirteci (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa) ile birlikte jele yüklenerek 1X SDS-PAGE yürütme tamponu içerisinde 95 Volt'ta yürütülmüştür. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, Coomassie Brilliant Blue-R250 ile 30 dakika boyanmıştır. Ardından boya uzaklaştırma solüsyonu ile 2-3 kez yıkanarak boyadan arındırılmıştır. Elde edilen protein bantlarının büyüklükleri, moleküler ağırlık belirtecinde ağırlığı bilinen protein bantları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

3.2.9. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Safılaştırılan ve konsantre edilen enzimlerin miktarı, BCA (Bikinkoninik asit) yöntemi ile Pierce™ BCA Protein Assay Kiti kullanılarak belirlenmiştir. 96 kuyulu mikropate tabakasına 10 µL protein örneklerinden konularak üzerlerine 200 µL taze hazırlanmış BCA solüsyonundan (50:1 A solüsyonu:B solüsyonu) eklenmiştir. Standart olarak 25-2000 µg/mL aralığında, değişen konsantrasyonlarda hazırlanan sığır serum albümini (BSA) kullanılmıştır. Örnekler 37 °C'ta 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbansları eliza okuyucuda (FLUOstar Omega, BMG Labtech) 562 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Her bir örnekteki protein konsantrasyonu, hazırlanan BSA standart eğrisine göre hesaplanmıştır.

3.2.10. Safılaştırılan Asparajinaz Enziminin Karbon Nanotüp Üzerine Kovalent İmmobilizasyonu

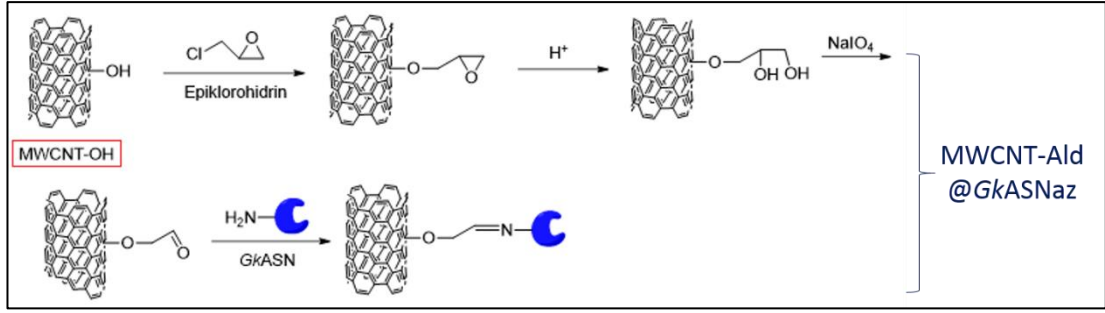
3.2.10.1. İmmobilizasyon İçin Karbon Nanotüplerin Hazırlanması

GkASNaz enziminin MWCNT üzerine immobilizasyonu, Çukurova Üniversitesi Kimya Bölümü'nden Prof. Dr. Deniz Yıldırım ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiştir. Ticari olarak satın alınan MWCNT-OH destek sistemi, yüzeyinde farklı uzunlukta aldehit grupları oluşturmak için aşığıdaki işleme tabii tutularak enzimin kovalent immobilizasyonu için hazır hale getirilmiştir.

1 gram MWCNT-OH desteğinin üzerine 0,34 g NaBH₄ içeren 10 mL 1.7 M NaOH özeltisi eklenmiş ve hazırlanan çözelti buz üzerinde soğutulduktan sonra üzerine 3.6 mL epiklorohidrin damla damla ilave edilmiştir. Karışım 24 saat karıştırıldıktan sonra destek, süzgeç kâğıdından süzülerek saf su ile yıkanmıştır. Elde edilen destek oda sıcaklığında kurutulduktan sonra destek üzerinde aldehit grupları elde etmek için 1 gram destek materyaline, 10 mL 1M asetik asit çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 12 saat karıştırılmıştır. Süzgeç kâğıdından süzölüp oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 1 gram destek materyali üzerine saf su içerisinde hazırlanmış 25 mL sodyum metaperiyodat eklenmiş ve 2 saat karıştırılmıştır. Süzgeç kâğıdından süzöldükten sonra elde edilen destek kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.2.10.2. İmmobilizasyon İşlemi

Destek materyali hazırlandıktan sonra *GkASNaz*'ın immobilizasyonu Alagöz ve ark. (2021) tarafından bildirilen yöntemine göre gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan 1 gram destek materyaline farklı derişimlerde *GkASNaz* içeren (0.1-1 mg protein/mL) 4 mL fosfat tamponu (25 mM, pH 7,0) ilave edilerek karışım oda sıcaklığında 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra immobilize *GkASNaz* örneği süzülerek saf su ile yıkanmıştır. Toplanan süpernatant, protein analizi için kullanılmıştır. *GkASNaz* enziminin immobilizasyonu için elde edilen destek ve immobilizasyon işlemi Şekil 3.4'te şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.4: *GkASNaz* immobilizasyonunun şematik gösterimi.

3.2.11. İmmobilize Enzimin Enstrümental Analizi

3.2.11.1. SEM, SEM-EDS Analizi

GkASNaz enzimi destek materyali üzerine immobilize edildikten sonra taşıyıcı matriksin şeklini, boyutunu ve yüzey morfolojisinde meydana gelen değişiklikleri analiz etmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM, Philips XL30 SFEG) kullanılmıştır. SEM 15 kV'ta çalıştırılmış ve örneklerin görüntüleri farklı büyütmelerde (500x-50000x) alınarak kaydedilmiştir. Ayrıca bir enerji dağıtıcı X-ışını spektrometre modülü (SEM-EDS) ile immobilizasyondan önce ve sonra taşıyıcı matriksin elementel bileşimleri test edilerek *GkASNaz* immobilizasyonu kanıtlanmıştır.

3.2.11.2. FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) Analizi

Serbest ve immobilize *GkASNaz* örneklerinin karakteristik gruplarını belirlemek ve *GkASNaz* immobilizasyonunu doğrulamak için FT-IR analizi yapılmıştır. Örneklerin kızılötesi spektrumları, bir Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR spektrometresi kullanılarak oda sıcaklığında, 4000-500 cm⁻¹ aralığında taranarak belirlenmiştir.

3.2.12. Serbest ve İmmobilize L-Asparajinazın Aktivite Tayini

L-asparajinaz enziminin aktivitesi Nessler reaksiyonu ile ölçülmüştür. Nesslerizasyon olarak adlandırılan bu yöntem ile L-asparajinaz enziminin, substratı (L-asparajin) hidroliz etmesi sonucu açığa çıkan amonyak miktarı tayin edilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 400 µL olacak şekilde 2,5 µL serbest enzim veya 5 mg immobilize enzim, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) tamponu içerisinde 5 mM L-asparajin substratı eklenerek 55 °C'ta 10 dakika reaksiyonun gerçekleşmesi için inkübe edilmiştir. Ardından reaksiyonlar 150 µL, 1.5 M trikloroasetik asit (TCA) eklenerek durdurulmuş ve proteinlerin çökmesi için 12 000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen berrak süpernatant, Nessler reaksiyonu için kullanılmıştır. Nessler reaksiyonu için; 1400 µL distile su, 150 µL süpernatant, 200 µL Nessler reaktifi cam tüplerde karıştırılarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra açığa çıkan amonyak miktarı UV spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda blank'a karşı okunarak ölçülmüştür. Amonyak konsantrasyonu, hazırlanan amonyum sülfat standart eğrisine göre hesaplanmıştır.

Bir ünite (U), yukarıda belirtilen koşullar altında, dakikada 1 µmol amonyak açığa çıkaran L-asparajinaz aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Enzimin aktivitesi, formül 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Enzim\ Aktivitesi\ (unit/\mu l) = \frac{[NH_3\ (\mu M) \times reaksiyon\ hacmi\ (\mu l)]}{[supernatant\ hacmi\ (\mu l) \times reaksiyon\ süresi\ (dk) \times enzim\ miktarı\ (\mu l)]} \quad (3.1)$$

3.2.13. Serbest ve İmmobilize Enzimin Karakterizasyonu

Enstrümental analizler ile *GkASNaz* enziminin immobilizasyonu doğrulandıktan sonra hem serbest hem de immobilize enzimin karakterizasyon deneyleri yapılmış ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Tüm deneylerde asparajinaz aktivitesi sonucu açığa çıkan amonyak miktarı, Nesslerizasyon reaksiyonu ile ölçülmüştür. Karakterizasyon çalışmalarında her bir deney en az üç kez tekrarlanmış ve sonuçlar üçlü ölçümlerin ortalaması alınarak ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

3.2.13.1. pH'in Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Serbest ve immobilize *GkASNaz* aktivitesi üzerine pH'in etkisi, 50 mM sodyum fosfat tamponu (pH 5.0-5.5-6.0-6.5-7.0), 50 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.5-8.0-8.5-9.0) ve 50 mM glisin tamponu (pH 9.5-10.0) içerisinde 55 °C'ta, 5 mM L-asparajin substratı kullanılarak ayrı ayrı incelenmiştir. Maksimum aktivite %100 olarak kabul edilmiş ve enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri değer, optimum pH değeri olarak belirlenmiştir.

3.2.13.2. Sıcaklığın Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

Sıcaklığın serbest ve immobilize enzim aktivitesi üzerine etkisi, belirlenen optimum pH'ta, 5 mM L-asparajin substratı kullanılarak, 35-85 °C aralığındaki artan sıcaklıklarda enzim aktiviteleri ölçülerek incelenmiştir. Maksimum aktivite %100 olarak kabul edilmiş ve enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri değer, optimum sıcaklık değeri olarak belirlenmiştir.

3.2.13.3. Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize asparajinaz örneklerinin kinetik parametreleri, optimum pH ve sıcaklıkta L-asparajinin farklı konsantrasyonları (0.5-10 mM) kullanılarak belirlenmiştir. Her bir reaksiyonda enzimlerin aktivitesi Nessler reaksiyonu ile ölçülmüş ve belirlenen aktivite değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir. Michaelis-Menten sabitleri (K_m) ve maksimum aktiviteleri (V_{max}) denklem 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (3.2)$$

Enzimin katalitik etkinliği (k_{cat}) ise denklem 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$k_{cat} = V_{max} \times [E_T] \quad (3.3)$$

3.2.13.4. Termal Kararlılığın Belirlenmesi

Serbest ve immobilize *GkASNaz* enzimlerinin termal kararlılıkları, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) tamponu içerisinde farklı zaman aralıklarında (0-24 saat) en yüksek aktivite gösterdikleri sıcaklıkta (serbest enzim 55 °C; immobilize enzim 65 °C) inkübe edilerek belirlenmiştir. Belirtilen zaman aralıklarında 5mM substrat eklenerek enzim aktiviteleri ölçülmüş ve sıfır zamandaki aktiviteleri %100 olarak kabul edilerek kalan aktiviteleri sırasıyla belirlenmiştir. Enzim örneklerinin birinci dereceden inaktivasyon sabitleri (k_d) ve yarı ömür ($t_{1/2}$) gibi termal kararlılık parametreleri, Alagöz ve ark. (2021) referans alınarak sırasıyla aşağıdaki formüllere (3.4 ve 3.5) göre hesaplanmıştır. 55 ve 65 °C'teki stabilizasyon faktörleri (SF) ise immobilize asparajinazın yarı ömrünün aynı sıcaklıktaki serbest enzimin yarı ömrüne bölünmesi ile hesaplanmıştır.

$$\ln A_t = \ln A_o - k_d \times t \quad (3.4)$$

A_o ve A_t ifadeleri sırasıyla başlangıç aktivitesini ve belirli bir zaman sonra kalan aktiviteleri temsil etmektedir.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (3.5)$$

$\ln(2)$ ifadesi başlangıç aktivitenin %50'sini ifade etmektedir.

3.2.13.5. Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

Enzimlerin depolanması, endüstriyel uygulamalar için önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle depolama kararlılığını belirlemek için serbest ve immobilize *GkASNaz* enzimlerinin aktiviteleri +4 °C ve oda sıcaklığı olmak üzere iki farklı sıcaklıkta, 5 gün aralıklarla 30 gün boyunca ölçülerek incelenmiştir. Başlangıç aktiviteleri %100 olarak kabul edilmiştir.

3.2.13.6. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

İmmobilize *GkASNaz* enziminin yeniden kullanım kararlılığı, maksimum aktivite gösterdiği 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) tamponunda ve 65 °C'ta kesikli reaktör içerisinde gerçekleştirilmiştir. Belirlenen miktarda immobilize enzim kolona yüklenerek üzerine substrat ilave edilmiş ve bir süre sonra immobilize *GkASNaz* kolondan ayrılarak aktivitesi ölçülmüştür. Her tekrar eden döngüden sonra immobilize enzim, saf su ile yıkanmış ve taze substrat çözeltisi eklenmiştir. Bu işlem 20 kez tekrarlanmış ve ilk kullanım sonunda enzimin aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir.

