

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİK OSMOLİTLERİN TERMOFİLİK GEOBACILLUS
KAUSTOPHILUS DSM 7263^T L-ASPARAJİNAZ ÜZERİNDEKİ KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE AKRİLAMİDİN GİDERİMİNDEKİ
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

ÖZGE DEMİRTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ. DR. FATMA İNCİ ÖZDEMİR

MART 2024

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BİYOLOJİK OSMOLİTLERİN TERMOFİLİK GEOBACILLUS
KAUSTOPHILUS DSM 7263^T L-ASPARAJİNAZ ÜZERİNDEKİ
KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI VE AKRİLAMİDİN
GİDERİMİNDEKİ ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

ÖZGE DEMİRTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: DOÇ.DR. FATMA İNCİ ÖZDEMİR

MARCH 2024

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF
BIOLOGICAL OSMOLİTES ON THERMOPHILIC
GEOBACILLUS KAUSTOPHILUS DSM 7263^T L-
ASPARAGINASE AND DETERMINATION OF
THEIR EFFECT ON ACRYLAMIDE REMOVAL**

ÖZGE DEMİRTAŞ

A THESIS OF MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

ADVISOR: ASSOC. DR. FATMA İNCİ ÖZDEMİR

MARCH 2024

YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 12/02/2024 tarih ve 2024/13 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 01/03/2024 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Özge DEMİRTAŞ'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. F. İnci ÖZDEMİR

ÜYE

: Prof. Dr. Melek ÖZKAN

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet TÜLEK

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

L-asparajinazlar, L-asparajinden aspartik asit ve amonyak oluşumunu kataliz eden amino hidrolaz grubuna ait enzimlerdir. Bu enzimler günümüzde kemoterapötik ajan olarak ilaç endüstrisinde ve L-asparajini hidroliz etme yeteneğinden dolayı gıda ürünlerinin kızzartılması sırasında akrilamid oluşumunun inhibisyonu ile gıda endüstrisinde kullanılmaktadır.

L-asparaginaz gibi ilaç ve gıda endüstrilerinde önemli uygulamaları olan enzimler çevresel etmenlere karşı oldukça duyarlıdır. Enzimlerin inaktivasyonları veya etkinliklerinin azalması sıcaklık, ortam pH'sı, denatüre edici ajanlar gibi birçok faktörün etkisi ile gerçekleşir. Bu nedenle enzimlerin stabilizasyonu aktivitelerinin korunması açısından zorunlu hale gelmiştir. Protein agregasyonu hem gıda hem de ilaç endüstrisinde önemli bir sorundur. Protein stabilitesini arttırmak için kullanılan popüler stratejilerden biri, katlanmış proteinleri destekleyen şekerler, polioller ve nötr amino asitler gibi küçük organik moleküller olan ozmolitlerin kullanılmasıdır.

Bu tez çalışmasında *Geobacillus kaustophilus*'tan elde edilen *GkASNaz* enziminin ozmolitler ile kullanarak stabilitesinin korunması ve aynı zamanda akrilamid giderimindeki etkinliğinin arttırılması amaçlanmıştır. Seçilen ozmolitler arasında *GkASNaz* 30 günlük depolama süresinde en yüksek kararlılığı maltoz ve arjinin varlığında göstermiştir. Maltoz 37°C ve 55°C'de, düşük pH aralığında (pH 5.0 ve pH 7.0) aktivitesini yaklaşık 2 kat arttırmıştır. Maltoz ve arjinin ozmolitlerin varlığında enzimin optimum sıcaklığı değişmemiş ayrıca 55°C sıcaklığın altında ve üstündeki derecelerde enzim aktivitesi artış göstermiştir. 2 gün ozmolitler varlığında +4°C'da inkübe edilmiş olan *GkASNaz*'ın K_m değerleri 37 ve 55°C'da kontrollerine kıyasla azalmış ve V_{max} değerleri artmıştır. Bu sonuçlar, enzimin katalitik etkinliğinin ozmolitlerin varlığıyla arttığını ve maltozun arjininden daha etkili olduğunu göstermiştir. *GkASNaz*'ın arjinin aracılı stabilizasyonu, enzimatik aktiviteyi arttırmıştır; 12. sa'tin sonunda 37°C'de %83, 55°C'de ise %77 olarak belirlenmiştir. Ozmolitler varlığında +4°C'da 2 gün inkübe edilen *GkASNaz* 15 dk'lık reaksiyonda akrilamid giderimini 1.7 kat arttırmıştır.

Anahtar kelimeler: L-asparajinaz, *Geobacillus kaustophilus*, Ozmolit, Akrilamid, Arjinin, Maltoz.

ABSTRACT

L-asparaginases are enzymes belonging to the group of amino hydrolases that catalyse the formation of aspartic acid and ammonia from L-asparagine. These enzymes are currently used in the pharmaceutical industry as chemotherapeutic agents and in the food industry by inhibition of acrylamide formation during frying of food products due to its ability to hydrolyse L-asparagin. L-asparaginase, which have important applications in pharmaceutical and food industries, are very sensitive to environmental factors. Inactivation or decrease in the activity of enzymes occurs under the influence of many factors such as temperature, ambient pH, denaturing agents. Therefore, stabilisation of enzymes has become mandatory for the preservation of enzyme activity. Protein aggregation is an important problem in both food and pharmaceutical industries. One of the popular strategies used to increase protein stability is the use osmolytes, which are small organic molecules such as sugars, polyols and neutral amino acids that support folded proteins.

In this thesis, it was aimed to maintain the stability of *GkASNase* enzyme obtained from *Geobacillus kaustophilus* by using osmolytes and to increase its efficiency in acrylamide removal. Among the selected osmolytes, *GkASNase* showed the highest stability in the presence of maltose and arginine during 30 days of storage. Maltose increased its activity about 2-fold at 37 and 55°C in the low pH range (pH 5.0 and pH 7.0). In the presence of maltose and arginine osmolytes, the optimum temperature of the enzyme did not change and enzyme activity increased at temperatures below and above 55°C. K_m values of *GkASNase* incubated at +4°C in the presence of osmolytes for 2 days decreased and V_{max} values increased at 37 and 55°C compared to controls. These results showed that the catalytic activity of the enzyme increased with the presence of osmolytes and maltose was more effective than arginine. Arginine-mediated stabilisation of *GkASNase* at elevated temperature helped to maintain the enzymatic activity; at the end of 12 h, the enzyme activity was 83% at 37°C and 77% at 55°C. At 55°C, *GkASNase* incubated at +4°C for 2 days in the presence of osmolytes increased acrylamide removal 1.7 times in 15 minutes reaction.

Keywords: L-asparjinase, *Geobacillus kaustophilus*, Osmolyte, Acrylamide, Arjinine, Maltose.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimleri ile yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, sabırla ve özveriyle her konuda fikir veren, tez çalışmam süresince önümde rehber olan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. F. İnci ÖZDEMİR'e,

Tez çalışmamın akrilamid giderimi ile ilgili enstrümental analiz bölümlerinde bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyerek bu konuları öğrenmemde katkıları büyük olan sevgili hocam Prof. Dr. Deniz YILDIRIM'a

Tez çalışmama katkı ve eleştirileri ile destek veren, tez jürisinde bulunan değerli hocalarım Prof. Dr Melek Özkan ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet TÜLEK'e

Yüksek lisans tez sürecimde ortak laboratuvarı paylaştığımız, güler yüzünü esirgemeyen hocam Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK ve ekibine,

Çalışmalarım boyunca karşılaştığım her türlü zorlukta yanımda olan, tecrübelerinden yararlandığım ve yüksek lisansın bana kazandırdığı en değerli arkadaşlarımla olan, Gözde ŞÜKÜR ve Burcu KARAASLAN'a

Yüksek lisans tez sürecimde bana desteği ile her zaman yanımda olan değerli müdürüm Nihan UYSAL ve tüm ekip arkadaşlarıma,

Her zaman yanımda en kıymetli destekçim olan ve göstermiş olduğu fedakârlık ve sabrından dolayı sevgili eşim Özgecan DEMİRTAŞ'a,

Son olarak bana çalışmalarım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen daha da önemlisi duydukları güvenle her zaman yanımda olduklarını hissettiren babam Muammer ÖZDEL, annem Havva Özdel'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. L-Asparaginazın Hidroliz Mekanizması	2
1.2. L-Asparaginazların Uygulama Alanları	2
1.2.1. L-ASNaz'ın Kemoterapötik Etkisi	3
1.2.2. L-ASNaz'ın Gıda Endüstrisinde Kullanımı	4
1.3. OZMOLİTLER	7
1.3.1. Ozmolitlerin Etki ve Stabilizasyon Mekanizması	11
1.3.2. Ozmolit-Protein Etkileşiminin Moleküler Mekanizması	12
2. MALZEME ve YÖNTEM	15
2.1. Malzemeler	15
2.1.1. Kullanılan Mikroorganizma Suşu ve Plazmit Vektör	15
2.1.2. Kullanılan Enzimler ve Kitler	15
2.1.3. Kullanılan Protein Moleküler Belirteci	15
2.1.4. Saflaştırmada Kullanılan Malzemeler	16
2.1.5. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	16
2.1.6. Kullanılan Kimyasallar	21
2.1.7. Kullanılan Cihazlar	21
2.2. Yöntemler	22
2.2.1. <i>GkASNaz</i> Enziminin Ekspresyonu	22

2.2.2. Asparajinaz Enziminin Saflaştırılması	23
2.2.3. SDS-PAGE Analizi	24
2.2.4. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	24
2.2.5. <i>GkASNaz</i> Aktivitesinin Belirlenmesi	25
2.2.6. Farklı Ozmolit Konsantrasyonlarının <i>GkASNaz</i> Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	24
2.2.7. Ozmolitler varlığında <i>GkASNaz</i> aktivitesi üzerine pH'ın Etkisi	26
2.2.8. Ozmolitlerin Varlığında <i>GkASNaz</i> Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	25
2.2.9. Ozmolit Varlığında <i>GkASNaz</i> 'ın Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi	26
2.2.10. Ozmolit Varlığında <i>GkASNaz</i> 'ın Termal Kararlılığının Belirlenmesi	27
2.2.11. Ozmolit Varlığında <i>GkASNaz</i> 'ın Depolama Kararlılığının Belirlenmesi	28
2.2.12. Ozmolit Varlığında Metal İyonlarının <i>GkASNaz</i> Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	27
2.2.13. Ozmolit Varlığında Enzimin Akrilamid Giderim Potansiyelinin Belirlenmesi	27
3. SONUÇLAR	30
3.1. <i>GkASNaz</i> Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması	30
3.2. Asparajinaz Aktivitesinin Belirlenmesi	32
3.3. Farklı Ozmolit Konsantrasyonlarının <i>GkASNaz</i> Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	33
3.4. Ozmolit Varlığında <i>GkASNaz</i> 'ın Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi	34
3.5. Ozmolit Varlığında pH'ın <i>GkASNaz</i> Aktivitesi Üzerine Etkisi	35
3.6. Osmolit Varlığında Sıcaklığın <i>GkASNaz</i> Aktivitesi Üzerine Etkisi	36
3.7. Osmolit Varlığında Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi	37
3.8. Osmolit Varlığında Enzimin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi	39
3.9. Ozmolit Varlığında Çeşitli Metal İyonlarının (5 mM) L Asparaginaz Aktivitesine Etkisi	40
3.10. Ozmolit Varlığında Enzimin Akrilamid Giderim Potansiyeli Üzerine Etkisi	41
4. TARTIşMA VE SONUÇ	43
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİş	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

~	: Yaklaşık
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
CD	: Circular Dichroism
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
dH ₂ O	: Distile Su
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>Gk</i>	: <i>Geobacillus kaustophilus</i>
<i>GkASNazII</i>	: <i>Geobacillus kaustophilus</i> L-Asparajinaz
HCl	: Hidroklorik Asit
His	: Histidin
IPTG	: İzopropil-Beta-D-tiyogalaktopiranozit
KCl	: Potasyum Klorür
kDa	: Kilodalton
kV	: Kilo Volt
L	: Litre
LB	: Luria-Bertani Broth
M	: Molar
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mw	: Moleküler ağırlık
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
NaCl	: Sodyum Klorür
nm	: Nanometre
PAGE	: Poliakrilamit Jel Elektroforezi
Rpm	: Dakika Başı Dönüş
sa	: Saat
SDS	: Sodyum Dodesilsülfat Salt
TCA	: Trikloro Asetik Asit
TEMED	: Tetrametiletildiamin
U	: Ünite
V	: Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1: Maillard reaksiyonu ile akrilamid oluşumu.	6
Şekil 2 1: Protein moleküler belirteci (Thermo Scientific).	16
Şekil 3 1: Rekombinant <i>E. coli</i> RosettaTM 2 (DE3) hücrelerinden elde edilen hücre özütünün %12'lik SDS-PAGE analizi.	41
Şekil 3 2: Afinite kromatografisi elüsyon fraksiyonlarının SDS-PAGE analizi.	31
Şekil 3 3: Saflaştırılmış proteinin SDS-PAGE analizi.	31
Şekil 3.4: Çeşitli ozmolitlerin farklı konsantrasyonlarının <i>GkASNaz</i> aktivitesi üzerine etkisi.	44
Şekil 3.5: <i>GkASNaz</i> 'ın ozmolitler varlığında ve yokluğunda +4°C'de depolama kararlılığı.	45
Şekil 3.6: Maltoz ve arjinin varlığında pH'ın <i>GkASNaz</i> aktivitesi üzerindeki etkisi.	46
Şekil 3.7: <i>GkASNaz</i> 'ın maltoz ve arjinin varlığında pH stabilitesi.	36
Şekil 3.8: Maltoz ve arjinin varlığında sıcaklığın <i>GkASNaz</i> aktivitesi üzerine etkisi.	47
Şekil 3.9: Maltoz ve arjinin varlığında <i>GkASNaz</i> 'ın Michaelis-Menten grafikleri.	38
Şekil 3.10: Maltoz ve arjinin varlığında <i>GkASNaz</i> 'ın termal kararlılığı.	40
Şekil 3.11: Arjinin ve maltoz varlığında metal iyonlarının <i>GkASNaz</i> aktivitesi üzerine etkisi.	52

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1: <i>GkASNaz</i> enziminin saflaştırma sonuçları.	32
Tablo 3.2: Maltoz ve arjinin varlığında <i>GkASNaz</i> 'ın kinetik parametrelerinin karşılaştırılması.	50
Tablo 3.3: <i>GkASNaz</i> ın maltoz ve arjinin varlığında termal stabilite parametreleri.	40



1. GİRİŞ

L-asparajinaz enzimi (EC 3.5.1.1., L-ASNaz) L-asparajin amino asidini L-aspartat ve amonyuma parçalayan bir amidohidrolazdır. Bu enzim, diğer hidrolazlardan farklı olarak karbon-azot bağları üzerinde etki göstermekte ve L-asparajin amino asidinin amid yan zincirinin bir molekül H_2O ile hidrolizini katalizleyerek bir molekül amonyak ve bir molekül L-aspartik asit açığa çıkarmaktadır.

Hem L-asparajin amino asidi hem de L-ASNaz enzimi bakterilerden memeli hayvanlara kadar tüm organizmalarda önemli roller üstlenmektedir. Günümüze kadar mikroorganizmalardan (bakteri, mantar, maya ve aktinomiset) daha yüksek organizmalara (bitki, omurgalı ve hayvan dokuları) kadar çok çeşitli kaynaktan izole edilen L-asparajinazlar bulunmakla beraber mantar ve bakteri kaynaklı L-asparajinazlar, görece basit üretim metotları ile yüksek miktarda üretilbildiklerinden, diğer organizmalara ait L-asparajinazlara tercih edilmektedirler (Kumar ve ark., 2012; Batool ve ark., 2016).

L-ASNaz aktivitesine sahip enzimler gen dizilerine ve yapısal homolojilerine dayanarak tip I ve tip II olarak adlandırılan bakteriyel ve tip III olarak adlandırılan bitki kökenli olmak üzere iki aileden oluşmaktadır (Michalska ve ark., 2006). Tip I asparajinazlar belli oranda sürekli olarak sentezlenen sitoplazmik enzimlerdir, tip II asparajinazlar ise bakterinin büyüme şartlarına bağlı olarak periplazmaya salgılanan enzimlerdir (Borek ve ark., 2001; El-Naggar ve ark., 2014). Tip I ve tip II asparajinazlar L-asparajin ve L-glutamin enzimatik aktivite ile karakterize edilmektedirler. Bununla birlikte, tip II asparajinazlar L-asparajine karşı daha yüksek özgül afinite göstermektedir (Costa ve ark., 2016).

L-asparajinazlar mono-, di- ve hekzamerik formlarda bulunsa da bu enzim için en yaygın formu birbirine eş 4 alt birimin bir araya gelerek oluşturduğu bir tetramerik yapıdır (Batool ve ark., 2016; Muneer ve ark., 2020). Alt birimlerin büyüklüğü organizmadan organizmaya farklılık göstermekle birlikte, bir L-ASNaz molekülünün moleküler ağırlığı 140 ile 160 kDa arasında değişmektedir (Aung ve ark., 2000; Aghaiypour ve ark., 2001; Kozak ve ark., 2002). 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 amino asitten meydana gelmektedir. Enzimin aktif bölgesi iki bitişik monomer arasında bulunmaktadır. Bu nedenle L-ASNaz tetrameri, iki dimerden oluşan bir dimer olarak düşünülebilir ancak enzim sadece tetramer formundayken aktiftir (Swain ve ark., 1993; Khushoo ve ark., 2004; Batool ve ark., 2016).

1.1. L-Asparaginazın Hidroliz Mekanizması

L-ASNaz'ın hidroliz mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte şimdiye kadar önerilen iki farklı kavram mevcuttur. Birinci mekanizmaya göre, bir nükleofil olarak Thr, L-Asn'nin karboksamid karbonuna atakta bulunur ve ardından amonyak salınır. Bu katalitik adım, amonyak aktif bölgeyi terk ettiğinden geri dönüşüm gerçekleşemez. İkinci nükleofilik saldırı, doğrudan bir su molekülü tarafından meydana gelir ve ikinci ürün olan L-Asp'nin salınmasına neden olur. Önerilen ikinci mekanizma, klasik serin proteazların iki aşamalı pinpon mekanizmasına benzer. Bu mekanizmaya göre L-ASNaz, iki reaksiyon yolunun farklı adımlarında çalışan iki katalitik üçlü içerir (*Escherichia coli* tip II L-ASNaz'da sırasıyla Thr12-Tyr25-Glu283 ve Thr89-Asp90-Lys162). İlk adımda, Thr12'nin L-Asn'nin karboksamid karbonu üzerindeki nükleofil saldırısı, bir kovalent asil-enzim ara ürünü ve ardından amonyak salınımı ile sonuçlanır. Bir sonraki adımda, ikinci üçlünün treonin su molekülünü aynı karbon üzerindeki nükleofilik saldırısı için aktive eder, bu da asil-enzim ara ürününün kırılmasına ve ikinci ürün olan L-Asp'ın salınmasına neden olur (Swain ve ark., 1993; Batool ve ark., 2016; Lubkowski ve ark., 2020; Jia ve ark., 2021). Katalitik mekanizmayı belirlemeye yönelik yapılan bu çalışmalar farklı sınıflardaki asparajinin enzimatik hidroliz mekanizmalarının da farklı olabileceğini göstermiştir (Pokrovskaya ve ark., 2022). Diğer enzimlerde olduğu gibi L-ASNaz'ların katalitik süreçte rol oynayan en önemli amino asit kalıntılarının tahmin edilmesi ve enzimin özelliklerinin geliştirilmesi teorik çalışmalar ve pratik deneyim ile mümkün kılınmıştır.

1.2. L-Asparaginazların Uygulama Alanları

L-Asparaginaz, ilaç ve gıda endüstrilerinde çeşitli uygulamaları olan önemli bir enzimdir.

1.2.1. L-ASNaz'ın Kemoterapötik Etkisi

L-Asparjinaz enzimi ilk kez 1904 yılında bir Alman kimyager olan Ernst Abbe tarafından sığır pankreas dokularında tespit edilmiştir. Karl Lang'ın keşfi, daha sonra Clementi tarafından doğrulanıp, 1922 yılında yayımlanmıştır. Clementi'nin çalışması, L-asparjinaz enziminin amido-hidrolik aktivitesinin sadece omnivor hayvanların tüm dokularında bulunduğunu ve etçil hayvanların organlarında bulunmadığını göstermiştir (Clementi, 1922). L-Asparjinaz'ın anti-kanser etkileri, William J. Kidd tarafından daha ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır. Kidd, kobay serumunun anti-tümör özelliklerini inceleyerek L-Asparjinaz'ın kanser hücrelerinin büyümesini durdurma veya azaltma yeteneğini keşfetmiştir. Bu çalışmalar, L-Asparjinaz'ın kanser tedavisinde potansiyel bir araç olarak kullanılmasına yol açmıştır (Kidd ve ark., 1953). Neuman ve McCoy 1956 yılında yaptıkları çalışmada L-asparajinin varlığı ve yokluğunun tümör hücreleri ile normal hücreler arasındaki metabolik farklılıkları göstermişlerdir (McCoy ve ark., 1956). Broom ve diğer araştırmacılar, kobay serumunun anti-tümör aktivitesini L-asparjinaz enzimi tarafından L-asparajin tüketimiyle ilişkilendirmişlerdir. Bu araştırmalar, L-ASNaz enziminin kanser hücrelerinin büyümesini engellemek için L-asparajini yıkarak, kanser hücrelerinin ihtiyaç duyduğu bu amino asidi tüketerek çalıştığını göstermiştir. Kobay serumundaki L-ASNaz, kanser hücrelerinin büyümesini etkili bir şekilde kontrol edebilir ve bu nedenle kanser tedavisinde kullanılan bir ajan haline gelmiştir (Broome ve ark., 1963).