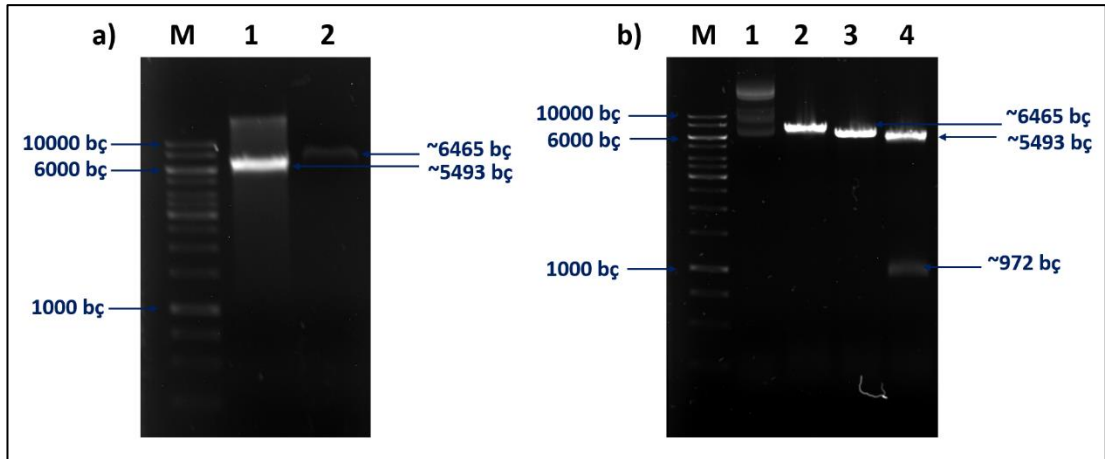
3.2.14. Akrlamid Giderim Potansiyelinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize *GkASNaz* enzimlerinin nişasta üzerindeki akrilamid giderim potansiyelleri HPLC ile belirlenmiştir. Akrlamid giderimi için, 1 mL L-asparajin (%2 (w/v)) ve 1 mL nişasta (%2 (w/v)) enzim reaksiyon karışımına eklenmiş ve 60 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyonun sonunda bu karışımdan 0.5 mL süpernatant alınarak yağ banyosunda 180 °C'ta 5 dakika ısıtılmıştır. Soğutulduktan sonra karışımın akrilamid içeriği, C-18 kolonu ve Diode Array dedektörü kullanılarak 205 nm'de HPLC ile belirlenmiştir. Hareketli faz olarak su/asetonitril (90/10, v/v) karışımı kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. *GkASNaz* Genini İçeren ve İçermeyen pET-22b(+) Vektörlerinin Transformasyonu ve Doğrulanması

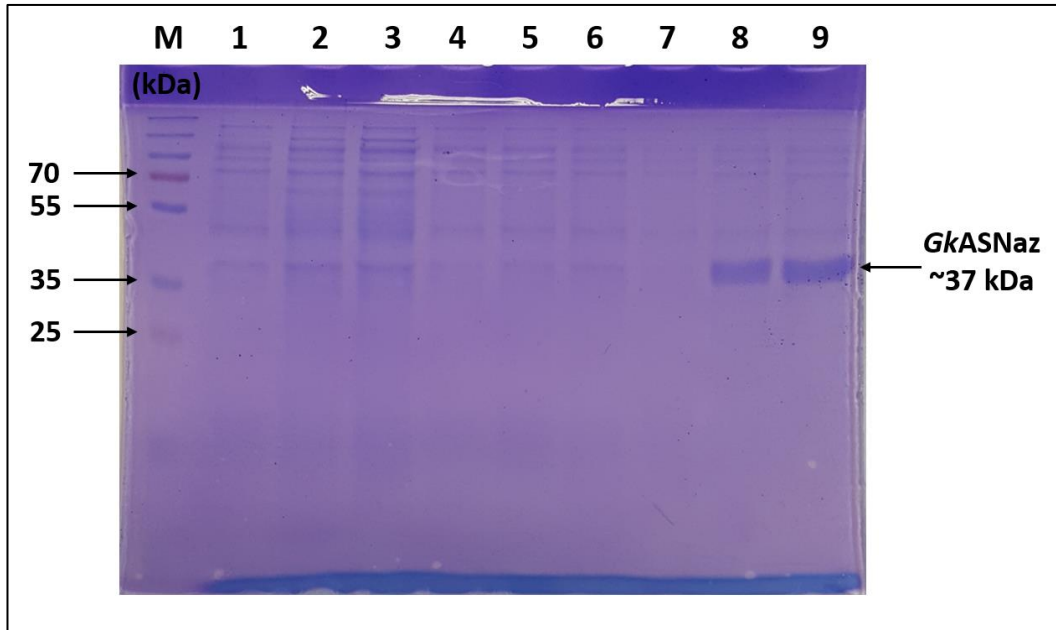
pET-22b(+) ve pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitleri kompetan *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) ekspresyon hücrelerine ısı şoku yöntemi ile transforme edilmiştir. Transformasyonun sonunda hücreler ampisilinli LB agar besiyerine ekilmiş ve 37 °C'ta bir gece boyunca büyümeye bırakılmıştır. Ertesi gün petrilerde oluşan kolonilerin plazmitleri içerip içermediğini doğrulamak için plazmit DNA izolasyonu yapılmış ve *Bam*HI-HF restriksiyon endonükleazı ile tek kesim reaksiyonu kurulmuştur. *Bam*HI-HF restriksiyon endonükleazı ile doğrusal hale getirilen plazmitler, %0,8'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Şekil 4.1 a'da görüldüğü gibi sırasıyla pET-22b(+) ve pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitlerinin *Bam*HI-HF restriksiyon endonükleazı ile tek kesim reaksiyonu sonucu beklenen büyüklüklerde (~5493 bç ve ~6465 bç) fragmanlar gözlemlenmiştir. Ayrıca pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitinin *Bam*HI-HF ve *Nde*I restriksiyon endonükleazları ile çift kesim reaksiyonu sonucu beklenen büyüklükte (~972 bç) *GkASNaz* fragmanı Şekil 4.1 b'de gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1: Tek ve çift restriksiyon endonükleaz kesim analizi. a) 1: pET-22b(+) plazmitinin, 2: pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitinin *Bam*HI-HF ile tek kesimi, b) 1: Kesilmemiş plazmit, 2: *Bam*HI-HF, 3: *Nde*I ile pET-22b(+)/*GkASNaz*'ın tek kesimi, 4: pET-22b(+)/*GkASNaz*'ın *Bam*HI-HF ve *Nde*I ile çift kesimi, M: DNA belirteci.

4.2. *GkASNaz* Enzimini Kodlayan Genin Ekspresyonu

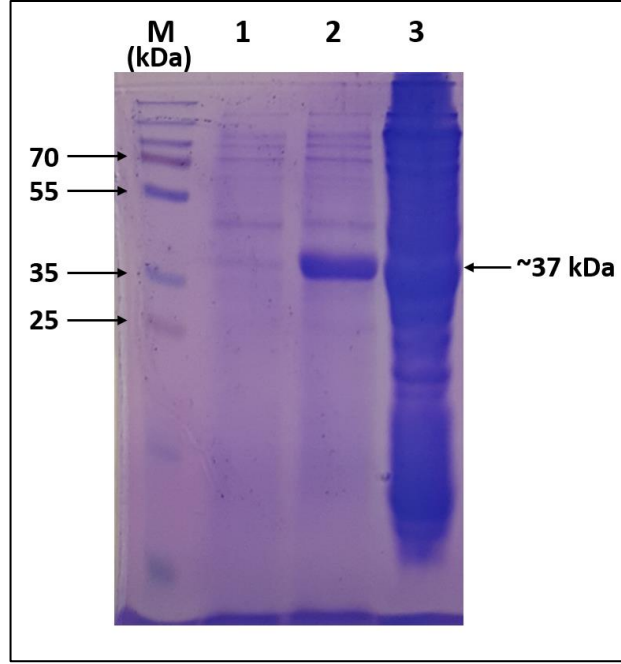
L-asparajinaz enzimini kodlayan genin ekspresyonu için rekombinant pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitini taşıyan *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücreleri 100 µg/mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde büyütülmüş ve optik yoğunlukları 0.6'ya geldiği zaman IPTG ile uyarılmıştır. Hücreler IPTG ile uyarıldıktan sonra 2. ve 4. saatlerde örnekler alınmıştır. Hücrelerin IPTG ile uyarımı öncesi ve sonrası protein ekspresyon profili, gen taşımayan kontrol grubu ile birlikte SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Şekil 4.2'de görüldüğü gibi jel analizi sonucunda pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitini taşıyan *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinde yaklaşık 37 kDa büyüklüğünde *GkASNaz* proteininin 4. saatte yüksek miktarda eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Gen içermeyen pET-22b(+) plazmitini taşıyan *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücreleri ve plazmit taşımayan boş *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinde ise belirgin ekspresyon bandı gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.2: *GkASNaz* ekspresyonunun SDS-PAGE (%12) görüntüsü. 1-3: Boş *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinin, 4-6: *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3)/pET-22b(+) hücrelerinin, 7-9: pET-22b(+)/*GkASNaz*'ın *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinde IPTG ile uyarımı sonrası 0, 2 ve 4. saatte alınan örnekler, M: Moleküler protein belirteci.

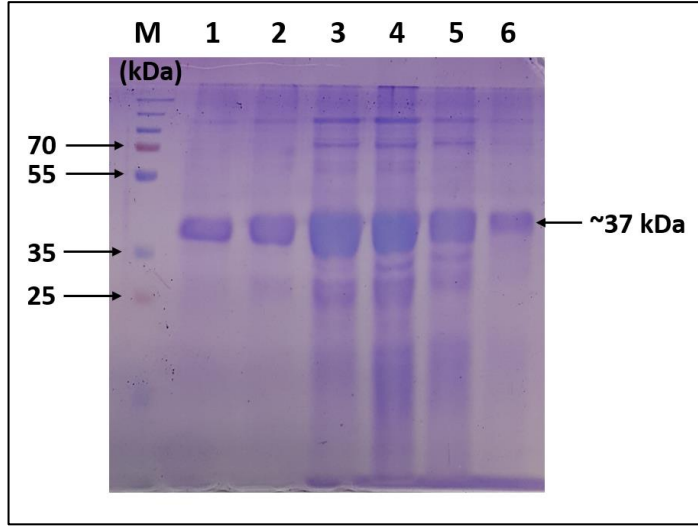
4.3. *GkASNaz* Enziminin Saflaştırılması

Rekombinant proteinin ekspresyonu doğrulandıktan sonra saflaştırma için büyük ölçekte protein ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. 4 saatlik ekspresyon sonunda toplanan hücreler sonikasyon ile parçalanarak hücre özütü elde edilmiş ve 0,45 μ M'lik filtreden geçirilmiştir (Şekil 4.3).



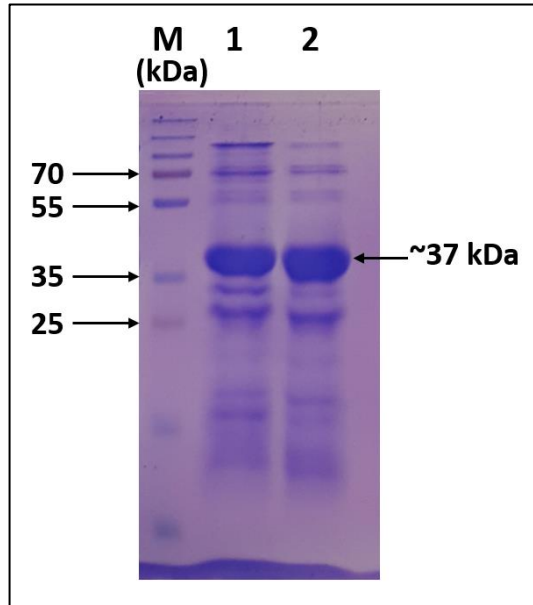
Şekil 4.3: Rekombinant *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinden elde edilen hücre özütünün %12'lik SDS-PAGE analizi. M: Protein belirteci, 1: IPTG ile uyarım öncesi, 2: IPTG ile uyarım sonrası 4. saatte alınan örnek, 3: Hücre özütü.

C-terminalinde 6x-His kuyruğu bulunan rekombinant protein, HisTrapFF™ kolonuna yüklenerek hücre özütünden Ni-NTA afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen elüsyon fraksiyonlarındaki protein varlığı %12'lik SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. C-terminalinde histidin etiketi ile elüye edilen *GkASNaz* proteini ~37 kDa moleküler ağırlıkta kalın bir bant olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Saflaştırma sonrası elde edilen elüsyon fraksiyonlarının SDS-PAGE analizi.
M: Protein belirteci, 1-6: Elüsyon fraksiyonları.

İlgili rekombinant proteinin bulunduğu elüsyon fraksiyonları bir araya getirildikten sonra 10000 MWCO Amicon® Ultra-15 ultrafiltrasyon falkonu kullanılarak proteinin içinde bulunduğu fosfat tampon solüsyonu (pH 7.4), Tris-HCl (pH 8.5) tampon solüsyonu ile değiştirilmiş ve konsantre edilmiştir (Şekil 4.5). Saflaştırılan ve konsantre edilen protein miktarları BCA yöntemi ile sırasıyla 0.38 ve 0.61 mg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5: Saflaştırılmış proteinin SDS-PAGE (%12) analizi. M: Protein belirteci,
1: Saflaştırılmış protein, 2: Konsantre edilmiş protein.

4.4. Asparajinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

L-asparajinaz enziminin aktivitesi, enzimin substrat olarak L-asparajini hidroliz etmesi sonucu açığa çıkan amonyak miktarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Amonyak miktarının belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda (0-3 mM) amonyum sülfat standart grafiği hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin denklemi $y=0,3405x$ olarak hesaplanmıştır. Nessler reaksiyonu sonucu örnekler 450 nm dalga boyunda ölçülerek elde edilen absorbans değerleri denklemde yerine yazılmış ve açığa çıkan amonyak miktarı μmol olarak hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi ise yöntemlerde verilen denklem 3.1'e göre U/ μL cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi (unit}/\mu\text{l}) = \frac{[\text{NH}_3 (\mu\text{M}) \times \text{reaksiyon hacmi } (\mu\text{l})]}{[\text{supernatant hacmi } (\mu\text{l}) \times \text{reaksiyon süresi (dk)} \times \text{enzim miktarı } (\mu\text{l})]} \quad (3.1)$$

Saflaştırılmış ve konsantre edilmiş *GkASNaz* enzimlerinin aktivitelerini belirlemek için 2,5 μL enzim, 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) tamponu içerisinde 5 mM L-asparajin substratı ile 55 °C'ta 10 dakika inkübe edilmiş ve açığa çıkan amonyak miktarı Yöntem 3.2.12'de verilen Nesslerizasyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Ni-NTA afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan *GkASNaz* enzimi, 357.84 U/mg protein spesifik aktivite ve %34.01 verim ile elde edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: *GkASNaz* enziminin saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Total Protein (mg)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma (Kat)	Aktivite Verimi (%)
Hücre özütü	7.5	28.03	1617.62	57.70	1.0	100
Saflaştırılmış protein	6	2.32	820.44	354.15	6.14	50.72
Konsantre protein	2.5	1.54	550.17	357.84	6.20	34.01

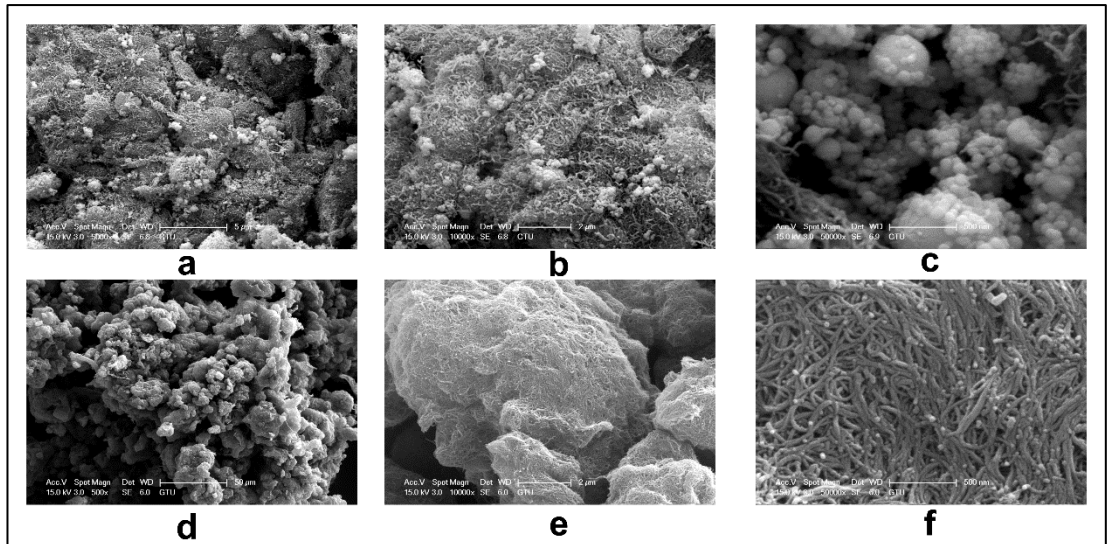
4.5. *GkASNaz* Enziminin İmmobilizasyonu

Hazırlanan destek materyali üzerine *GkASNaz* enziminin immobilizasyonu, yöntem 3.2.10.2' de verilen reaksiyona göre gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği yapılan enstrümental analizler ile kanıtlanmıştır.

4.6. İmmobilize *GkASNaz* Enziminin Enstrümental Analizleri

4.6.1. SEM, SEM-EDS Analizi

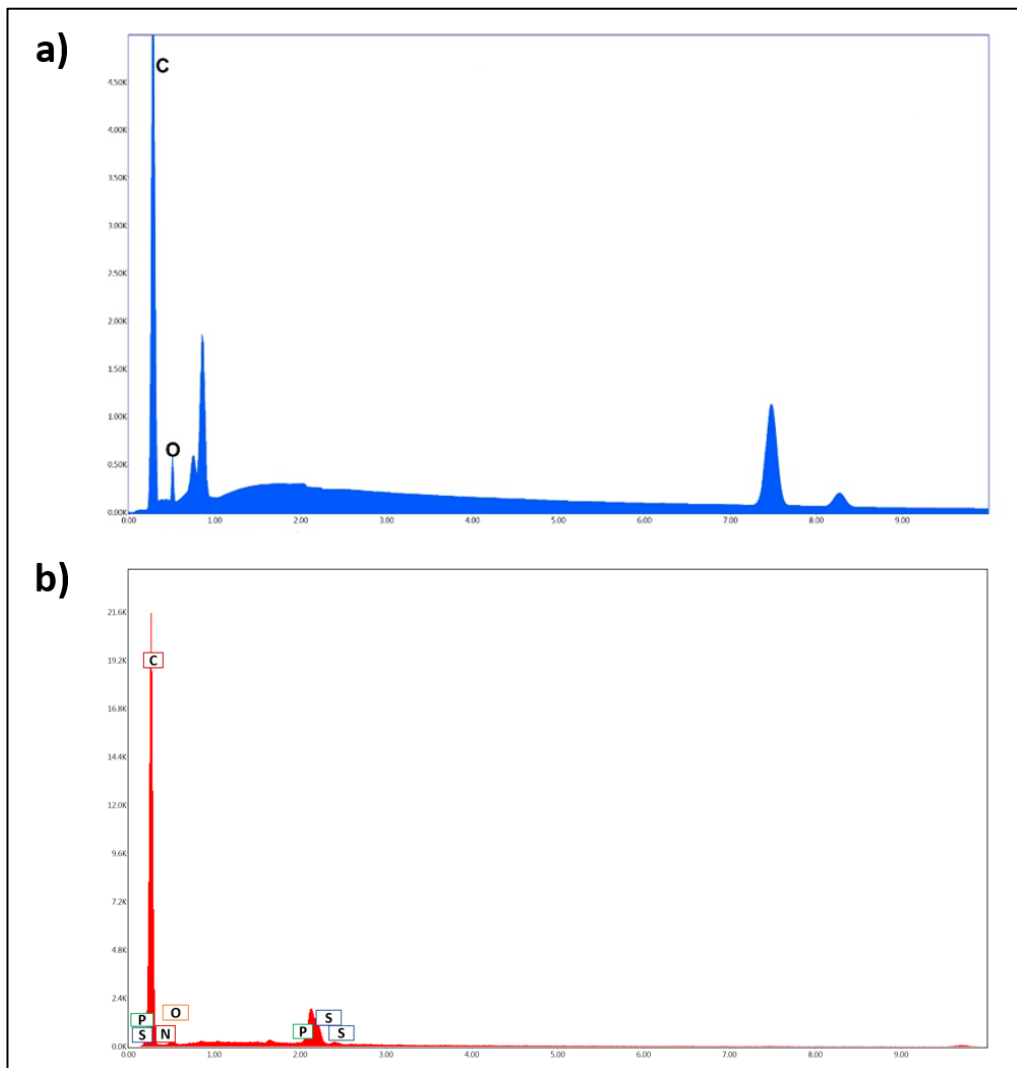
Enzim bağı olmayan MWCNT destek yapısının ve immobilize *GkASNaz* enziminin yüzey morfolojisinde meydana gelen değişikliklerin analizi SEM ile karakterize edilmiş ve farklı büyütmelerde alınan SEM görüntüleri Şekil 4.6'da gösterilmiştir. *GkASNaz* immobilizasyonundan sonra elde edilen MWCNT-Ald@*GkASNaz* enziminin yüzey morfolojisinin boş MWCNT yapısına kıyasla çok daha pürüzlü ve kalın olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6: Farklı büyütmelerde alınan SEM görüntüleri. a-c: Boş MWCNT, d-f: MWCNT-Ald@*GkASNaz*.

İmmobilizasyon işleminden önce ve sonra MWCNT ve MWCNT-Ald@GkASNaz'ın elementel bileşimlerini tespit etmek için ise EDS analizi yapılmıştır (Şekil 4.7). EDS spektrumunda boş MWCNT destek sisteminin sadece karbon (C) ve oksijen (O) elementlerini içerdiği Şekil 4.7 a'da gösterilmiştir.

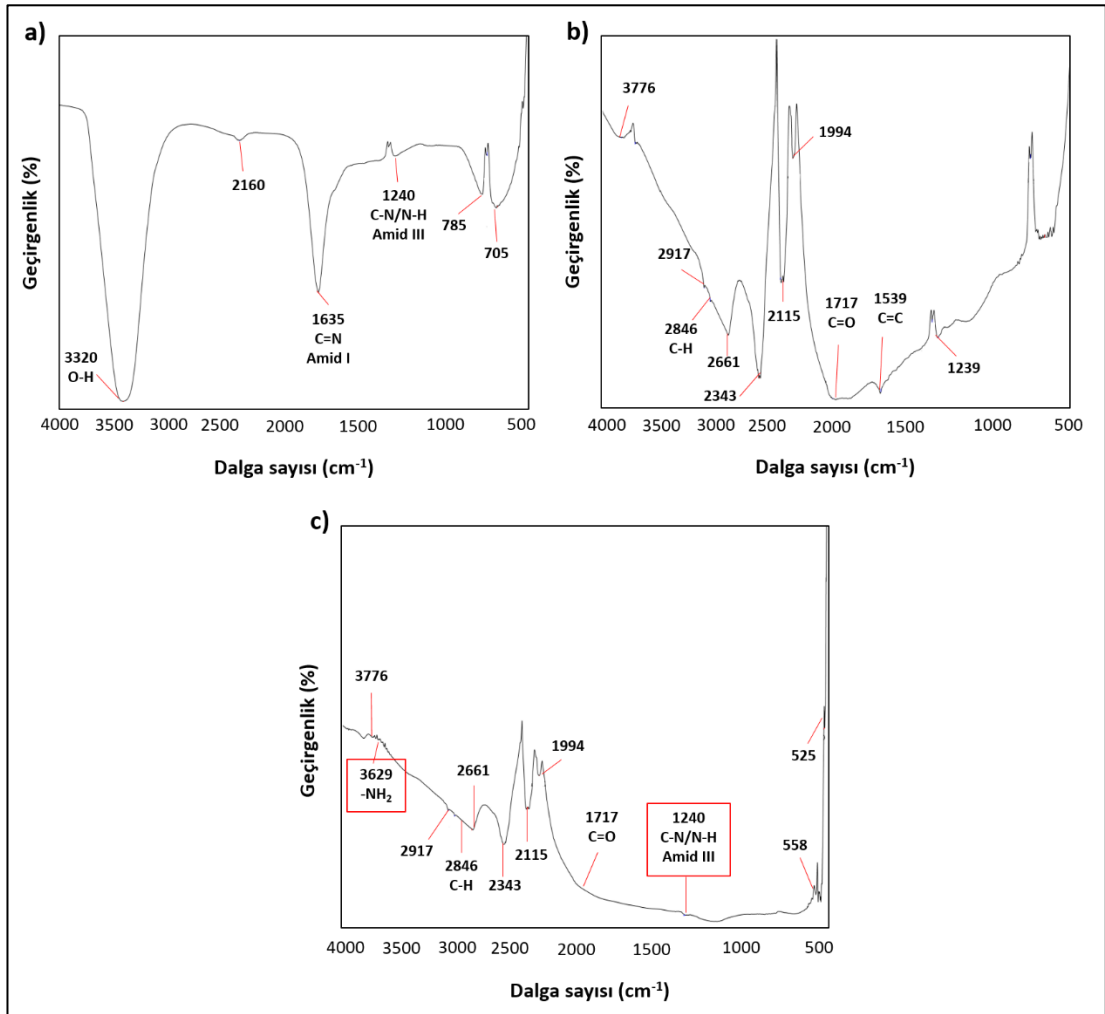
GkASNaz'ın immobilizasyonundan sonra ise MWCNT-Ald@GkASNaz yapısında C ve O elementlerine ek olarak azot (N), kükürt (S) ve fosfor (P) elementlerinin varlığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7 b). Yapıdaki N, S ve P elementlerinin varlığı GkASNaz'ın MWCNT üzerine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini göstermiştir.



Şekil 4.7: İmmobilize yapıların EDS spektrumları. a: Boş MWCNT, b: MWCNT-Ald@GkASNaz.

4.6.2. FT-IR Analizi

Serbest *GkASNaz*, boş MWCNT ve MWCNT-Ald@*GkASNaz*'ın 4000-500 cm^{-1} aralığındaki FT-IR spektrumları Şekil 4.8'de gösterilmiştir. 4000-3600 cm^{-1} aralığındaki geniş bant serbest enzimlerin $-\text{NH}_2$ gruplarının gerilimini göstermektedir. Bu band genellikle O-H ($\sim 3300 \text{cm}^{-1}$) geriliminin olduğu yerde görülür fakat çok daha geniş ve şiddetli olması ile ayırt edilmektedir. 1635 cm^{-1} 'deki pik, serbest enzimin amid bağına atıf yapmaktadır (Şekil 4.8 a). 2846 cm^{-1} 'deki pik C-H gerilimini ifade etmektedir. Yaklaşık 1717 cm^{-1} 'de görülen titreşim piki karboksil grubunun (C=O) titreşiminden kaynaklanmaktadır (Şekil 4.8 b ve c). 1200-800 cm^{-1} aralığındaki titreşimler ise amino asit yapısındaki C-N, C-O ve C-C gerilimlerine karşılık gelmektedir (Şekil 4.8 c).