L-asparaginaz en yaygın olarak akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde kullanılmaktadır. Lösemi türlerinden biri olan ALL genellikle çocukluk döneminde görülür ve lenfoblast adı verilen genç lenfosit hücrelerinin anormal bir şekilde çoğalması sonucu ortaya çıkar. L-Asparjinaz, lenfoblast hücre ölümüne yol açan serum asparajinini tüketir ve dolayısıyla onu ALL için yararlı bir kemoterapötik ilaç haline getirir (Jiang ve ark., 2021). L-Asparjinaz, serum asparajinini aspartik aside dönüştürür. Sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında, asparjin, lösemik hücrelerde asparjin sentetaz enzimi bulunmadığından onlar için esansiyel bir amino asit olarak kabul edilir (Cachumba ve ark., 2016)

L-asparajin sentetaz enzimini eksprese eden sağlıklı hücrelerin aksine, çoğunlukla lenfoid kökenli olan kanser hücreleri, L-asparajin bakımından oksotrof oldukları için

hızlı ve malign büyüme, yayılma ve hayatta kalma gibi metabolik ihtiyaçları için kan serumundan eksojen L-asparajin tedariğine güvenirler (Shakambari ve ark., 2019). Bu nedenle, kan serumundan L-ASNase tarafından L-asparajinin hidrolizi, kanser hücrelerinin p53'e bağımlı apoptozuna yol açarken, sağlıklı hücreler etkilenden kalır.

L-asparaginaz lenfoblastik lösemiden başta olmak üzere retikül sarkomu, Hodgkin hastalığı, akut miyelositik lösemi, akut miyelomonosit lösemi, kronik lenfositik lösemi ve limfosaekoma melanosarkoma gibi hastalıklarda Uzun yıllardır sağlık seköründe terapötik ajan olarak kullanılmaktadır (Abbas ve ark., 2010; Gulati ve ark., 1997).

Günümüzde FDA onaylı akut lenfoblastik ve lenfosarkoma tedavisinde kullanılan 3 tip ilaç bulunmaktadır. Bunlardan ilki doğal *E. coli* türevli L-ASNaz olarak Elspar®, Kidrolase®, ikincisi *E. coli* türevli L-ASNaz'ın polietilen glikol (PEG) ile kovalent bağlanması sonucunda oluşturulan Oncaspar® (Pegaspargase), üçüncüsü ise *E. chrysanthemi* türevli L-ASNaz olarak kullanılan Crisantaspase® ve Erwinase®'dir (Avramis ve ark., 2006; Izadpanah ve ark., 2018; Chand ve ark., 2020; Muneer ve ark., 2020).

1.2.2. L-ASNaz'ın Gıda Endüstrisinde Kullanımı

Gıdaların birtakım özelliklerini iyileştirmek ve güvenliğini artırmak için sıcaklıkla muamele edilmesi geçmişten günümüze evsel ve endüstriyel tüm sektörlerde uygulanmaktadır. Yüksek sıcaklıkla birlikte gıdalarda gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar yeni bileşiklerin oluşmasına neden olmaktadır (Park ve ark., 2009). Kimyasal tepkime sonucu oluşan bu moleküllerin bazılarının sağlık açısından pozitif etkilere sahipken bazılarının ise (akrilamid gibi) toksik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Studer ve ark., 2004).

Amino ile karbonil gruplarının etkileşimi sonucu meydana gelen bir reaksiyon olan maillard reaksiyonu; gıdaların renk, tat ve koku gibi karakteristik özelliklerini iyileştirmesine rağmen gıdaların besin değerinde kayıplara neden olmaktadır. Akrilamid düşük kütleli, kristal yapıda, suda yüksek çözünürlüğe sahip, kendine özgü renk ve kokusu olmayan sentetik bir maddedir (Rachwa-Rosiak ve ark.,2015; Squeo ve ark.,2023). İnsan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olduğu tespit edilen

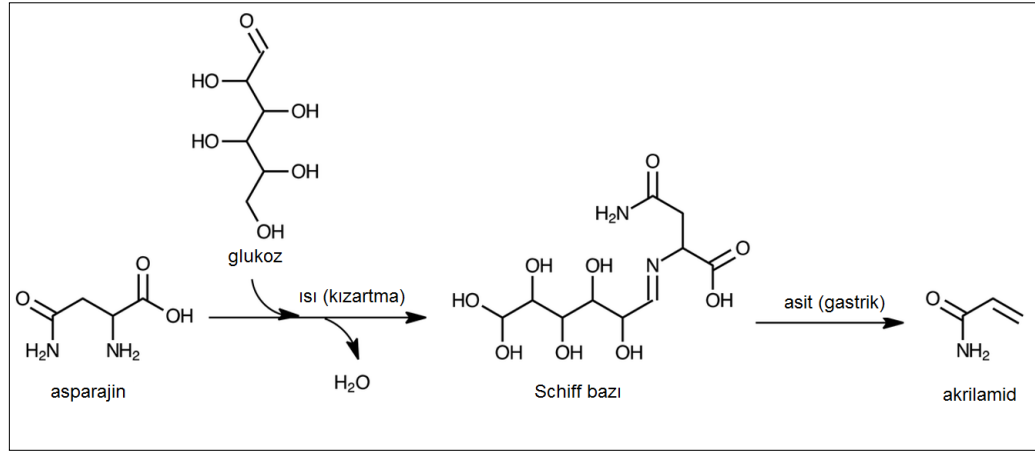
akrilamid, 1994 yılında Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (IARC) tarafından insanlar için olası bir kanserojen (Grup 2A) olarak sınıflandırılmıştır (IARC,1994).

İnsanlar akrilamide inhalasyon, dermal ve oral yollarla maruz kalmakla beraber en önemli akrilamid maruziyet yollarından bir tanesi gıda tüketimidir (Rifai ve ark., 2020).

Akrilamidin insanlar üzerindeki sağlık etkileri tam olarak anlaşılamadığından, aşırı işlenmiş gıdalardan kaçınmak ve daha sağlıklı yöntemleri tercih etmek gibi maruziyeti azaltmak önemlidir.

Kanserojen, genotoksik ve sitotoksik bir bileşik olan akrilamid, asparajin ve indirgen şekerler gibi karbonil bileşiklerinin reaksiyonu ile oluşur. Maillard reaksiyonu, akrilamid oluşumu için birincil süreçtir. 120°C'den yüksek sıcaklıklarda karbonhidratlar açısından zengin gıdaların pişirme sürecinde nonenzimatik Maillard reaksiyonu adı verilen tepkime ile serbest haldeki L-asparajin gibi amino asitlerin α -amino grubu, indirgenen şekerin karboksil grubu ile birleşerek akrilamid açığa çıkarmaktadır (Şekil 1.1) (Mottram ve ark., 2002). Serbest ASN ve indirgen şekerlerin yanı sıra gıda bileşenlerindeki nem içeriğinin varlığı, Maillard reaksiyonu yoluyla akrilamid oluşumuna yol açan en önemli faktör olarak kabul edilmektedir (Brandt ve ark., 2019).

Maillard reaksiyonu aynı zamanda kızarmış ya da fırınlanmış gıdalardaki istenilen görüntü ve tadın oluşumundan sorumludur. Akrilamidin öncül maddesi olan serbest L-asparajinin, en fazla tüketilen besin maddelerinden biri olan patatesteki miktarının kilogram başına 940 mg olması, toplam aminoasit içeriğinin %40'ını oluşturması ve yüksek miktarda akrilamid oluşturma potansiyeli nedeniyle sağlık açısından tehlike arz etmektedir (Mottram ve ark., 2002). Bu bağlamda kızarmış patates, kahve, cips, bisküvi ve ekmek akrilamid içeriği yüksek besinler arasında bulunmaktadır (Rosén ve ark., 2002).



Şekil 1.1: Maillard reaksiyonu ile akrilamid oluşumu.

Fırıncılık ürünleri, patates, cips, kahve gibi yüksek miktarda akrilamid içeren ürünlerin fazla miktarda tüketilmesi bu ürünlerde akrilamidin azaltılmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Akrilamid oluşumunu azaltma stratejileri, çeşitli yaklaşımlar yoluyla indirgen şekerler ve ASN gibi temel öncülleri kontrol etmeye odaklanmıştır. Gıdalardaki bu akrilamidin azaltılmasına yönelik bir araç olarak öngörülen asparajinaz enzimi, ısıl işlem parametrelerinde ve ürün formülasyonlarında herhangi bir değişiklik yapmayı gerektirmemesi ve duyusal özellikleri koruması gibi nedenlerle iyi bir seçenek olarak öne çıkmaktadır (Lone, 2018).

Bu tez kapsamında akrilamidin hazır gıdalardan giderilmesi pratik bir uygulama olmadığından, gıdalar pişirilmeden önce akrilamidin oluşumunun önlenmesine yönelik stratejilere odaklanılmıştır. Akrilamid oluşumunu engellemek amacıyla, hazırlanma aşamasında süre ve ısı değişikliği yapılabileceği gibi, un bazlı fırınlanan gıdalarda tariflere sitrik asit ya da kalsiyum iyonunu eklemek, indirgeyici şekerlerin yerine sükroz kullanmak ya da asparajin içeriği düşük un kullanmak tercih edilebilecek uygulamalar arasında yer almaktadır. Patates bazlı gıda ürünleri için ise düşük şeker içeren patates türlerinin tercih edilmesi, tariflere amino asit ya da kalsiyum eklenmesi ve pH'ın düşürülmesi söz konusudur. Bu yöntemler akrilamidin etkili bir şekilde azaltılmasını sağlasa da gıdanın duyusal özellikleri tehlikeye girmiştir. Maillard reaksiyonu gıdaların ısıtılmasıyla başladığı için, bu tip azaltma yönteminde ilk seçenek sıcaklığı ve ısıtma süresini azaltmaktır. Bununla birlikte, Maillard reaksiyonu aynı zamanda pişmiş gıdada arzu edilen tat ve kokunun oluşmasından da sorumlu olduğundan, pişirme sıcaklığı önemli ölçüde azaltıldığında

duyusal özellikler kabul edilemez hale gelir (Masi ve ark., 2013). Birçok yazar, sitrik asit gibi bileşikler kullanarak pH'ı düşürerek akrilamid oluşumunu azaltmıştır (Baumgartner ve ark., 2004) ancak bu yaklaşım kullanıldığında ürün kalitesi genel olarak olumsuz etkilenmiştir (Vinci ve ark., 2012).