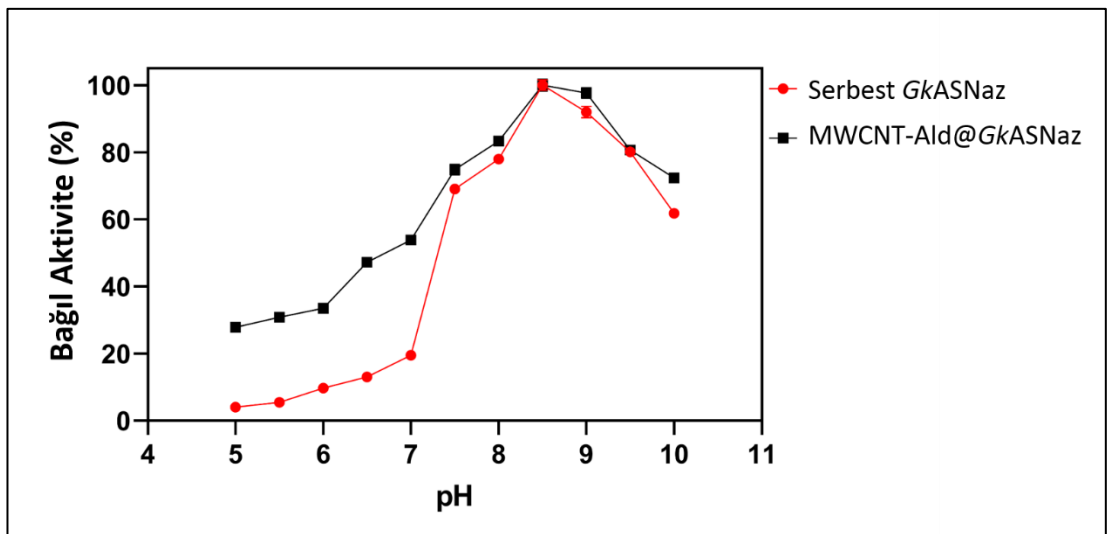


Şekil 4.8: Serbest ve immobilize enzimin FT-IR spektrumları. a: Serbest *GkASNaz*, b: Boş MWCNT, c: MWCNT-Ald@*GkASNaz*.

4.7. Serbest ve İmmobilize *GkASNaz*'ın Biyokimyasal Karakterizasyonu

4.7.1. pH'ın Serbest ve İmmobilize *GkASNaz* Aktivitesi Üzerine Etkisi

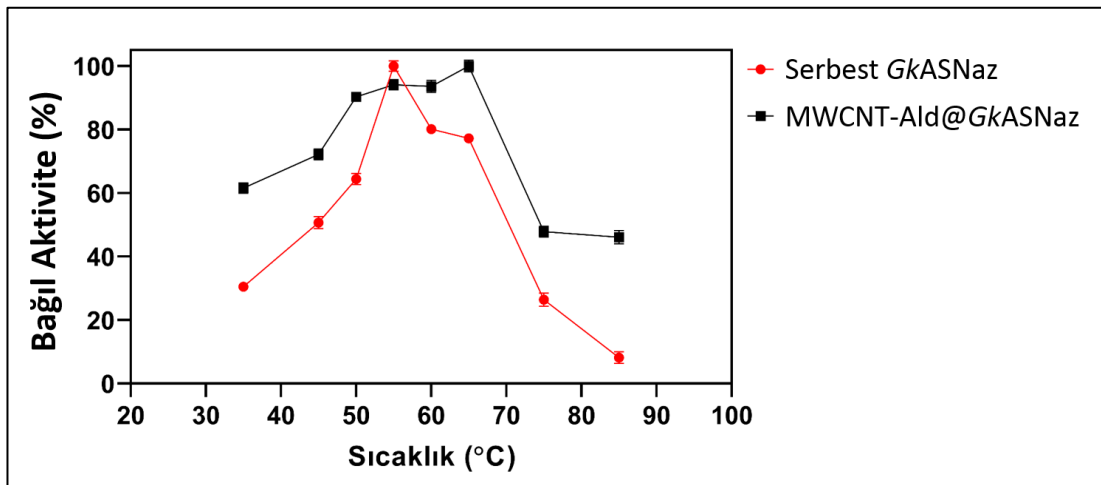
Hem serbest hem de immobilize *GkASNaz* enzimlerinin optimum pH değerleri 55 °C'ta, 5 ile 10 arasında değişen çeşitli pH aralıklarında enzim aktivitelerinin ölçülmesiyle belirlenmiştir. Farklı pH'ların serbest ve immobilize MWCNT-Ald@*GkASNaz* aktivitesine olan etkisi Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Serbest ve immobilize *GkASNaz* örnekleri için optimum pH değeri 8.5 olarak belirlenmiştir. Serbest *GkASNaz*, pH 7.0 ve altındaki pH değerlerinde çok düşük enzim aktivitesi gösterirken pH değeri 7.0'den 8.5'e doğru arttırıldığında aktivitede önemli bir artış gözlemlenmiştir. Serbest enzimle karşılaştırıldığında immobilize MWCNT-Ald@*GkASNaz* enzimi pH 5.0-8.0 aralığında serbest enzimden daha yüksek bağlı aktivite göstermiştir. Bu durum *GkASNaz* enziminin 3 boyutlu yapısının immobilizasyon işleminden sonra pH değişimlerine karşı korunduğunu göstermiştir. pH 9.0 ve üzerindeki değerlerde hem serbest hem de immobilize enzimin aktivitesinde bir azalma gözlemlenmiştir. pH 10.0'da serbest *GkASNaz*, aktivitesini %60 oranında korurken, MWCNT-Ald@*GkASNaz*'ın aktivitesini %72 oranında koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.9: Serbest ve immobilize *GkASNaz* aktivitesi üzerine pH'ın etkisi.

4.7.2. Sıcaklığın Serbest ve İmmobilize *GkASNaz* Aktivitesi Üzerine Etkisi

Serbest ve immobilize *GkASNaz* enzimlerinin optimum sıcaklığını belirlemek için enzim aktiviteleri, optimum pH değerinde (pH 8.5), 35-85 °C aralığında değişen farklı sıcaklıklarda ölçülmüştür. Şekil 4.10'da gösterildiği gibi serbest *GkASNaz*'ın aktivitesi 35-55 °C aralığında artış göstermiş ve 55 °C'ta maksimum aktivite değerine ulaşmıştır. 55 °C ve üzerindeki sıcaklıklarda ise aktivitede azalma gözlemlenmiştir. *GkASNaz*'ın kovalent immobilizasyonundan sonra ise sıcaklık değişimlerine karşı direncinde ve optimum sıcaklık değerinde artış beklenmekteydi. Grafikte de görüldüğü gibi immobilize MWCNT-Ald@*GkASNaz*'ın maksimum aktivite gösterdiği optimum sıcaklık değeri 65 °C olarak belirlenmiştir. 85 °C'ta serbest *GkASNaz* %8 kalan aktivite gösterirken, MWCNT-Ald@*GkASNaz* enziminin aktivitesini %46 oranında koruduğu gözlemlenmiştir.



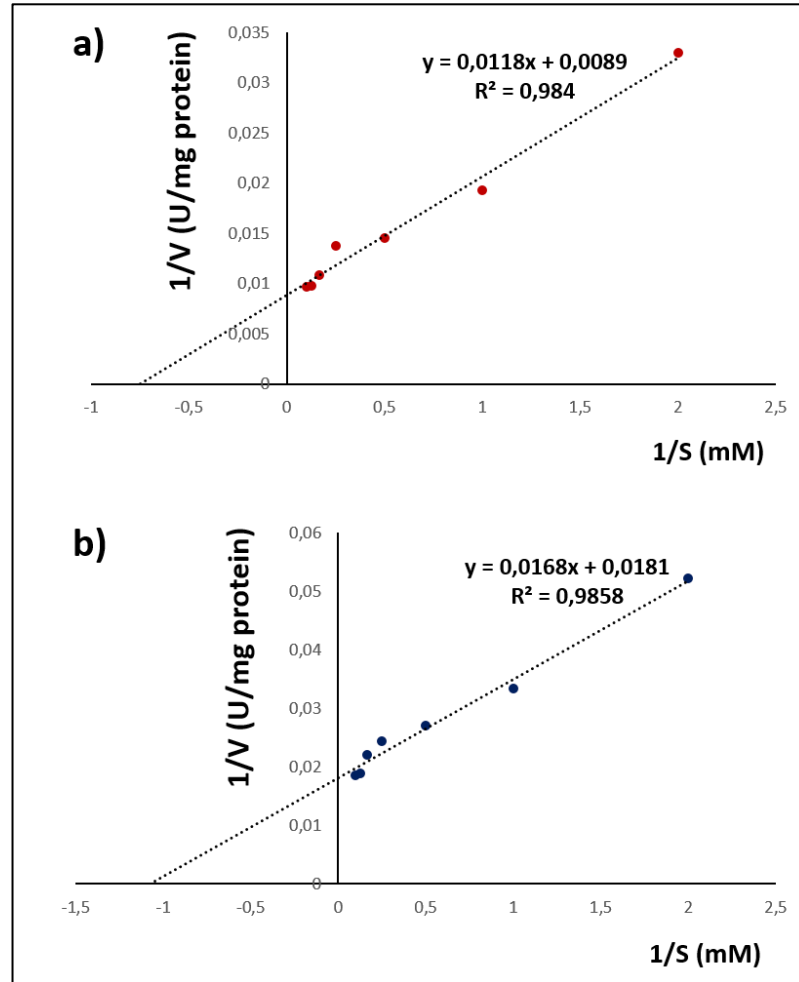
Şekil 4.10: Serbest ve immobilize *GkASNaz* aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

4.7.3. Serbest ve İmmobilize Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize *GkASNaz* enzimlerinin kinetik parametreleri, substrat olarak L-asparajinin kullanılması ile belirlenmiştir. Enzimlerin Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum hız (V_{max}) parametrelerinin hesaplanması için substrat konsantrasyonu ve spesifik aktivite değerlerinden elde edilen verilere göre $1/V'$ 'ye karşı $1/S$ doğrusal Lineweaver-Burk grafiği çizilmiştir (Şekil 4.11). Denklem (3.2)

kullanılarak serbest *GkASNaz* ve MWCNT-Ald@*GkASNaz* için K_m değerleri sırasıyla 1.33 ve 0.93 mM olarak hesaplanmıştır. Serbest *GkASNaz* ile karşılaştırıldığında immobilize enzimin K_m değerinde düşüş görülmesi substratına karşı daha yüksek afiniteye sahip olduğunu göstermiştir.

Serbest *GkASNaz* ve MWCNT-Ald@*GkASNaz* için hesaplanan V_{max} değerleri ise sırasıyla 112.4 ve 55.2 U/mg protein olarak belirlenmiştir. Immobilizasyon işleminden sonra serbest *GkASNaz*'a kıyasla immobilize enzimin maksimum hız değerinde düşüş gözlemlenmiştir. Bu durumun substratın immobilize enzimin aktif bölgesine erişiminin kısıtlı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.11: Serbest ve immobilize enzimlerin Lineweaver-Burk grafikleri.
a: Serbest *GkASNaz*, b: MWCNT-Ald@*GkASNaz*.

Ayrıca hem serbest hem de immobilize enzim için k_{cat} ve katalitik etkinlik değerleri hesaplanarak Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Serbest *GkASNaz* ve MWCNT-

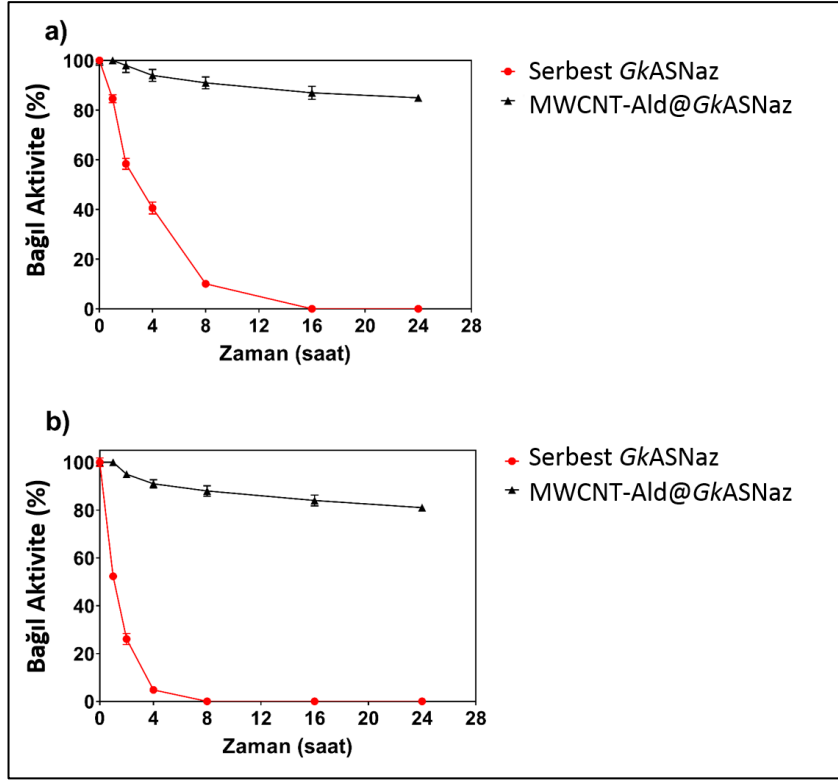
Ald@GkASNaz enziminin k_{cat} değerleri sırasıyla 4.1×10^3 ve 2.0×10^3 dk⁻¹ olarak bulunmuştur. Buna karşılık gelen katalitik etkinlikleri 3.1×10^3 ve 2.2×10^3 mM⁻¹ dk⁻¹ olarak belirlenmiştir. Katalitik etkinlik oranı ise MWCNT-Ald@GkASNaz için 0.71 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.2: Serbest ve immobilize GkASNaz enzimlerinin kinetik parametrelerinin karşılaştırılması.

Enzim	K_m (mM)	V_{max} (U/mg protein)	k_{cat} (dk ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ dk ⁻¹)	Katalitik etkinlik oranı
Serbest GkASNaz	1.33	112.4	4.1×10^3	3.1×10^3	-
MWCNT-Ald@GkASNaz	0.93	55.2	2.0×10^3	2.2×10^3	0.71

4.7.4. Serbest ve İmmobilize Enzimin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest GkASNaz ve MWCNT-Ald@GkASNaz'ın 55 ve 65 °C'teki termal kararlılıkları Şekil 4.12'de gösterilmiştir. Serbest GkASNaz, 55 °C'ta 8 saatlik inkübasyon sonunda %10 oranında aktivitesini korurken 16 saatlik inkübasyon sonrasında aktivitesinin tamamını kaybetmiştir. MWCNT-Ald@GkASNaz enzimi ise aynı koşullarda 8 saatlik inkübasyon sonunda başlangıç aktivitesini %91 oranında korurken, 16 saatlik inkübasyondan sonra aktivitesini %87 oranında koruduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.12 a). 65 °C'ta serbest GkASNaz, başlangıç aktivitesini hızla kaybetmiş ve 8 saatlik inkübasyon süresinden sonra enzim aktivitesi gözlenmemiştir. İmmobilize MWCNT-Ald@GkASNaz'ın ise 65 °C'ta 8 ve 16 saatlik inkübasyondan sonra sırasıyla %88 ve %84 kalan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.12 b).



Şekil 4.12: Serbest ve immobilize *GkASNaz* enzimlerinin termal kararlılıkları. a: 55 °C sıcaklık, b: 65 °C sıcaklık.

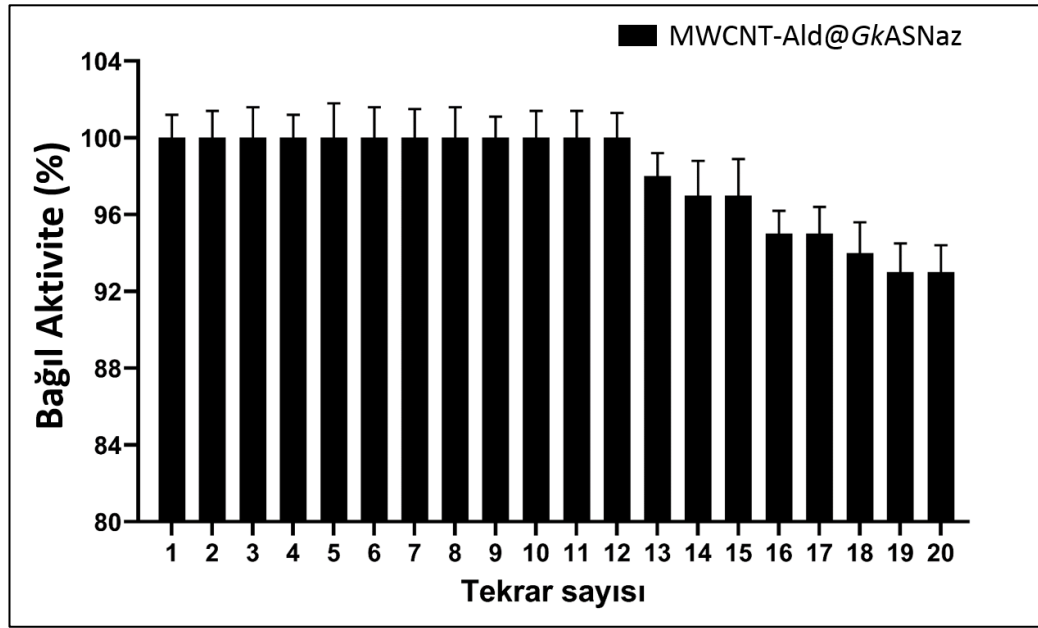
Serbest *GkASNaz* ve MWCNT-Ald@*GkASNaz*'ın termal kararlılık parametreleri ise Tablo 4.3'te gösterilmiştir. 55 °C'taki $t_{1/2}$ değerleri sırasıyla 2.8 ve 59.6 saat olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, 55 °C'ta 21.3 kat daha yüksek stabilizasyon elde edildiğini göstermiştir. 65 °C'taki $t_{1/2}$ değerleri ise sırasıyla 1.1 ve 46.9 saat olarak belirlenmiştir. 65 °C'ta stabilizasyondaki artışlar ise MWCNT-Ald@*GkASNaz* için 42.6 kat olmuştur. Elde edilen bu sonuçlar immobilizasyondan sonra *GkASNaz*'ın termal kararlılığının arttığını göstermiştir.

Tablo 4.3: Serbest ve immobilize *GkASNaz* enzimlerinin 55 ve 65 °C'taki termal kararlılık parametreleri.

Sıcaklık (°C)	Serbest <i>GkASNaz</i>		MWCNT-Ald @ <i>GkASNaz</i>	
	55	65	55	65
k_d (saat ⁻¹)	0.248	0.630	0.0116	0.0148
$t_{1/2}$ (saat)	2.8	1.1	59.6	46.9
SF	1.0	1.0	21.3	42.6

4.7.5. İmmobilize Enzimin Tekrar Kullanım Kararlılığının Belirlenmesi

İmmobilize enzimin yeniden kullanılabilirliği özellikle endüstriyel uygulamalarda maliyeti düşüren ve enzimin değerini ortaya koyan önemli özelliklerinden biridir. MWCNT-Ald@GkASNaz'ın tekrar kullanım kararlılığını belirlemek için immobilize enzim, her reaksiyon sonunda geri kazanılarak bir sonraki reaksiyon için yeniden kullanılmış ve döngü 20 defa tekrarlanmıştır. İmmobilize enzimin tekrar kullanım sayısına bağlı kalan aktivitesi Şekil 4.13'te gösterilmiştir. İlk 12 döngü boyunca immobilize enzimin başlangıç aktivitesinin tamamını koruduğu gözlemlenmiştir. Tekrar eden 20 döngü sonunda ise MWCNT-Ald@GkASNaz'ın başlangıç aktivitesini %93 oranında koruduğu belirlenmiştir.

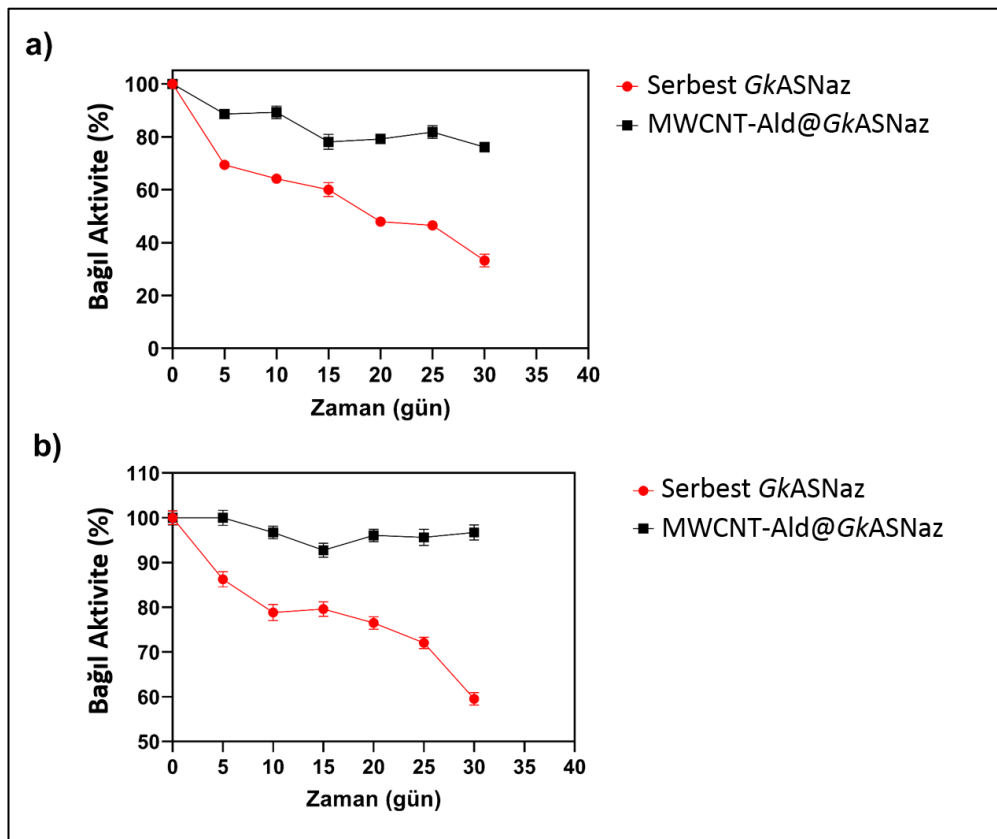


Şekil 4.13: İmmobilize GkASNaz enziminin tekrar kullanım kararlılığı.

4.7.6. Serbest ve İmmobilize Enzimin Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

Serbest GkASNaz ve MWCNT-Ald@GkASNaz'ın depolama kararlılıkları, +4 °C ve oda sıcaklığı olmak üzere iki farklı sıcaklıkta, 30 gün boyunca enzim aktivitelerinin ölçülmesiyle belirlenmiş ve zamana bağlı kalan aktiviteleri Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Serbest GkASNaz'ın oda sıcaklığında depolanmasıyla birlikte başlangıç aktivitesinin

hızlı bir şekilde düştüğü ve 30 günlük depolamadan sonra %33 kalan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Aynı koşullarda MWCNT-Ald@GkASNaz'ın 30 günlük depolamadan sonra başlangıç aktivitesini %76 oranında koruduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14 a). +4 °C'ta 30 günlük depolama sonrası ise serbest GkASNaz başlangıç aktivitesini %60 oranında korurken, immobilize MWCNT-Ald@GkASNaz'ın ilk günden itibaren başlangıç aktivitesinin neredeyse tamamını koruduğu ve %97 kalan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.14 b). Bu sonuçlar MWCNT-Ald@GkASNaz'ın serbest enzime kıyasla uzun süreli depolamada çok daha stabil olduğunu göstermiştir.

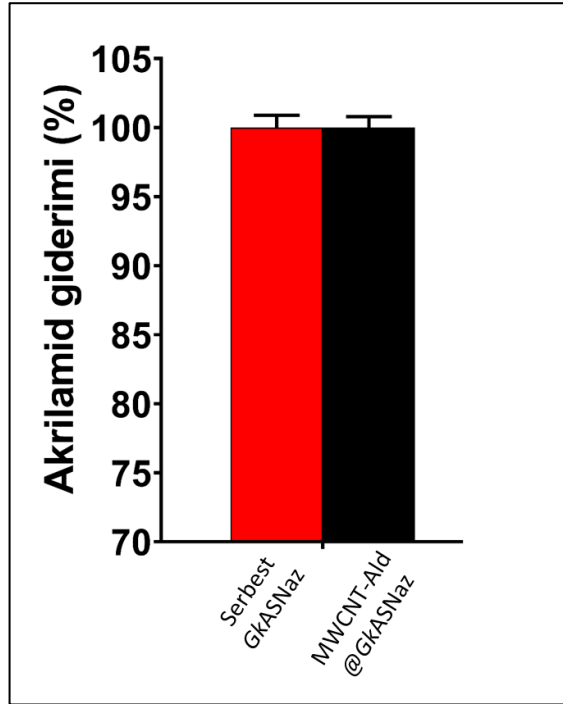


Şekil 4.14: Serbest ve immobilize GkASNaz'ın depolama kararlılıkları. a: Oda sıcaklığındaki, b: +4 °C'taki depolama.

4.8. Serbest ve Immobilize Enzimin Akrilamid Giderim Potansiyelinin Belirlenmesi

Serbest ve immobilize enzimin akrilamid giderimi şekil 4.15'te gösterilmiştir. Serbest GkASNaz ve MWCNT-Ald@GkASNaz'ın akrilamid giderim potansiyeli, asparajin-nişasta gıda modeli kullanılarak HPLC ile test edilmiştir. Akrilamid giderimi

için 10 ünite serbest ve immobilize enzim kullanılmış ve 60 dakikalık reaksiyon süresi sonunda her iki enzimin de oluşan akrilamid miktarını %100 oranında azalttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar hem serbest hem de immobilize enzimin akrilamid gideriminde etkili olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.15: Serbest ve immobilize *GkASNaz*'ın akrilamid giderim potansiyeli.