Gıda ürünlerinde enzim destekli akrilamid giderimi için farklı kaynaklardan elde edilen asparajinazlar ön işleme tabi tutularak test edilmiştir. Sıkça tüketilen besin maddelerindeki akrilamid oluşumunu önlemek amacıyla *Aspergillus oryzae* kaynaklı bir asparajinaz olan Acrylaway® ve *Aspergillus niger* kaynaklı asparajinaz PreventASe® ticari olarak kullanılmaktadır (Batoool ve ark., 2016).

Gıdaların kızartılmadan ya da fırınlanmadan önce belirli bir süre L-ASNaz ile muamele edilmesinin, sonuçta oluşan akrilamid miktarını %95 oranında azalttığı görülmüştür. L-ASNaz'ın seçici olarak serbest asparajini aspartik asit ve amonyağa parçalaması ile gıda maddesi içindeki amino asitlerin büyük çoğunluğu bu işlemde etkilenmediğinden besin değerinde kayda değer bir düşüş görülmemektedir. Elde edilen sonuçlara göre karsinogenik özellikteki akrilamid giderimini büyük ölçüde azaltmaktadır (Munir ve ark., 2019).

1.3. Osmolitler

Biyokatalizörler olarakta bilinen enzimler son zamanlarda biyokimyasal reaksiyonları endüstriyel ölçeğe taşımak için dikkat çekmektedir (Schmid ev ark., 2001) Enzimlerin doğası, yüksek özgülük, yüksek devir sayıları (turnover number), biyolojik olarak parçalanabilirlik ve ticari kimyasallardan gelişmiş farmasötik ara ürünlere kadar üretim gibi oldukça elverişli reaksiyon koşulları yaratmaktadır. Bununla birlikte, enzimlerin karmaşık moleküler yapıları ile ilgili bazı dezavantajların ele alınması gerekmektedir. Bu anlamda, yüksek ölçekli proseslerde enzimlerin kararlılığını artırmak için kimyasal modifikasyonlar, immobilizasyon, mutajenez ve yardımcı çözümler veya yardımcı çözümler olarak bilinen kimyasalların eklenmesi gibi farklı stratejiler kullanılmaktadır (Lyer ve ark., 2008).

Osmolitler, proteinlerin katlanmış halini destekledikleri için iyi bilinen biyokatalizör stabilizatörleridir. Hücre içi küçük, nötr organik moleküllerden oluşan bir sınıf olan osmolitler, ozmoz ve diğer stres koşullarından arındırılmalarını önleyerek hücrelerde birikir. Katlanmamış proteinin serbest enerjisini yükselterek katlanmış hal

konformasyonunu tercih ederler. Genel olarak ozmolitler, amino asitler, karbonhidratlar, aminler, sülfonyum vb. olarak alt kategorilere de ayrılmaktadır. Tuz iyonlarının aksine, bunlar çoğunlukla tüm proteinlerle uyumludur. Osmolitin bu özelliği, proteinlerin katlanması için itici güç, "protein katlanması" adı verilen bir olgudan kaynaklanmaktadır. Osmolitin protein katlanması için itici gücü artırma kabiliyeti, katlanmamış durumda açığa çıkan peptit omurgası üzerinde etkili olan solvofobik etki adı verilen bir olgudan kaynaklanmaktadır. Bu, çözünen maddenin varlığında, suyun protein yüzey gruplarıyla etkileşimi için serbest enerjideki değişimin, çözünen maddenin proteinle etkileşimi için serbest enerjideki değişimden daha elverişli olduğu anlamına gelir (Seechurn ve ark., 2015).

Osmolitlerin stabilize etme mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir, ancak birçok ozmolit ve ilgili çözünen madde için evrensel su-çözünen-makromolekül etkileşimleri söz konusudur. Bazı tuz iyonları ve üre gibi destabilize ediciler genellikle proteinlere bağlanarak onların açılmasına neden olur, çünkü bu destabilize ediciler ile proteinler termodinamik olarak uygun bağlanmaya maruz kalan daha fazla grubu açığa çıkarır. (Siebenaller ve ark., 1989; Yancey ve ark., 1982)

Proteinin katlanması çevrede tersine çevrilebilen bir ilerlemedir ve ozmolitler, katlanmamış durumun serbest enerjisini artırarak katlanma simetrisini doğal olarak katlanmış konformasyonlar yönünde yönlendirir (Street ve ark., 2006). Birçok proteinin erime sıcaklığının (T_m), ozmolitlerin etkisiyle arttığı gösterilmiştir (Kaushik ve ark., 1998). Osmolitler, hücresel ortamdaki solventin özelliklerini değiştirerek işlevler gerçekleştirir ve dolayısıyla bunların ortaya çıkışı, sonuçta bu makromoleküllerin gücünü değiştirir (Gekko ve ark., 1981).

Mehrabi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2008) sükroz, sorbitol ve prolin gibi ozmoliter kullanılmış ve bu osmolitlerin lusiferaz enziminin yüksek sıcaklıklardaki stabilizasyonu ve enzimatik aktivitesini artırma derecesi ve osmolitlerin eklenmesiyle konformasyonel değişikliklerini kontrol edilmiştir. Çalışmada osmolitlerin ateşböceği lusiferaz aktivitesinin termostabilitesini artırdığı bulunmuştur. Sükroz, sorbitol ve prolin varlığında, 60 dk sonra enzimin kalan aktivitesinin serbest enzimden çok daha yüksek olduğunu ve en iyi sonucun 35 °C'de 60 dk sonra orijinal aktivitenin neredeyse %90'ını koruyan 1.5M sukroz ile elde edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca floresan ve dairesel dikroizm (CD) deneyleri, bu osmolitler varlığında ateş böceği lusiferazının ikincil ve üçüncül yapısında

değişiklikler olduğunu göstermiştir. Lusiferazın katlanma eğrileri (uzak-UV CD spektrumları ile elde edilen), osmolitlerin varlığında geri dönüşümsüz bir termal denatürasyon ve katlanma geçiş sıcaklığının (T_m) orta noktasının yükseldiğini göstermiştir (Maryam ve ark., 2008).

Van-Thuoc ve arkadaşlarının 2012 yılında yayınlanan çalışmalarında, ektoinlerin pH stresine karşı koruyucu etkisini, *Bacillus halodurans*'tan rekombinant bir ksilanaz model olarak kullanılarak incelemiştir. Enzim stabilitesi ektoinler varlığında düşük (4.5 ve 5.0) ve yüksek pH'da (11 ve 12) artış göstermiştir. Ksilanaz pH 10'da 50 mM hidroksiektoin ile 65 °C'de 5 sa inkübe edildiğinde, orijinal aktivitenin yaklaşık %40'ı korunurken, katkı maddesi yokluğunda veya ektoin ya da trehaloz varlığında hiçbir artık aktivite tespit edilmemiştir. Ksilanaz aktivitesi 25 mM ektoin varlığında hafifçe uyarılmış ve daha sonra ektoin konsantrasyonundaki artışla kademeli olarak azalmıştır. Uyumlu çözünenlerin varlığında enzimin termal açılımı, denatürasyon sıcaklığında mütevazı bir artış gösterirken kalorimetrik entalpide daha büyük bir artış göstermiştir (Van-Thuoc ve ark., 2013).

2018 yılında yayınlanan bir çalışmada (Huei-Fen ve ark., 2018) dört farklı biyolojik ozmolitin (gliserol, sorbitol, sükroz and TMAO (trimethylamine-N-oxide)) *Bacillus licheniformis* γ -glutamil transpeptidaz (BIGGT) üzerindeki stabilize edici etkisi araştırılmıştır. BIGGT'nin 40°C'nin altındaki sıcaklıklarda stabil olduğu görülmüştür, ancak enzim 60°C'de aktivitesinin %10'undan daha azını korumuştur. Test edilen ozmolitler sıcaklığa karşı farklı etkinlik dereceleri sergilemiştir ve sükrozun bunlar arasında en etkili olduğu bulunmuştur. BIGGT'nin ikincil yapısı dairesel dikroizm spektroskopisinin kullanılması ile belirlenmiş ve protein molekülünün sıcaklığa bağlı konformasyonel değişiminin ozmolitler tarafından önlenebileceğini ortaya koyulmuştur. Çalışılan biyolojik ozmolitlerin, özellikle de sükrozun, BIGTT'nin yapısal stabilizasyonuna baskın bir katkıda bulunduğunu açıkça gözlemlenmiştir (Huei-Fen ve ark., 2018).

Wlodarczyk ve grubu tarafından yapılan bir çalışmada (2019) ozmolitlerin *Erwinia chrysanthemi*'den (ErA II) elde edilen rekombinant L-ASNaz II'nin kinetik ve stabilitesi üzerindeki etkisini, ayrıca enzimin agregasyon profilleri nanotracking partikül analizi ve dinamik ışık saçılımı ile analiz edilmiştir. Test edilen ozmolitlerin çoğu enzimin spesifik aktivitesini ve stabilitesini artırırken, sükroz ve sorbitol enzim aktivitesinin neredeyse %70'ini artırmıştır. Poliöl toplam enzim aktivitesini 30 gün

boyunca korurken, sükröz bu süre boyunca toplam enzim aktivitesini 81.1 ± 5.3 oranında korumuştur. Sükröz ve sorbitol kinetik parametreyi (K_m) önemli ölçüde değiştirmemiş ve sonuç olarak ErA II'nin genel katalitik etkinliği (k_{cat}/K_m) aynı kalırken, bu osmolitler 30 gün boyunca protein stabilitesini artırmıştır. Sonuç olarak, sorbitol ve sükrözün enzimin doğal durumun biyofarmasötik aktivitesini etkilemeden enzim stabilizasyonuna yol açtığı için bu osmolitlerin, ErA II formülasyonları için ideal olduğunu açıkça belirtmişlerdir (Samarina ve ark., 2019).

2020 yılında paylaşılan bir çalışmada Joghee ve arkadaşları, Nε-asetil L-lizinin α-amilazın termodinamik kararlılığı ve enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini, yaygın olarak bilinen diğer osmolitlerle (ektoin, prolin, glisin betain, trehaloz ve sükröz) ile karşılaştırarak araştırmıştır. pH 37' de incelenen tüm osmolitlerin enzim optimum sıcaklığını arttırdığı ve enzimin termodinamik stabilitesini geliştirdiği tespit edilmiştir. pH 3.0'de, Nε-asetil L-α lizin ve ektoinin enzimin hem katalitik hem de termodinamik stabilitesini geliştirdiği ve bu durumun, enzimin pH 3.0'da 15 dk inkübasyonundan sonra kalan enzim aktivitesinde sırasıyla %60 ve %63.5 oranında ve katlanma geçişinin orta nokta sıcaklığında sırasıyla 11°C ve 10°C oranında artışa yansıdığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, asidik koşullarda Nε-asetil L-α lizin ve ektoin ilavesinin α-amilazın hem aktivitesi hem de stabilitesi üzerindeki önemli koruyucu etki göstermesinin bu osmolitleri biyoteknolojik uygulamalar için ilginç adaylar haline getirdiğini belirtmişlerdir (Joghee ve ark., 2020).

2020 yılında yayınlanan başka bir çalışmada Norouzi ve arkadaşları trehaloz ve prolinin PersiXyn2'nin aktivitesi, stabilitesi ve konformasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada her iki osmolitin varlığı, kontrol PersiXyn2'ye kıyasla daha yüksek bir katalitik verimlilikle sonuçlanmıştır. Trehaloz ve prolin, PersiXyn2'nin optimum pH'ını düşürmüş ve aktivitesinin optimum sıcaklığını artırmıştır. Bu osmolitler 24 günlük uzun bir süre boyunca PersiXyn2 depolama stabilitesini geliştirmiştir. Ayrıca, her iki osmolit de farklı konsantrasyonlarda metal iyonları varlığında enzimin katalitik aktivitesini korumuş, ancak trehaloz en çok Mg^{2+} varlığında, prolin ise Mn^{2+} varlığında en önemli etkiye sahip olmuştur. Ayrıca, prolin ve trehaloz varlığında deterjanların enzim üzerindeki etkisi PersiXyn2'nin aktivitesini arttırmıştır (Norouzi ve ark., 2020).

Bazıları osmolitlerin protein omurgası peptidleri veya amino asit yan zincirleri ile doğrudan etkileşime girdiğine inanmaktadır; ancak osmolitler doğal proteinlerin

yapılarını önemli ölçüde değiştirmez (Brandau ve ark., 2003). Bugüne kadar yayınlanan araştırmaların çoğu, uyumlu ozmolitlerin protein tersiyer yapısı ve stabilitesi üzerindeki etkisini tanımlamaya çalışmıştır.

Bu ozmolitler, kesin mekanizma tartışmalı olsa da proteinin amid omurgasını hedef alan bir mekanizma yoluyla protein kıvrımlarını etkiler (Ufnal ve ark., 2015; Yuewen ve ark., 2018) Stabilize edici ozmolitler, protein omurgasına yönelik termodinamik bir hoşnutsuzluk nedeniyle tercihen protein yüzeylerinden dışlanır.

1.3.1. Ozmolitlerin Etki ve Stabilizasyon Mekanizması

Ozmolitler sulu çözeltideki yoğunluğunu korurken, bu moleküller proteine yardımcı olur ve denatüre bir proteinin katlanmış konformasyonunun geri kazanılmasında önemli bir rol oynar. Ozmolit, proteinin katlanma kararlılığına katkıda bulunarak (Kushwah ve ark, 2020) protein stabilitesini sağlar. Olumsuz çevresel faktörlerin istenmeyen etkileri ortamda ozmolitin varlığı ile proteinlerin doğal bir yapıya katlanmasına neden olduğuna inanılmaktadır. Bir ozmolitin proteini stabilize etme eğiliminin serbest enerji aktarımına bağlı olarak, peptit omurgası ile ozmolit arasındaki olumsuz etkileşimlerden kaynaklandığı varsayılmaktadır (Chandelve ark., 2017; Chhabra ve ark., 2017)

Ozmolitler, özellikle biyokimyasal süreçlerde önemli olan belirli organik moleküllerdir. Bu yüzden termodinamik prensiplerini anlamak, özellikle de serbest enerji değişimleri ozmolitlerin rolünü ve etkileşimlerini anlamak için kritiktir (Knierbein ve ark., 2019). Ozmolitlerin çözelti içindeki davranışları, çözeltinin termodinamik özelliklerini etkileyebilir.

Amino asitler, lizin ve arginin yaygın olarak kullanılan ozmolitler arasında yer almaktadır. Bu nedenle ozmolitlerin aynı zamanda proteinler için iyi katlanma mekanizması yöneticisi ve iyi stabilizatörler olduğu da bilinmektedir (Singh ve ark, 2011).

Ozmolitlerin stabilize etme mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir, ancak birçok ozmolit ve ilgili çözünen madde için evrensel su-çözünen-makromolekül etkileşimleri söz konusudur. Bazı tuz iyonları ve üre gibi destabilize ediciler genellikle proteinlere bağlanarak onların açılmasına neden olur, çünkü bu destabilize ediciler ile proteinler termodinamik olarak uygun bağlanmaya maruz kalan daha

fazla grubu açığa çıkarır (Canchi ve ark., 2010).

Proteinin katlanması çevrede tersine çevrilebilen bir ilerlemedir ve ozmolitler, katlanmamış durumun serbest enerjisini artırarak katlanma simetrisini doğal olarak katlanmış konformasyonlar yönünde yönlendirir (Street ve ark., 2006). Birçok proteinin erime sıcaklığının (T_m), ozmolitlerin etkisiyle arttığı gösterilmiştir (Kaushik ve Bhat, 1998). Ozmolitler, hücresel ortamdaki solventin özelliklerini değiştir ve değişen özelliklerle birlikte bu solventi oluşturan makromoleküllerin gücünü etkiler (Gekko ve ark., 1981).

Bu moleküller, proteinin sulu çözeltideki gücünü korumasına destek olur ve denatüre bir proteinin katlanmış konformasyonunun geri kazanılmasında önemli bir rol oynar. Ozmolit, katlanmamış durumun serbest enerjisini artırarak, katlanmamış durumdan doğal olarak katlanmış konformasyona doğru katlanma stabilitesine doğru ilerler (Mojtabavi ve ark., 2019).

1.3.2. Ozmolit-Protein Etkileşiminin Moleküler Mekanizması

Hücreler kendilerini zorlu çevre koşullarından korumak için küçük molekülü ozmolitleri kullanır. Bu moleküller hücresel altyapıyı denatürasyon ve agregasyona karşı korur. Hücresel proteinlerin toplanması ve denatürasyonu çeşitli fizyolojik arızalara ve yaşamı tehdit eden hastalıklara yol açması bakımından önemlidir. Ozmolitler ortamda bulunan proteinlerin katlanma yönüne doğru iterek stabilitelerini arttırır, bu nedenle sıklıkla “kimyasal şaperonlar” olarak adlandırılırlar (Welch ve ark., 1996)

Ozmolitlerin protein stabilitesini artırıcı etkileri, farklı stres koşullarına karşı proteini koruma amacıyla araştırıldığı ve endüstriyel uygulamalarda önemli bir etki yarattığı birçok alanda dikkat çekmektedir. Proteinlerin aktivite ve termodinamik stabilitesi tıbbi ve endüstriyel uygulamalar açısından çok önemli bir rol oynar ve bu konular, bir dizi sınırlama ile birlikte zorluk içerebilir. Benzer şekilde, enzim katalizli reaksiyonların verimliliği ve maksimum verimi, enzimlerin stabilitesi/aktivitesi ve termodinamik dengeleri ile sınırlanabilir (Voges ve ark., 2017). Bu nedenle, stresli koşullarla mücadelede ve hastalıklarda organik ozmolitlerin işlevlerini ve bunların moleküler etkileşimlerini anlamak, bunların etki biçimleri hakkında ayrıntılı bilgi gerektirir (Held ve ark., 2016). Ozmolitlerin protein stabilizasyonunda kullanımını

optimize etmek için, bunların moleküler etkileşimleri (C. Held ve ark., 2016), reaksiyon kinetiğindeki rolleri (Wangler ve ark., 2018) ve enzim katalizli reaksiyonların reaksiyon dengesi (Voges ve ark., 2017) hakkındaki bilgiler önemli konuları oluşturmaktadır.

Protein ve ozmolitin etkileşiminde çeşitli kuvvetler rol oynar. Ozmolitlerin çeşitli protein molekülleri ile farklı bir şekilde etkileşime girdiği ve etkileşen kuvvetlerin doğasına bağlı olarak, makromolekölün stabilizasyonu veya destabilizasyonunun nihai sonuç olabileceği dikkate alınmalıdır (Singh ve ark., 2017).

Ozmolit-protein etkileşimlerinin altında yatan moleküler mekanizmalar karmaşıktır ve çeşitli moleküller arası kuvvetleri ve yapısal değişiklikleri içerir. Kesin mekanizmalar ilgili ozmolite ve proteine bağlı olarak değişebilir. Ancak genelleştirilebilecek bazı ortak prensipler ve mekanizmalar vardır. Hidrojen bağları bu mekanizmalardan biridir. Hidrojen bağları (H-bağları) protein katlanması için önemlidir (Gao ve ark., 2009; Adhikary ve ark., 2014). Ozmolitler genellikle hidrojen bağı yoluyla proteinlerle etkileşime girer (Li ve ark., 2020). Hem hidrofilik hem de hidrofobik ozmolitler, protein yüzeyindeki polar amino asit kalıntılarıyla hidrojen bağları oluşturabilir. Bu etkileşimler, doğru katlamayı sürdürerek denatürasyonu önler ve protein yapısının stabilize edilmesine yardımcı olur (Sundar ve ark., 2021) Diğer bir mekanizma ise su molekülünün yer değiştirmesidir. Ozmolitler, protein yüzeyindeki su moleküllerinin yerini alabilir (Fedotova, 2019). Protein üzerindeki hidrofobik amino asit kalıntıları tipik olarak su molekülleri ile etkileşime girer (Martini ve ark., 2013). Ozmolitler, özellikle hidrofilik gruplara sahip olanlar, bu kalıntılara bağlanmak için suyla rekabet edebilir ve onları sudan etkili bir şekilde koruyabilir. Bu, proteinin hidrofobik maruziyetini azaltır ve topaklanmayı önler (Das ve ark., 2007). Bazı ozmolitler ise proteini çevreleyen su moleküllerinin yapısını değiştirebilir. Hidrasyon kabuğundaki su moleküllerinin organizasyonunu etkileyerek protein yüzeyi etrafındaki solvent özelliklerini etkileyebilirler. Su yapısının bu modülasyonu, protein çözünmesi ve stabilitesi üzerinde derin bir etkiye sahip olabilir (Kossowska ve ark., 2018). Bazı ozmolitler, özellikle iyonlar, elektrostatik etkileşimler yoluyla protein yüzeyindeki yüklü amino asit kalıntılarıyla etkileşime girebilir. Bu etkileşimler, ilgili yüklerin doğasına ve gücüne bağlı olarak proteini stabilize edebilir veya dengesini bozabilir (Govrin ve ark., 2018) Ozmolitlerin konsantrasyonu, protein stabilitesi üzerindeki etkilerini belirlemede kritik bir

faktördür. Düşük konsantrasyonlarda ozmolitlerin protein yapısı üzerinde minimum etkisi olabilirken, yüksek konsantrasyonlarda dengeleyici etkileri daha belirgin hale gelir (Qu ve ark., 1998) Bazı durumlarda ozmolitler proteinlerde konformasyonel değişikliklere neden olabilir. Bu değişiklikler, protein stabilitesine katkıda bulunan alfa-sarmal oluşumu veya beta-yaprak stabilizasyonu gibi proteinin ikincil yapısındaki değişiklikleri içerebilir (Jahan ve ark., 2019).