5. TARTIŞMA

L-asparajin amidohidrolaz olarak da bilinen L-asparajinaz enzimi (E.C 3.5.1.1), L-asparajin amino asidinin aspartik asit ve amonyağa dönüşümünü katalizleyen endüstriyel bir enzimdir. Asparajini hidroliz etme özelliği sayesinde L-asparajinazlar, uzun yıllardan beri ALL gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda ise gıda endüstrisinde, akrilamid giderim potansiyeli ile dikkatleri üzerine çekmiştir. Akrilamid, nişasta bakımından zengin gıdaların yüksek sıcaklıklarda kızartılması sonucu asparajin öncül maddesinden oluşmakta ve gıda güvenliği açısından ciddi endişelere sebep olmaktadır. Bu bağlamda L-asparajinaz enzimi, L-asparajini hidrolize ederek gıdalarda oluşan akrilamid miktarını azaltmakta böylelikle enzimin endüstriyel önemini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte özellikle gıda endüstrisinde yüksek sıcaklıklarda inkübasyona ve ön işleme tabi tutulan L-asparajinazların uzun süre stabil kalmaları ve yeniden kullanılabilir olmaları oldukça önemlidir. Ancak mikroorganizmalar tarafından üretilen serbest asparajinazların yüksek sıcaklıklarda stabiliteilerinin düşük olması ve tek kullanımdan sonra geri dönüştürülememesi, endüstriyel kullanımını sınırlamakta ve maliyeti artırmaktadır. Enzim immobilizasyon teknolojisi ise serbest enzimlerin sahip olduğu bu dezavantajları ortadan kaldırmakta ve enzim özelliklerini iyileştirmektedir.

Bu bulgular, mikrobiyal L-asparajinaz enzimini immobilize sistemlere bağlayarak daha kararlı hale getirmeyi ve yeniden kullanılabilir enzim elde etmeyi düşündürmüştür. Bugüne kadar yapılan ve literatürde yer alan çalışmaların çoğu immobilize L-asparajinaz enziminin farmasötik uygulamalardaki kullanımını kapsamaktadır. Immobilize asparajinazın gıda endüstrisinde kullanımıyla ilgili yalnızca birkaç çalışma bulunmaktadır.

Bu nedenle sunduğumuz tez çalışmasında, termofilik bir bakteri olan *Geobacillus kaustophilus*'tan elde edilen serbest L-asparajinazın (*GkASNaz*) çok duvarlı karbon nanotüp (MWCNT) üzerine kovalent olarak immobilize edilmesi ve hem serbest hem de immobilize L-asparajinazın gıda endüstrisinde akrilamid giderim potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, çalışmamızın ilk aşamasında daha önceden pET-22b(+) vektörüne klonlanan *GkASNaz* geni, *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinde IPTG (1 mM) ile uyarılarak yüksek miktarda eksprese edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonrası pET-22b(+)/*GkASNaz* plazmitini taşıyan hücrelerde beklenen büyüklükte (~37 kDa) yüksek miktarda rekombinant protein ekspresyon bandı gözlemlenirken geni içermeyen kontrol hücrelerinde belirgin ekspresyon bandı gözlenmemiştir. Karboksi-terminalinde 6x-His kuyruğu ile birlikte füzyon protein şeklinde üretilen *GkASNaz* enzimi, Ni-NTA afinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırılmış ve Tris-HCl tamponu içinde konsantre edilmiştir. Saflaştırma sonrası elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve *GkASNaz*'ın ~37 kDa moleküler ağırlığa sahip monomer yapıda bir protein olduğu gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar daha önce laboratuvarımızda yapılan klonlama ve ekspresyon çalışmalarını desteklemiştir [Özdemir vd., 2022].

Saflaştırılmış ve konsantre edilmiş *GkASNaz*'ın aktivitesi, enzimin substrat olarak L-asparajini hidroliz etmesi sonucu açığa çıkan amonyağın tayin edilmesiyle ölçülmüştür. Çalışmamızda Ni-NTA afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırılan *GkASNaz* enzimi, 357.84 U/mg protein spesifik aktivite 6.2 saflaştırma katı ve %34.01 verim ile elde edilmiştir. L-asparajinaz enzimlerinin moleküler ağırlıkları ve saflaştırma verimleri elde edildikleri mikroorganizma kaynağına ve saflaştırma yöntemine göre farklılık göstermektedir. Literatürde bulunan diğer çalışmalara bakıldığında; El-Naggar vd., (2018), *Streptomyces brollosae* NEAE-115 suşundan saflaştırdıkları L-asparajinaz enzimini (67 kDa) amonyum sülfat diyalizi ve iyon değişim kromatografisi basamaklarından sonra 76.67 U/mg protein spesifik aktivite, 7.8 saflaştırma katı ve %7.3 verim ile elde ettiklerini bildirmişlerdir. Jiao vd., (2020), *Acinetobacter soli*'den elde ettikleri rekombinant L-asparajinazı (35 kDa) Ni-NTA afinite kromatografisi ile saflaştırıp, enzimin spesifik aktivitesini ve saflaştırma katını sırasıyla 400 U/mg ve 11.4 olarak rapor etmişlerdir. El-Gendy vd., (2021), ise yapmış oldukları çalışmada *Fusarium equiseti* AHMF4 suşundan saflaştırdıkları L-asparajinaz (45.7 kDa) enzimini amonyum sülfat çöktürmesi, anyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kolonu adımlarından sonra 488 U/mg protein spesifik aktivite, 2.67 saflaştırma katı ve %48 verim ile elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızın ikinci aşamasında, saflaştırılan *GkASNaz* enzimi MWCNT üzerine kovalent olarak immobilize edilmiş ve immobilizasyonun doğrulanmasından sonra serbest enzimle karşılaştırmalı olarak karakterize edilmiştir. Enzimlerin uygun taşıyıcı matris üzerine immobilizasyonu termal stabilite, yeniden kullanılabilirlik ve substrat afinitesi gibi özellikleri geliştirmekte ve endüstriyel uygulamalar için daha uygun hale getirmektedir [Jia vd., 2021]. Bu nedenle ilgili tez çalışmasında *GkASNaz* enzimi, nano taşıyıcı bir malzeme olan MWCNT üzerine kovalent olarak immobilize edilmiştir. Literatürde L-asparajinaz enziminin çok duvarlı karbon nanotüp üzerine immobilizasyonu ile ilgili yalnızca birkaç çalışma bulunmaktadır. Bunlardan; Cristovao vd., (2020), *E. coli* L-asparajinazının MWCNT üzerine, Haroun vd., (2020), *Aspergillus versicolor* L-asparajinazının oksitlenmiş MWCNT üzerine ve Almeida vd., (2021), *E. coli* L-asparajinazının nitrik asit işlevselli MWCNT üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemi ile immobilizasyonunu rapor etmişlerdir. Ulu vd., (2019b), ise yapmış oldukları çalışmada *E. coli* L-asparajinazının Kalsiyum-Aljinat/MWCNT-COOH üzerine tutuklama yöntemiyle immobilizasyonunu bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda enzimin immobilizasyonu için kullanılan adsorpsiyon ve tutuklama gibi fiziksel immobilizasyon yöntemleri zayıf etkileşimlerle gerçekleştiğinden dolayı geri dönüştürebilirdir. Bu durum, enzimlerin destek sisteminden kolay bir şekilde ayrılmasına sebep olmaktadır [Homaei vd., 2013]. Literatürde L-asparajinaz enziminin MWCNT üzerine immobilizasyonunda, kimyasal yöntemin kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda *GkASNaz* enzimi, kimyasal bir yöntem olan kovalent bağlama yöntemi kullanılarak hazırlanan destek üzerine immobilize edilmiştir. Bu yöntem diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında enzim ile destek arasında güçlü bir bağlanma sağladığından dolayı enzimin yeniden kullanılabilirliğini artırmakta, enzimin destek sisteminden sızmasını engellemekte ve üç boyutlu yapısını korumaktadır [Mohamad vd., 2015].

GkASNaz enzimi MWCNT üzerine immobilize edildikten sonra immobilizasyon işleminin gerçekleşip gerçekleşmediği SEM, SEM-EDS ve FT-IR analizleri ile doğrulanmıştır. Immobilizasyon işleminden sonra yüzey morfolojisinde meydana gelen değişikliklerin analizi SEM ile karakterize edilmiş ve farklı büyütmelerde alınan SEM görüntülerinde enzim bağlı olmayan MWCNT ile karşılaştırıldığında enzim bağlı MWCNT-Ald@*GkASNaz*'ın çok daha pürüzlü ve kalın olduğu gözlemlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında, L-asparajinazın farklı taşıyıcı matrisler üzerine immobilizasyonundan sonra da yüzey morfolojisinde benzer değişikliklerin meydana geldiği rapor edilmiştir [Agrawal vd., 2018; Monajati vd., 2018; Baskar vd., 2018]. Bununla birlikte boş MWCNT ve MWCNT-Ald@GkASNaz'ın elementel bileşimlerini tespit etmek için SEM-EDS analizi yapılmıştır. Boş MWCNT, sadece C ve O elementlerini içerirken, immobilizasyon işleminden sonra MWCNT-Ald@GkASNaz'ın bu elementlere ek olarak aminoasit yapısında bulunan N, S ve P elementlerini içerdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca serbest ve immobilize GkASNaz enzimlerinin karakteristik gruplarını belirlemek ve immobilizasyonu doğrulamak için FT-IR analizi yapılmıştır. İmmobilize MWCNT-Ald@GkASNaz yapısında 1240 ve 3629 cm^{-1} 'de gözlemlenen karakteristik pikler sırasıyla enzimin amid III bağına ve NH_2 gerilimine karşılık gelmektedir. Bu piklerin varlığı GkASNaz enziminin immobilizasyonunu doğrulamıştır. Elde ettiğimiz FT-IR sonuçları, Ulu ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir [Ulu vd., 2019b]. Yapılan tüm bu enstrümental analiz sonuçları GkASNaz enziminin MWCNT üzerine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini kanıtlamıştır.

Enzim immobilizasyonu doğrulandıktan sonra serbest ve immobilize enzimin karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. pH ve sıcaklık enzim aktivitesini etkileyen önemli çevresel faktörlerdendir. Çalışmamızda serbest GkASNaz ve MWCNT-Ald@GkASNaz için optimum pH değerleri 8.5 olarak belirlenmiştir. Bununla beraber immobilize enzimin pH: 5.0-8.0 aralığında serbest enzimden daha yüksek bağlı aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, GkASNaz enziminin 3 boyutlu yapısının immobilizasyon işleminden sonra pH değişimlerine karşı korunduğunu göstermiştir. Optimum sıcaklık değerleri ise serbest ve immobilize enzim için sırasıyla 55 ve 65 °C olarak belirlenmiştir. Bu sonuç, serbest enzimin kovalent immobilizasyonundan sonra sıcaklık değişimlerine karşı toleransının ve optimum sıcaklık değerinin arttığını göstermiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında; Noma vd., (2020), *E. coli* L-asparajinazının amino ve karboksil ile işlevselleştirilmiş manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanopartikülleri üzerine immobilizasyonu sonucu serbest ve immobilize formlar için optimum pH değerlerini sırasıyla 8.0, 7.5 ve 8.5 olarak optimum sıcaklık değerlerini ise 45, 55 ve 50 °C olarak bildirmişlerdir. Ulu vd., (2016), L-asparajinazın biyoçözünür nişasta kompositi üzerine immobilize

edilmesi sonucu hem serbest hem de immobilize enzimin optimum pH değerinin 8.5, optimum sıcaklığın ise serbest enzim için 45, immobilize form için 35 °C olduğunu rapor etmişlerdir.

Serbest *GkASNaz* ve MWCNT-Ald@*GkASNaz*'ın kinetik parametreleri, substrat olarak L-asparajinin kullanılmasıyla belirlenmiştir. Serbest ve immobilize enzim için K_m değerleri sırasıyla 1.33 ve 0.93 mM, V_{max} değerleri ise 112.4 ve 55.2 U/mg protein olarak hesaplanmıştır. Enzimin kovalent immobilizasyonundan sonra hem K_m hem de V_{max} değerinde düşüş gözlemlenmiştir. K_m değerindeki azalma MWCNT-Ald@*GkASNaz*'ın substratına karşı daha yüksek afiniteye sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte immobilize enzimin V_{max} değerindeki azalmanın, substratın immobilizasyondan sonra enzimin aktif bölgesine erişiminin kısıtlı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında benzer durumla karşılaşılmıştır. Monajati vd., (2018), *E. coli* L-asparajinazının ve immobilize formu olan aspartik asit işlevselli grafen oksit'in K_m değerlerini sırasıyla 6.08 ve 5.7 mM, karşılık gelen V_{max} değerlerini ise 237.2 ve 204.7 U/mg protein olarak hesaplamışlardır. V_{max} değerindeki düşüşün enzim-substrat kompleksinin oluşması için gerekli olan enzim esnekliğinin azalmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Termal inaktivasyon deneyi, serbest ve immobilize *GkASNaz*'ın maksimum aktivite gösterdikleri 55 ve 65 °C sıcaklıklarda 24 saat inkübe edilmesiyle belirlenmiştir. 55 °C'ta serbest *GkASNaz*, 16 saatlik inkübasyondan sonra başlangıç aktivitesinin tamamını kaybederken, MWCNT-Ald@*GkASNaz* %87 oranında aktivitesini korumuştur. 65 °C'ta ise serbest enzim 8 saatlik inkübasyon sonrası aktivitesini tamamen kaybederken, immobilize enzimin aktivitesini %88 oranında koruduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar immobilizasyondan sonra enzimin termal stabilitesinin arttığını göstermiştir. Orhan ve Aktaş Uygun, (2020), serbest asparajinazın 55 °C'ta 10 saatlik inkübasyon sonrası başlangıç aktivitesinin tamamını kaybettiğini, immobilize formu olan manyetik poli (HEMA-GMA) nanopartikülünün ise aynı koşullarda aktivitesini %50 oranında koruduğunu bildirmiştir. Tarhan vd., (2020), ise serbest asparajinazın 55 °C'ta 3 saatlik inkübasyon sonrası başlangıç aktivitesini %50 oranında koruduğunu, immobilize formu olan maltoz işlevselli manyetik Fe₃O₄@Au nanopartiküllerinin ise aynı koşullarda başlangıç aktivitesini %90 oranında koruduğunu bildirmişlerdir.