2. MALZEME ve YÖNTEM

2.1.Malzemeler

2.1.1. Kullanılan Mikroorganizma Suşu ve Plazmit Vektör

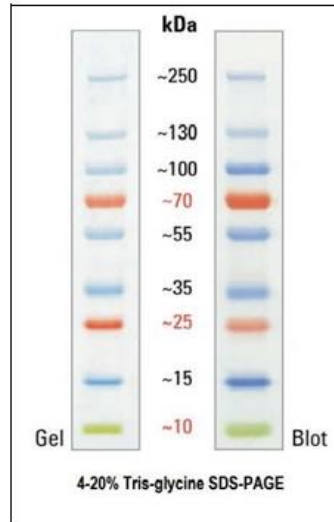
Geobacillus kaustophilus L-ASNaz (*GkASNaz*) geni daha önce laboratuvarımızda pET-22b (+) vektörüne klonlanmış (pET-22b (+) /*GkASNazII* ve *E. coli* RosettaTM2 (DE3) hücrelerine tranforme edilmiştir. *E. coli* RosettaTM2 (DE3) hücreleri, genetik olarak değiştirilmiş bir *E. coli* suşudur ve yüksek düzeyde protein ekspresyonu için kullanılmaktadır.

2.1.2. Kullanılan Enzimler ve Kitler

Sonikasyondan önce bakteri hücre duvarını zayıflatmak amacı ile önce hücreleri parçalamak için kullanılan lizozim enzimi Thermo ScientificTM (Waltham, Massachusetts) firmasından temin edilmiştir. Protein konsantrasyonlarını belirlemek için BCA yöntemi kullanılmış ve protein miktar tayin kiti (PierceTM BCA Protein Assay Kit) Thermo Fisher Scientific firmasından temin edilmiştir.

2.1.3. Kullanılan Protein Moleküler Belirteci

SDS-PAGE görüntüleri için PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Scientific, USA) moleküler belirteci kullanılmıştır (Şekil 2.1)



Şekil 2.1: Protein moleküler belirteci (Thermo Scientific).

2.1.4. Saflaştırmada Kullanılan Malzemeler

Proteini saflaştırmak için HisTrap™ FF, 5 mL (GE Healthcare Biosciences) kolonu kullanılmıştır. HisTrap™ FF kolonu, GE Healthcare Life Sciences tarafından üretilen ve protein saflaştırma için kullanılan kromatografi kolonudur. Bu tür bir kolon özellikle histidin etiketi taşıyan rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılır. HisTrap™ FF kolonu, histidin etiketli proteinlerin özgül olarak tutunmasını ve daha sonra kolondan elde edilmesini sağlamak için nikel (Ni^{+2}) iyonlarına bağlı olan bir histidin bağlayıcı özelliğe sahiptir. Histidin etiketli proteinler, kolona uygulandığında nikel iyonlarına bağlanır ve diğer kontaminanlar ve proteinler kolon üzerinden geçer. Daha sonra hedef protein, özel bir tampon kullanılarak kolondan elde edilir.

Saflaştırma sonrasında protein saflaştırma tamponunun değişimi ve proteinin konsantre edilmesi için 10 kDa Amicon® Ultra- 15 Centrifugal Filter Unit, Merck firmasından temin edilmiştir.

2.1.5. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

i. Kullanılan Besiyerleri

Kullanılan tüm besiyerleri kullanımdan önce otoklav ile 121°C'ta 20 dk boyunca sterilize edilmiştir.

- Luria Broth (1 L, pH 7.5)
 - Tripton 10 g
 - Maya Özütü 5 g
 - NaCl 10 g karıştırılarak dH₂O ile 1 L'ye tamamlanır ve otoklavlanır.
- Luria-Bertani (LB) Agar (pH 7.5)
 - LB sıvı besiyerine %1,5 oranında agar eklenerek hazırlanır ve otoklavlanır.

i. Diğer çözeltiler

- Ampisilin (5 mL, 100 mg/mL):
 - 0.5 g Ampisilin
 - dH₂O ile 5 mL'ye tamamlanır. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.
- IPTG (100 mM, 10 mL):
 - 0.238 g IPTG
 - 10 mL dH₂O ile çözülür. Filtreden geçirilerek sterilize edilir.

ii. Ni-NTA Saflaştırma İçin Kullanılan Solüsyonlar:

- Lizis Tamponu (pH 8.0)
 - Sodyum Fosfat Tampon 20 mM
 - NaCl 500 mM
 - İmidazol 5 mM
- Bağlanma Tamponu (pH 7.4)
 - Sodyum Fosfat Tampon 20 mM
 - NaCl 0.5 M
 - İmidazol 20 mM
- Elüsyon Tamponu (pH 7.4)
 - Sodyum Fosfat Tampon 20 mM
 - NaCl 0.5 M
 - İmidazol 500 mM

iii. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar:

- 50X TAE Tamponu (200 mL)

- Tris 48.4 g

-Glasial Asetik Asit 11.42 mL

-0,5 M EDTA (pH 8.0) 20 mL

- %0.8'lik Agaroz Jel (40 mL)

-Agaroz 0.32 g

-1X TAE tamponu

-40 mL RedSafe 3 μ L

iv. SDS-PAGE İçin Kullanılan Solüsyonlar:

- 10X SDS Yürütme Tamponu (1 L)

-Tris 30,3 g

-Glisin 144,4 g

-SDS 10 g

- 4X Örnek Tamponu (10 mL)

-1 M Tris-HCl (pH 6.8) 2 mL

-SDS 0.8 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)

-Coomassie Brilliant Blue R250 1 g

-Metanol 450 mL

-Glasial Asetik Asit 100 mL

- Boya Uzaklaştırma Solüsyonu (1 L)

-Metanol 50 mL

-Asetik asit 70 mL

-Distile su 880 mL

- %12'lik SDS-PAGE

- Ayırma Jeli (Alt Jel)

-Distile su 3.2 mL

-%30 Akrilamid 4 mL

-1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.6 mL

-%10 SDS 100 µL

-%10 APS 100 µL

-TEMED 10 µL

- Yükleme Jeli (Üst Jel)

-Distile su 2.975 mL

-%30 Akrilamid 0.67 mL

-0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.625 mL

-%10 SDS 50 µL

-%10 APS 50 µL

-TEMED 5 µL

v. Asparajinaz Aktivite Tayini İçin Kullanılan Solüsyonlar

-50 mM Tris-HCl (pH 8.5)

-0.605 g Tris

-100 mL Distile su

- 40 mM L-Asparajin Solüsyonu

-0.05 g L-Asparajin

-10 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)

- 80 mM L-Asparajin Solüsyonu

0.1 g L-Asparajin

- -10 mL 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)

1.5 M TCA Solüsyonu

-2.45 g TCA

-10 mL Distile su

vi. Kullanılan Ozmolit Solüsyonları

- Maltoz 1M (2.5 mL)

-0.9 g Maltoz

-2.5 mL steril distile su

- Sükroz 1M (2.5 mL)

-0.85 g Sükroz

-2.5 mL steril distile su

- Trehaloz 1M (2.5 mL)

-0.85 g Trehaloz

-2.5 mL steril distile su

- Sorbitol 1M (2.5 mL)

-0.455 g Sorbitol

-2.5 mL steril distile su

- Glisin 1M (2.5 mL)

-0.075 g Glisin

-2.5 mL steril distile su

- Arjinin 1M (2.5 mL)

174 g Arjinin

2.5 mL steril distile su

2.1.6. Kullanılan Kimyasallar

Nessler ayıracı, agaroz, sodyum dodesil sülfat (SDS), β -merkaptetoetanol, sodyum klorür (NaCl), magnezyum klorür ($MgCl_2$), kalsiyum klorür ($CaCl_2$), mangan klorür ($MnCl_2$) sodyum hidroksit (NaOH), hidroklorik asit (HCl), 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) sorbitol, maltoz, süktroz ve arjinin Merck (Germany), trehaloz ve glisin Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

2.1.7. 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), buz makinası (BAR-LINE BF85), floresan spektrometre (FLUOstar Omega, BMG Labtech), mikrodalga fırın (Samsung), bloklu ısıtıcı (WiseTherm), AKTA Prime Plus Purification system (Cytiva Life Science, GE Healthcare), Jasco marka J-815 model CD spektrometre

2.2. Yöntemler

2.2.1. GkASNaz Enziminin Ekspresyonu

Çalışmamızda kullandığımız *Geobacillus kaustophilus* L-ASNaz tip II enzimini kodlayan GkASNazII geni daha önce laboratuvarımızda pET-22b(+) vektörüne klonlanmış (pET-22b(+)/GkASNaz) ve *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) ekspresyon hücrelerine transforme edilmiştir (Özdemir ve ark., 2022). 80°C'dan alınan stok hücreler 100 µg/mL ampicilin içeren taze LB-Agar plakalarına ekilmiş ve 37°C'ta bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün katı besiyerinden alınan tek koloni 10 ml LB besiyerine (100 µg/mL ampicilin) ekilmiş ve 16 sa boyunca 37°C'ta, 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Gece boyu inkübasyondan sonra 1:100 oranında taze LB besiyerine ekilen ikincil kültürler OD₆₀₀ değeri 0.5-0.6'ya gelene kadar 37°C'ta büyümeye bırakılmıştır. İstenen OD değerine ulaşan kültürler, son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde izopropil-1-thio-β-D-galaktozit (IPTG) ile uyarılarak 4 sa 37°C'de büyütülmüştür. IPTG ile uyarılmadan önce ve uyarıldıktan sonra 4. sa'te kültürden örnek alınmıştır. 4. sa'in sonunda hücre kültürleri toplanarak +4°C'de, 4000 rpm'de, 30 dk santrifüj ile çöktürülmüştür. Hücre peletleri saflaştırma yapılına kadar -20°C'ta saklanmıştır.

L-asparaginaz gen ekspresyonu GkASNaz genini içermeyen pET-22b(+) plazmiti ile transforme edilmiş *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücreleri ve plazmit taşımayan boş *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücreleri kullanılarak kontrol edilmiştir. Tüm kültürler benzer şekilde 1 mM IPTG ile uyarılarak 4 sa 37°C'de büyütülmüştür. Tüm kültürlerin IPTG ile uyarım öncesi ve sonrasındaki ekspresyon profilleri %12'lik sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile görüntülenmiştir.

Örnekler 20 dk boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Lizis aşamasından sonra hücreler, darbe 10 saniye boyunca açık ve 10 saniye boyunca kapalı olacak şekilde %10 amplitüd ile 2.5 dk süreyle buz üzerinde sonikasyon yoluyla bozuldu. Homojenat daha sonra +4°C'de, 12000 rpm'de 1 sa 30 dk santrifüj edilerek berraklaştırıldı. Santrifüj sonrası 15 mL protein süpernatantı, kullanıma kadar saflaştırılmak üzere -20°C'de saklanan temiz cam tüplere aktarıldı.

2.2.2. Asparajinaz Enziminin Saflaştırılması

Ekspresyon sonrasında elde edilen hücre peletlerini parçalamak amacıyla, buz içerisine alınarak gram başına 4 mL olacak şekilde lizis tamponu (pH 8.0; 5 mM imidazol, 500 mM NaCl ve 20 mM Sodyum fosfat tamponu) ile çözdürülmüştür. Hücre solüsyonuna 1 mg/mL lizozim enzimi eklenerek 30 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Lizis aşamasından sonra hücreler, 20 saniyelik bir atış ve ardından 10 saniyelik bir duraklama ile buz üzerinde 4 dk süreyle sonikasyon yoluyla parçalandı. Elde edilen homojenat, hücre artıklarını uzaklaştırmak için +4 °C'de ve 10.000 rpm'de 1 sa boyunca santrifüjlenmiş ve üst faz saflaştırılmak üzere -20°C'de saklanmıştır. *GkASNaz* proteinlerini içeren hücre özütleri %12'lik SDS-PAGE'de görüntülenmiştir

Hücre özütünden C-terminalinde 6xHis kuyruğu içeren *GkASNaz* proteinleri saflaştırmak amacıyla bir immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC) yöntemi olan Ni-NTA afinite kromatografisi kullanılmıştır. *GkASNaz*, HisTrapFFTM kolonu (5 mL) kullanılarak hücre ekstraktlarından tek basamakta saflaştırılmıştır (Akta Prime Plus Purification Plus System). Sistem öncelikle, kolon hacminin 5 katı kadar %20 etanol ve- ultra saf su ile yıkanmış, ardından kolon (5 mL), 5 kolon hacminde 20 mM imidazol (pH 7.4) içeren bağlama tamponu ile 5 mL/dk akış hızında dengelenmiştir. Örnekler kolona yüklenmeden önce 0.45 µM'lık membrandan geçirilerek filtrelenmiş; ardından kolona yüklenmiştir. Kolona bağlanmamış proteinleri kolondan uzaklaştırmak için kolon 5 kolon hacmi bağlama tamponu ile yıkanmıştır. Kolona bağlanan C-terminalinde 6xHis kuyruğu içeren *GkASNaz* proteinleri 500 mM imidazol içeren bir elüsyon tamponu (pH 7.4) ile kolondan 1 mL'lik fraksiyonları halinde toplanmıştır. Toplanan elüsyon fraksiyonlarında protein varlığı %12'lik SDS-PAGE ile analiz edilmiş ve ilgili proteinin olduğu elüsyonlar bir araya getirilmiştir.

Fosfat içeren elüsyon tamponu, 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) tampon değişimi yapılmış ve protein konsantre edilmiştir.

2.2.3. SDS-PAGE Analizi

Proteinin saflığını ve moleküler boyutunu analiz etmek için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi kullanılmıştır. Proteinlerin molekül ağırlıklarını belirlemede en yaygın olarak kullanılan poliakrilamid jel elektroforez tipidir. Sodyum dodesil sülfat bir anyonik deterjan olup proteinlere sıkıca bağlanarak proteinlerin denatürasyonunu sağlar.

%12'lik ayırma jeli hazırlandı, plakalar arasındaki boşluğa döküldü ve polimerizasyon için 10 dk bekletildi. Hava kabarcıklarını gidermek ve jeli düzleştirmek için izopropanol (3-4 damla) eklenmiştir. Çözücü jel katılaştıktan sonra, IPA kağıt mendille uzaklaştırılmış ve plakalardaki çözücü jele 4 mL %5'lik yükleme jeli eklenmiştir. Yükleme jelinin üzerine hemen bir tarak yerleştirilmiştir. Jel plakası jel tankına yerleştirildi ve SDS yükleme tamponu ile tamamen dolduruldu. Protein örnekleri (15 µL), 4X örnek tamponu (5 µL) ile karıştırılarak 95°C'de 5 dk denatürasyon için bekletildi.

Örnekler ve 10 ila 250 kDa aralığında olan protein moleküler ağırlık belirteci (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder) ile işaretleyici elektroforez için kuyucuğa yüklenmiştir. Başlangıçta 5 dk boyunca 80 volt voltaj uygulandı ve ardından 1 sa boyunca 180 volta yükseltilmiştir. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel dikkatlice çıkarılmış ve 30 dk boyunca Coomassie Brilliant Blue-R250 boyası içeren bir kutuya yerleştirilmiştir. Boyanma işleminden hemen sonra boya uzaklaştırma solüsyonu ile 2-3 kez yıkanarak boyadan arındırılmıştır. 30 dk sonra jel gözlemlendi ve fotoğraf çekildi.

2.2.4. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Enzim fraksiyonlarının protein konsantrasyonu Pierce™ BCA Protein Assay Kiti kullanılarak tahlil edilmiştir. BCA (Bicinchoninic Acid) yöntemi, protein konsantrasyonlarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir biyokimyasal tayin yöntemidir. Bu yöntem, bir protein örneğinde bulunan peptit bağlarının bir bakır tuzu olan BCA ile reaksiyona girmesi prensibine dayanır. Bu reaksiyon sonucunda ortaya çıkan renk, örnekteki protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Saflaştırılan enzimden 96'lı mikropate kuyucukların her birine 10 µL olacak şekilde

eklendi. Üzerin kit içeriğindeki A reaktifi ile B reaktifinin 50:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan BCA belirtecinden 200 µL, eklenerek 37°C'de 30 dk bekletildi, ardından 562 nm'de kör örneğe (saf su) karşı absorbans ölçümü alındı (FLUOstar Omega, BMG Labtech). Kit içinde bulunan sığır serum albumini (BSA) standartı ile farklı konsantrasyonlarda standartlar hazırlanarak bu standartlarla bir standart grafiği oluşturulmuştur. Standart grafiğinin oluşturulmasında ise kit içerisindeki sığır serum albumini (Bovine Serum Albumin, BSA) standartı ve kör örnek olarak saf su kullanıldı. Elde edilen ölçüm verileri, oluşturulan standart grafiğe göre hesaplanarak, örneklerdeki protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

2.2.5. GkASNaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Serbest enzimin aktivitesi Nesslerizasyon yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. L-ASNaz, L-asparajini L-aspartik asit ve amonyağa parçalamaktadır. Nessler reaktifi ortamda bulunan amonyak ile tepkimeye girerek doğrudan amonyak tayini yapılmıştır.

pH: 8.5 Tris-HCL tamponundan 347.5 µL ependorf tüplerine alınarak üzerine L-ASNaz enziminin 2.5 µL ve toplam reaksiyon hacmi 400 µL şekilde substrat olarak hazırlanmış olduğumuz L-asparajin 50 µL (5 mM) eklenmiştir. Daha sonra ısıtıcı blokta hem 55°C hem de 37°C'de 12 dk reaksiyonun gerçekleşmesi için inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra serbest enzimin aktivitesini durdurmak için üzerlerine 1.5 M 150 µL TCA (trikloroasetik asit) çözeltisi eklenip karıştırılmıştır. Reaksiyon durdurulduktan sonra çöken proteinler 12000 g'de 5 dk santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Son olarak 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 dk bekletildikten sonra açığa çıkan amonyak miktarı UV spektrofotometrede 450 nm dalga boyunda okunarak ölçülmüştür. Amonyak konsantrasyonu, hazırlanan amonyum sülfat standart eğrisinden elde edilen formüle göre hesaplanmıştır.

Bir ünite (U) yukarıda belirtilen koşullar altında dk'da 1 µmol amonyak açığa çıkaran Lasparajinaz aktivitesi olarak tanımlanmaktadır (Zou ve ark., 2014).

Enzim aktivitesi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Enzim Aktivitesi (unit/}\mu\text{L)} = \frac{[\text{NH}_3 (\mu\text{M}) \times \text{reaksiyon hacmi } (\mu\text{L})]}{}$$

$$[\text{Supernatant hacmi } (\mu\text{L}) \times \text{reaksiyon süresi (dk)} \times \text{enzim miktarı } (\mu\text{L})]$$

(2.1)

2.2.6. Farklı Ozmolit Konsantrasyonlarının GkASNaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Ozmolitlerin etkinliğini test etmek için GkASNaz aktivitesi farklı konsantrasyonlardaki ozmolitler (10 mM, 30 mM, 60 mM ve 90 mM) varlığında yukarıda belirtilen şartlarda analiz edilmiştir.

2,5 µl saflaştırılmış (0.002 mg) farklı konsantrasyonlardaki ozmolitler varlığında pH 8.5'te, 5 mM L-asparajin substratı kullanılarak 37°C ve 55°C'de 12 dk inkübe edilmiş ve L-ASNaz aktivitesi sonucu açığa çıkan amonyak miktarı, Yöntem 2.5.5'te belirtilen Nesslerizasyon reaksiyonu ile ölçülmüştür. Her bir deney en az iki kez tekrarlanmış ve sonuçlar ikili ölçümlerin ortalaması alınarak ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Ozmolit içermeyen enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. Göreceli aktivite ozmolitler ile inkübe edilmiş enzimin etkinliği, ozmolitler ile muamele edilmemiş olan enzime oranı olarak ifade edilmiştir.

2.2.7. Ozmolitler varlığında GkASNaz aktivitesi üzerine pH'ın Etkisi

Ozmolitlerin varlığında pH'ın GkASNaz aktivitesi üzerine etkisini belirlemek amacı ile 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 tamponları (pH 9.5-10.0) hazırlanmıştır. Enzim farklı pH tamponları içinde ozmolitler varlığında ve yokluğunda 5 mM L-asparajin substratı kullanılarak 37°C ve 55°C'de 12 dk inkübe edilmiştir. Maksimum aktivite %100 olarak kabul edilmiş ve enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri değer, optimum pH değeri olarak belirlenmiştir.

pH kararlılığını belirlemek için enzim ozmolitler varlığında ve yokluğunda farklı pH tamponları içerisinde, +4°C sıcaklıkta 2 gün inkübe edilmiştir. Enzimin kalan aktivitesi, 5 mM L-asparajin kullanılarak 37°C ve 55°C'de 12 dk inkübe edilerek belirlenmiştir. Ozmolit içermeyen enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir.