İmmobilize enzimlerin yeniden kullanılabilirliği, tek kullanımlık serbest enzimlere kıyasla endüstriyel uygulamalarda maliyeti düşüren önemli avantajlarından biridir. Çalışmamızda MWCNT üzerine kovalent bir şekilde immobilize edilen MWCNT-Ald@GkASNaz'ın, ilk 12 döngü boyunca aktivitesinin tamamını koruduğu ve tekrar eden 20 döngü sonunda başlangıç aktivitesinin sadece %7'sini kaybederek %93'ünü koruduğu belirlenmiştir. Aktivitede gözlemlenen azalmanın enzimin denatüre olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında Agrawal ve Kango, (2019), alüminyum oksit ve titanyum oksit nanopartikülleri üzerine kovalent olarak immobilize edilen L-asparajinazın 9 döngü boyunca ortalama aktivitelerinin sırasıyla %91.8 ve %95.1 olduğunu ve aktivitedeki azalmanın benzer şekilde enzim denatürasyonundan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Alam vd., (2018), manyetik demir oksit nanopartikülleri üzerine immobilize edilen L-asparajinazın 5 döngü sonunda başlangıç aktivitesini %90 oranında koruduğunu, Tarhan vd., (2020), ise manyetik Fe₃O₄@Au nanopartikülleri üzerine immobilize edilen L-asparajinazın tekrar eden 5 döngüden sonra %78 oranında aktivitesini koruduğunu rapor etmişlerdir.

Enzimlerin uzun süreli depolanması, onların endüstriyel uygulamalardaki kullanımını artıran bir diğer önemli avantajdır. Bu nedenle çalışmamızda hem serbest hem de immobilize enzim, +4 °C ve oda sıcaklığında 30 gün boyunca depolanmış ve stabiliteleri incelenmiştir. Serbest GkASNaz, oda sıcaklığında 30 günlük depolamadan sonra %33 kalan aktivite gösterirken, aynı koşullarda immobilize enzim aktivitesini %76 oranında korumuştur. +4 °C'ta depolamada ise 30 gün sonunda serbest enzim %60 oranında aktivitesini korurken, immobilize enzimin %97 oranında aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. MWCNT-Ald@GkASNaz'ın her iki sıcaklıkta da uzun süreli depolama sonrası daha yüksek bağıl aktivite göstermesi enzimin kovalent immobilizasyonu ile stabilitesinin arttığını göstermiştir. Literatürdeki çalışmalara bakıldığında Ulu vd., (2019a), manyetik Fe₃O₄@MCM-41-Cl nanopartikülleri üzerine immobilize edilen L-asparajinazın +4 ve 25 °C'ta 4 haftalık depolamadan sonra sırasıyla %47 ve %32.5 oranında aktivitesini koruduğunu, serbest asparajinazın ise sırasıyla %32.2 ve %16 oranında aktivitesini koruduğunu bildirmişlerdir. Noma vd., (2020), ise amino ve karboksil ile işlevselleştirilmiş manyetik Fe₃O₄/SiO₂ nanopartikülleri üzerine immobilize edilen L-asparajinazın +4 °C'ta 4 haftalık

depolamadan sonra sırasıyla %79 ve %57 oranında aktivitelerini koruduğunu, serbest asparajınazın aynı koşullarda depolama sonrası aktivitesini %30 oranında koruduğunu rapor etmişlerdir.

L-asparajinaz enziminin akrilamidin öncü molekülü olan L-asparajini hidroliz etmesi, bir gıda enzimi olarak potansiyelini ortaya koymuştur. Bu nedenle çalışmamızın son aşamasında hem serbest hem de immobilize enzimin nişasta-asparajin gıda modelinde akrilamid giderim potansiyelleri incelenmiştir. Her iki enzimden 10 ünite kullanılarak gerçekleştirilen 60 dakikalık reaksiyon sonunda ise akrilamid miktarının %100 azaldığı HPLC ile gözlemlenmiştir. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında Ravi ve Gurunathan, (2017), *Aspergillus terreus* L-asparajinazını kitosan üzerine kovalent olarak immobilize etmiş ve 5 ünite enzimin kullanılmasıyla 20 dakikalık inkübasyon sonrası kochchi keşerlerinde akrilamid miktarının %49 oranında azaldığını belirlemişlerdir. Aynı yıl Aiswarya ve Baskar, (2017), *Aspergillus terreus* L-asparajinazını manyetik nanopartikül üzerine immobilize etmiş ve 4 ünite enzimin muamele edilmesiyle patates cipsinde oluşan akrilamid miktarının %75 oranında azaldığını göstermişlerdir. Agrawal vd., (2018), *E. coli* L-asparajinazını alüminyum oksit pelletleri üzerine kovalent olarak immobilize etmiş ve enzimin kullanılmasıyla patates cipsinde oluşan akrilamid miktarının %80.5 oranında azaldığını bildirmişlerdir. Aynı yıl Alam vd., (2018), *Bacillus aryabhatai* L-asparajinazını manyetik demir oksit nanopartikülleri üzerine kovalent olarak immobilize etmiş ve nişasta-asparajin gıda modelinde akrilamid giderimini incelemişlerdir. 18 ünite serbest ve immobilize enzimin kullanılması ile 30 dakikalık inkübasyon sonucu akrilamid miktarının sırasıyla %60 ve %99 oranında azaldığını rapor etmişlerdir. Li vd., (2020), yaptıkları çalışmada L-asparajinazı N-hidroksisüksinimit esterleri ile modifiye edilmiş polisakkarit agaroz küreleri üzerine kovalent olarak immobilize etmiş ve 96 ünite immobilize enzimin muamele edilmesi sonucu nişastada oluşan akrilamid miktarının %89 oranında azaldığını göstermişlerdir. Bir başka çalışmada Alam vd., (2021), *E. coli* L-asparajinazını manyetik nanopartikül üzerine immobilize edip patates cipsinde akrilamid giderimini test etmişlerdir. 12 ünite serbest ve immobilize enzimin kullanılması ile 20 dakikalık inkübasyondan sonra oluşan akrilamid miktarının sırasıyla %45 ve %95 oranında azaldığını belirlemişlerdir. Son olarak Yassin vd., (2022), *Aspergillus fumigatus* L-

asparajinazını biyouyumlu kitosan ve dekstran polimerlerine kovalent olarak immobilize etmiş ve hem serbest hem de immobilize enzimin 1 saat muamele edilmesi sonucu patates cipsinde oluşan akrilamid miktarının sırasıyla %48 ve %87-90 oranında azaldığını rapor etmişlerdir.

Sonuç olarak, çalışmamızda termofilik bir bakteriden elde edilen rekombinant *GkASNaz* enzimi kovalent bağlama yöntemi kullanılarak MWCNT üzerine immobilize edilmiş ve enzimin bağlanması SEM, EDS ve FT-IR analizleri ile doğrulanmıştır. Elde edildiği kaynaktan dolayı çalışmamızda kullandığımız serbest *GkASNaz* enzimi mezofilik kaynaklı enzimlere göre daha yüksek pH, sıcaklık ve depolama kararlılığı göstermiştir. Ancak serbest enzim ile karşılaştırıldığında *GkASNaz*'ın kovalent immobilizasyonu enzimin özelliklerini iyileştirerek daha iyi katalitik etkinlik, yeniden kullanılabilirlik ve termal kararlılık özellikleri sağlamıştır. MWCNT-Ald@*GkASNaz* üzerinde immobilize edilen *GkASNaz*'ın termal kararlılığı, 65 °C'ta 42.6 kat artmıştır. Tekrar eden 20 döngü sonrası immobilize enzim başlangıç aktivitesinde önemli bir kayıp olmadan aktivitesini %93 oranında korumuştur. Bununla birlikte MWCNT üzerine immobilize edilen *GkASNaz*'ın nişasta-asparajin gıda modeli sisteminde akrilamid giderimi için etkili bir biyokatalizör olduğu kanıtlanmıştır. Karakterizasyon ve akrilamid giderim sonuçları göz önüne alındığında immobilize MWCNT-Ald@*GkASNaz*, gıda endüstrisindeki uygulamalarda umut verici bir geleceğe sahiptir. Ancak MWCNT'lerin toksik özellik göstermesi endişelere sebep olabilmektedir. Çalışmamız akrilamidi azaltmak için MWCNT-Ald@*GkASNaz*'ın kullanılmasına yönelik bir ön çalışma niteliğindedir. Bu nedenle özellikle gıda endüstrisinde akrilamid giderici ajan olarak kullanımını sağlamak için toksisite çalışmaları gibi daha ayrıntılı ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

Adebo O. A., Kayitesi E., Adeyinka Adebisi J., Gbashi S., Temba M. C., Adeseye Lasekan A., Phoku J. Z., Njobeh P. B., (2017), "Mitigation of Acrylamide in Foods: An African Perspective", Editor: Reddy B., "Acrylic Polymers in Healthcare", IntechOpen.

Agrawal S., Sharma I., Prajapati B. P., Kumar Suryawanshi R., Kango N., (2018), "Catalytic characteristic and application of L-asparaginase immobilized on aluminum oxide pellets", International Journal of Biological Macromolecules, 114, 504-511.

Agrawal S., Kango N., (2019), "Development and catalytic characterization of L-asparaginase nano-bioconjugates", International Journal of Biological Macromolecules, 135, 1142-1150.

Aiswarya R., Baskar G., (2017), "Enzymatic mitigation of acrylamide in fried potato chips using asparaginase from *Aspergillus terreus*", International Journal of Food Science and Technology, 53(2).

Alagöz D., Toprak A., Yildirim D., Tükel S. S., Fernandez-Lafuente R., (2021), "Modified silicates and carbon nanotubes for immobilization of lipase from *Rhizomucor miehei*: Effect of support and immobilization technique on the catalytic performance of the immobilized biocatalysts", Enzyme and Microbial Technology, 144, 109739.

Alam S., Ahmad R., Pranaw K., Mishra P., Kumar Khare S., (2018), "Asparaginase conjugated magnetic nanoparticles used for reducing acrylamide formation in food model system", Bioresource Technology, 269, 121-126.

Alam S., Nagpal T., Singhal R., Kumar Khare S., (2021), "Immobilization of L-asparaginase on magnetic nanoparticles: Kinetics and functional characterization and applications", Bioresource Technology, 339, 125599.

Almeida M. R., Cristovao R. O., Barros M A., Nunes J. C. F., Boaventura R. A. R., Loureiro J. M., Faria J. L., Neves M. C., Freire M. G., Santos-Ebinuma V. C., Tavares A. P. M., Silva C. G., (2021), "Superior operational stability of immobilized L-asparaginase over surface-modified carbon nanotubes", Scientific Reports, 21529.

Bachir N., Haddarah A., Sepulcre F., Pujola M., (2022), "Formation, Mitigation, and Detection of Acrylamide in Foods", Food Analytical Methods, 15, 1736-1747.

Baskar G., Garrick B. G., Lalitha K., Chamundeeswari M., (2018), "Gold nanoparticle mediated delivery of fungal asparaginase against cancer cells", Journal of Drug Delivery Science and Technology, 44, 498-504.

Baskar G., Aiswarya R., (2018), "Overview on mitigation of acrylamide in starchy fried and baked foods", *Journal of the Science and Food and Agriculture*, 98(12), 4385-4394.

Basso A., Serban S., (2019), "Industrial applications of immobilized enzymes—A review", *Molecular Catalysis*, 479, 110607.

Batool T., Makky E. A., Jalal M., Yusoff M. M., (2016), "A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178, 900-923.

Bhagat J., Kaur A., Chadha B. S., (2016), "Single step purification of asparaginase from endophytic bacteria *Pseudomonas oryzae* exhibiting high potential to reduce acrylamide in processed potato chips", *Food and Bioproducts Processing*, 99, 222-230.

Cachumba J. J. M., Fernandes Antunes F. A., Dias Peres G. F., Brumano L. P., Dos Santos J. C., Da Silva S. S., (2016), "Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production", *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 77-85.

Castro D., C. Marques A. S., Almeida M. R., de Paiva G. B., Bento H. B. S., Pedrolli D. B., Freire M. G., Tavares A. P. M., Santos-Ebinuma V. C., (2021), "L-asparaginase production review: bioprocess design and biochemical characteristics", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 4515-4534.

Chand S., Mahajan R. V., Prasad J. P., Sahoo D. K., Mihooliya K. N., Dhar M. S., Sharma G., (2020), "A comprehensive review on microbial l-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications", *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 67(4), 619-647.

Correa C. L. O., das Mercedes Penha E., dos Anjos M. R., Pacheco S., Freitas-Silva O., Luna A. S., Fortes Gottschalk L. M., (2021), "Use of asparaginase for acrylamide mitigation in coffee and its influence on the content of caffeine, chlorogenic acid, and caffeic acid", *Food Chemistry*, 338, 128045.

Costa J. B., Lima M. J., Sampaio M. J., Neves M. C., Faria J. L., Morales-Torres S., Tavares A. P. M., Silva C. G., (2018), "Enhanced biocatalytic sustainability of laccase by immobilization on functionalized carbon nanotubes/polysulfone membranes", *Chemical Engineering Journal*, 355, 974-985.

Cristovao R. O., Almeida M. R., Barros M. A., Nunes J. C. F., Boaventura R. A. R., Loureiro J. M., Faria J. L., Neves M. C., Freire M. G., Ebinuma-Santos V. C., Tavares A. P. M., Silva C. G., (2020), "Development and characterization of a novel l-asparaginase/MWCNT nanobioconjugate", *RSC Advances*, 15.

Da Cunha M. C., dos Santos Aguilar J. G., de Melo R. R., Nagamatsu S. T., Ali F., Soares de Castro R. J., Sato H. H., (2019), "Fungal L-asparaginase: Strategies for production and food applications", *Food Research International*, 126, 108658.

Darvishi F., Jahanafrooz Z., Mokhtarzadeh A., (2022), "Microbial L-asparaginase as a promising enzyme for treatment of various cancers", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(17), 5335-5347.

Dias F. F. G., Gois Ruiz A. L. T., Torre A. D., Sato H. H., (2016), "Purification, characterization and antiproliferative activity of L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity", *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9), 785-794.

Dias F. F. G., Junior S. B., Hantao L. W., Augusto F., Sato H. H., (2017), "Acrylamide mitigation in French fries using native L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940", *LWT - Food Science and Technology*, 76, 222-229.

El-Gendy M. M. A. A., Awad M. F., El-Shenawy F. S., El-Bondkly A. M. A., (2021), "Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4", *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(4), 2540-2548.

El-Naggar N., Deraz S. F., El-Ewasy S. M., Suddek G. M., (2018), Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces broollosae* NEAE-115", *BMC Pharmacology and Toxicology*, 19(51).

Federsel H. J., Moody T. S., Taylor S. J. C., (2021), "Recent Trends in Enzyme Immobilization—Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox", *Molecules*, 26(9), 2822.

Gonçalves Filho D., Gonçalves Silva A., Guidini C. Z., (2019), "Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7399-7423.

Habimana P., Gao J., Mwizerwa J. P., Ndayambaje J. B., Liu H., Luan P., Ma L., Jiang Y., (2021), "Improvement of Laccase Activity Via Covalent Immobilization over Mesoporous Silica Coated Magnetic Multiwalled Carbon Nanotubes for the Discoloration of Synthetic Dyes", *ACS Omega*, 6, 2777-2789.

Haroun A. A., Ahmed H. M., H. Mossa A. T., Mohafrash S. M., Ahmed E. F., (2020), "Production, characterization and immobilization of *Aspergillus versicolor* L-asparaginase onto multi-walled carbon nanotubes", *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 10(4), 5733-5740.

Homaei A. A., Sariri R., Vianello F., Stevanato R., (2013), "Enzyme immobilization: an update", *Journal of Chemical Biology*, 6(4), 182-205.

Hong S. J., Lee Y. H., Khan A. R., Ullah I., Lee C., Kyu Park C., Shin J. H., (2014), "Cloning, expression, and characterization of thermophilic L-asparaginase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1", *Journal of Basic Microbiology*, 54(6), 500-508.

Jia M., Xu M., He B., Rao Z., (2013), "Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11-06", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(39), 9428-9434.

Jia R., Wan X., Geng X., Xue D., Xie Z., Chen C., (2021), "Microbial L-asparaginase for Application in Acrylamide Mitigation from Food: Current Research Status and Future Perspectives", *Microorganisms*, 9(8), 1659.

Jiao L., Chi H., Lu Z., Zhang C., Chia S. R., Show P. L., Tao Y., Lu F., (2020), "Characterization of a novel type I l-asparaginase from *Acinetobacter soli* and its ability to inhibit acrylamide formation in potato chips", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(6), 672-678.

Khalil N. M., Rodriguez-Couto S., Abd El-Ghany M. N., (2021), "Characterization of *Penicillium crustosum* L-asparaginase and its acrylamide alleviation efficiency in roasted coffee beans at non-cytotoxic levels", *Archives of Microbiology*, 203(5), 2625-2637.

Kishore V., Nishita K. P., Manonmani H. K., (2015), "Cloning, expression and characterization of L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens* for large scale production in *E. coli* BL21", *3 Biotech*, 5(6), 975-981.

Krishnapura P. R., Belur P. D., Subramanya S., (2016), "A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases", *Critical Reviews in Microbiology*, 42(5), 720-737.

Kumar S., Dasu V. V., Pakshirajan K., (2010), "Localization and production of novel l-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428", *Process Biochemistry*, 45(2), 223-229.

Li R., Zhang Z., Pei X., Xia X., (2020), "Covalent Immobilization of L-Asparaginase and Optimization of Its Enzyme Reactor for Reducing Acrylamide Formation in a Heated Food Model System", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 584758.

Lopes W., Dos Santos B. A. F., Sampaio A. L. F., Alves Fontao A. P. G., Nascimento H. J., Jurgilas P. B., Torres F. A. G., da Silva Bon E. P., Almeida R. V., Ferrera M. A., (2019), "Expression, purification, and characterization of asparaginase II from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli*", *Protein Expression and Purification*, 159, 21-26.

Maan A. A., Anjum M. A., Khan M. K. I., Nazir A., Saeed F., Afzaal M., Aadil R. M., (2022), "Acrylamide Formation and Different Mitigation Strategies during Food Processing – A Review", *Food Reviews International*, 38(1).

Maggi M., Chiarelli L. R., Valentini G., Scotti C., (2015), "Engineering of *Helicobacter pylori* L-Asparaginase: Characterization of Two Functionally Distinct Groups of Mutants", *PLoS One*, 10(2).

Meghavarnam A. K., Janakiraman S., (2018), "Evaluation of acrylamide reduction potential of L-asparaginase from *Fusarium culmorum* (ASP-87) in starchy products", *LWT*, 89, 32-37.

Mohamad N. R., Marzuki N. H. C., Buang N. A., Huyop F., Abdul Wahab R., (2015), "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes", *Agriculture and Environmental Biotechnology*, 29(2).

Monajati M., Borandeh S., Hesami A., Mansouri D., Tamaddon A. M., (2018), "Immobilization of L-asparaginase on aspartic acid functionalized graphene oxide nanosheet: Enzyme kinetics and stability studies", *Chemical Engineering Journal*, 354, 1153-1163.

Muneer F., Siddique M. H., Azeem F., Rasul I., Muzammil S., Zubair M., Afzal M., Nadeem H., (2020), "Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications", *Archives of Microbiology*, 202(5), 967-981.

Munir N., Anjum Zia M., Sharif S., Tahir I. M., Jahangeer M., Javed I., Riaz M., Sarwar M. U., Akram M., Ali Shah S. M., (2019), "L-Asparaginase potential in acrylamide mitigation from foodstuff: a mini-review", *Progress in Nutrition*, 21(3).

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

Nunes J. C. F., Cristovao R. O., Freire M. G., Santos-Ebinuma V. C., Faria J. L., Silva C. G., Tavares A. P. M., (2020), "Recent Strategies and Applications for L-Asparaginase Confinement", *Molecules*, 25(24), 5827.

Orhan H., Aktaş Uygun D., (2020), "Immobilization of L-Asparaginase on Magnetic Nanoparticles for Cancer Treatment", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(4), 1432-1443.

Özdemir F. İ., Orhan M. D., Atasavum Z. T., Tülek A., (2022), "Biochemical characterization and detection of antitumor activity of L-asparaginase from thermophilic *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263^T", *Protein Expression and Purification*, 199, 106146.

Patial V., Kumar V., Joshi R., Gupta M., Singh D., (2022), "Acrylamide mitigation in foods using recombinant L-asparaginase: An extremozyme from Himalayan *Pseudomonas* sp. PCH182", *Food Research International*, 162, 11936.

Pedreschi F., Granby K., Risum J., (2010), "Acrylamide Mitigation in Potato Chips by Using NaCl", *Food and Bioprocess Technology*, 3, 917-921.

Pokrovskaya M. V., Aleksandrova S. S., Pokrovsky V. S., Omeljanjuk N. M., Borisova A. A., Anisimova N. Y., Sokolov N. N., (2012), "Cloning, expression and characterization of the recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase", *Protein Expression and Purification*, 82(1), 150-154.

Pourhossein M., Korbekandi H., (2014), "Cloning, expression, purification and characterisation of *Erwinia carotovora* L-asparaginase in *Escherichia coli*", *Advanced Biomedical Research*, 3, 82.

Qeshmi F. I., Homaei A., Fernandes P., Javadpour S., (2018), "Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry", *Microbiological Research*, 208, 99-112.

Ravi A., Gurunathan B., (2017), "Acrylamide Mitigation in Fried Kochchi Kesel Chips Using Free and Immobilized Fungal Asparaginase", *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 51-57.

Rifai L., Saleh F. A., (2020), "A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies", *International Journal of Toxicology*, 39(2), 93-102.

Rigouin C., Nguyen H. A., Schalk A. M., Lavie A., (2017), "Discovery of human-like L-asparaginases with potential clinical use by directed evolution", *Scientific Reports*, 7(1), 10224.

Safary A., Moniri R., Hamzeh-Mivehroud M., Dastmalchi S., (2019), "Highly efficient novel recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity from a new halotolerant *Bacillus* strain", *BioImpacts*, 9(1), 15-23.

Sanghvi G., Bhimani K., Vaishnav D., Oza T., Dave G., Kunjadia P., Sheth N., (2016), "Mitigation of acrylamide by L-asparaginase from *Bacillus subtilis* KDPS1 and analysis of degradation products by HPLC and HPTLC", *SpringerPlus*, 5, 533.

Shakambari G., Ashokkumar B., Varalakshmi P., (2018), "L-asparaginase – A promising biocatalyst for industrial and clinical applications", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17, 213-224.

Shrivastava A., Khan A. A., Khurshid M., Kalam M. A., Jain S. K., Singhal P. K., (2016), "Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent", *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 100, 1-10.

Sivasankari M., Tariq A. L., Amutha R., (2018), "Role of asparaginase enzyme in food processing industry to reduce the acrylamide level-a review", *International Journal of Recent Scientific Research*, 9(6), 27660-27664.

Sudhir A. P., Agarwal V. V., Dave B. R., Patel D. H., Subramanian R. B., (2016), "Enhanced catalysis of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* by a rational redesign", *Enzyme and Microbial Technology*, 86, 1-6.

Takami H., Nishi S., Lu J., Shimamura S., Takaki Y., (2004), "Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench", *Extremophiles*, 8, 351-356.

Takami H., Takaki Y., Chee G. J., Nishi S., Shimamura S., Suzuki H., Matsui S., Uchiyama I., (2004), "Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*", *Nucleic Acids Research*, 32, 21.

Tarhan T., Ulu A., Sariçam M., Çulha M., Ates B., (2020), "Maltose functionalized magnetic core/shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ nanoparticles for an efficient L-asparaginase immobilization", *International Journal of Biological Macromolecules*, 142, 443-451.

Ulu A., Koytepe S., Ates B., (2016), "Design of starch functionalized biodegradable P(MAA-co-MMA) as carrier matrix for L-asparaginase immobilization", *Carbohydrate Polymers*, 153, 559-572.

Ulu A., Noma S. A. A., Koytepe S., Ates B., (2019), "Chloro-Modified Magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@MCM-41$ Core-Shell Nanoparticles for L-Asparaginase Immobilization with Improved Catalytic Activity, Reusability, and Storage Stability", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(3), 938-956.

Ulu A., Karaman M., Yapıcı F., Naz M., Sayın S., Saygılı E. İ., Ateş B., (2019), "The Carboxylated Multi-walled Carbon Nanotubes/L-Asparaginase Doped Calcium-Alginate Beads: Structural and Biocatalytic Characterization", *Catalysis Letters*, 150, 1679-1691.

Ulu A., Ateş B., (2017), "Immobilization of L-Asparaginase on Carrier Materials: A Comprehensive Review", *Bioconjugate Chemistry*, 28(6), 1598-1610.

Xu F., Oruna-Concha M. J., Elmore J. S., (2016), "The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food", *Food Chemistry*, 210, 163-171.

Yassin M. A., Shindia A., Labib M., Soud M., El-Sayed A. S. A., (2022), "Thermostable Chitosan-L-Asparaginase conjugate from *Aspergillus fumigatus* is a novel structurally stable composite for abolishing acrylamide formation in French fried potatoes", *LWT*, 162, 113494.

Zuo S., Zhang T., Jiang B., Mu W., (2015), "Reduction of acrylamide level through blanching with treatment by an extremely thermostable L-asparaginase during French fries processing", *Extremophiles*, 19(4), 841-851.

Zuo S., Zhang T., Jiang B., Mu W., (2015), "Recent research progress on microbial L-asparaginases", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1069-1079.

ÖZGEÇMİŞ

Burcu KARAASLAN, 2016 yılında lisans eğitimine başladığı Yıldız Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü 2020 yılında başarıyla tamamlayarak aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.