2.2.8. Ozmolitlerin Varlığında GkASNaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisini belirlemek için enzim ozmolitler varlığında ve yokluğunda belirlenen optimum pH'da 5 mM L-asparajin substratı kullanılarak, 35°C-45°C-55°C-65°C-75°C-85°C sıcaklıklarda 12 dk inkübe edilmiş ve enzim aktivitesi Nessler yöntemi ile ölçülerek belirlenmiştir. Maksimum aktivite %100 olarak kabul edilerek, enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri değer, optimum sıcaklık değeri olarak belirlenmiştir.

2.2.9. Ozmolit Varlığında GkASNaz'ın Kinetik Parametrelerin Belirlenmesi

Ozmolitler (10 mM) varlığında GkASNaz'ın kinetik parametreleri 0.5-10 mM arasında farklı konsantrasyonlarda L-asparajin kullanılarak belirlenmiştir. Kısaca, enzim 10 mM ozmolit içeren ve içermeyen 50 mM Tris-HCl tamponunda (pH 8.5) +4°C'da 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda farklı konsantrasyonlarda L-asparajin substratı ilave edilerek reaksiyon başlatılmış ve 37°C ve 55°C'da 12 dk inkübasyonun ardından her bir reaksiyonda enzimlerin aktivitesi Nessler reaksiyonu ile ölçülmüştür. Enzimin kinetik parametreleri Michaelis-Menten grafiği kullanılarak belirlenmiştir. Enzimin Michaelis-Menten sabitleri (K_m), maksimum aktiviteleri (V_{max}) ve turnover sayıları (k_{cat}) GraphPad Prism sürüm 5.0 yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

2.2.10. Ozmolit Varlığında GkASNaz'ın Termal Kararlılığının Belirlenmesi

GkASNaz'ın termal kararlılığını belirlemek için enzim, 55°C ve 37°C sıcaklıkta 24 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 0. dk, 2., 4., 8., 12. ve 24. sa'lerinde alınan örneklerle 5 mM substrat eklenerek bu sıcaklıklarda 12 dk'lık enzim reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve enzim aktivitesi Nessler reaksiyonu ile belirlenmiştir. Enzimin sıfır zamandaki aktiviteleri % 100 olarak kabul edilerek enzimin kalan aktivitesi sırasıyla belirlenmiştir.

Enzim örneklerinin birinci dereceden inaktivasyon sabitleri (kd) ve yarı ömür ($t_{1/2}$) gibi termal kararlılık parametreleri, (Alagöz D., 2021) referans alınarak sırasıyla aşağıdaki formüllere (2.2 ve 2.3) göre hesaplanmıştır. 37°C ve 55°C'taki

stabilizasyon faktörleri (SF) ise ozmolit varlığında L-asparajinazın yarı ömrünün aynı sıcaklıklardaki ozmolit içermeyen enzimin yarı ömrüne bölünmesi ile hesaplanmıştır.

$$\ln A_t = \ln A_0 - k_d \times t \quad (2.2)$$

A_0 ve A_t ifadeleri sırasıyla başlangıç aktivitesini ve belirli bir zaman sonra kalan aktiviteleri temsil etmektedir.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (2.3)$$

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

2.2.11. Ozmolit Varlığında GkANazın Depolama Kararlılığının Belirlenmesi

Ozmolit varlığında ve yokluğunda uzun süreli saklama sırasında GkASNaz'ın stabilitesi, enzimin 30 gün boyunca 4°C'de bekletildikten sonra belirlenmiştir. Enzim 10 mM ozmolit içeren ve içermeyen 50 mM Tris-HCl tamponunda (pH 8.5) +4°C'da 30 gün inkübe edilmiştir. 2. gün, 10. gün, 20. gün ve 30. günlerin sonunda enzim örneklerine 5 mM L-asparajin ilave edilerek 37°C ve 55°C'da 12 dk inkübe edilmiştir. Her bir reaksiyon için enzim aktivitesi Nessler reaksiyonu ile ölçülmüştür. Başlangıç aktiviteleri %100 olarak kabul edilmiştir.

2.2.12. Ozmolit Varlığında Metal İyonlarının GkASNaz Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Çeşitli metal iyonlarının (CaCl_2 , MgCl_2 , MnCl_2 ve NaCl_2) ozmolit olarak seçilen maltoz ve arjinin varlığında GkASNaz aktivitesin üzerindeki etkisini belirlemek için metal iyonları (5 mM) son konsantrasyonu 30 mM olacak şekilde ozmolit içeren enzim tamponuna ilave edilmiş ve enzim ile birlikte oda sıcaklığında 1 sa inkübe edilmiştir. Daha sonra enzim reaksiyonu 5 mM L-asparajinin ilavesi ile başlatılmış, hem 37°C hem de 55°C'de kurulan reaksiyonların gerçekleşmesi için 12 dk inkübe edilmiştir. Kalan enzim aktivitesi, metal iyonu ve ozmolit içermeyen reaksiyon sonucu oluşan aktivitenin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

2.2.13. Ozmolit Varlığında Enzimin Akrilamid Giderim Potansiyelinin Belirlenmesi

Ozmolitler varlığında *GkASNaz* örneklerinin akrilamid azaltma aktivitesi Alam ve arkadaşları tarafından tarif edilen yöntemle göre nişasta-asparajin gıda model sistemi kullanılarak belirlenmiştir (S. Alam, 2018). Akrilamid giderimi öncesinde enzim 10 mM ozmolit içeren enzim tamponunda 2 gün inkübe edilmiştir. Akrilamid giderimi için enzim reaksiyon karışımına 1 mililitre L-asparajin (%2 (w/v)) ve 1 mL nişasta (%2 (w/v)) eklenerek 60 dk 37°C ve 55°C’de inkübe edilmiştir. Reaksiyonun sonunda karışımdan 0.5 mL süpernatant alınarak yağ banyosunda 180°C’ta 5 dk ısıtılmıştır. Oda sıcaklığında soğutulduktan sonra karışımdan 20 µL örnek alınmış ve akrilamid analizi için su/asetonitril karışımı (90/10, v/v) ile 100 µL’ye seyreltilmiştir. Karışımın akrilamid içeriği yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak belirlenmiştir.

Mobil faz su/asetonitril karışımı (90/10, v/v) ve C-18 kolon kullanılmıştır. Akrilamid tespiti 205 nm’de bir Diyot Dizi Dedektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Akrilamid azaltımı (%) aşağıda verilen denkleme (2.4) göre hesaplanmıştır.

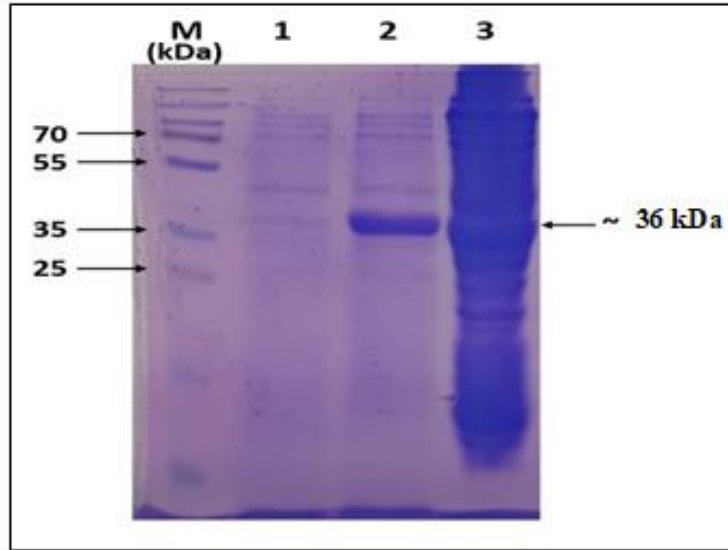
$$\text{Akrilamid giderimi}(\%) = \frac{(AB-AE)}{AB \times 100} \quad (2.4)$$

burada AB, boş (işlem görmemiş) reaksiyon için oluşan akrilamid miktarı ve AE, ozmolit varlığında veya yokluğunda *GkASNaz* işleminden sonra kalan akrilamid miktarıdır.

3. SONUÇLAR

3.1. *GkASNaz* Enziminin Ekspresyonu ve Saflaştırılması

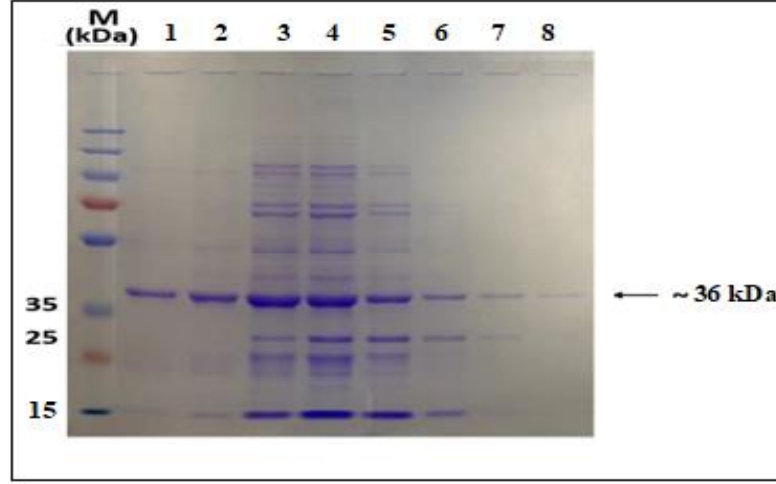
GkASNaz'ın ekspresyonu ve saflaştırılması önceki çalışmalarımızda bildirildiği gibi yapılmıştır (Özdemir ve ark., 2022). pET- 22b(+)/*GkASNaz* plazmitini taşıyan *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücreleri 100 µg/mL ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde büyütülmüş ve optik yoğunlukları 0.6'ya geldiği zaman IPTG ile uyarılarak L-ASNaz enziminin sentezlenmesini sağlanmıştır. Hücrelerin IPTG ile uyarımı öncesi ve sonrası protein ekspresyon profili SDS-PAGE ile analiz edilmiştir. Şekil 3.1' de görüldüğü gibi jel analizi IPTG uyarımı sonucunda 4. sa'te alınan örnekte ~ 36 kDa büyüklüğünde *GkASNaz* proteininin eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Ekspresyon sonunda toplanan hücreler sonikasyon ile parçalanarak hücre özütü elde edilmiş ve elde edilen hücre özütü 0.45 µM'lik filtreden geçirilmiştir.



Şekil 3.1: Rekombinant *E. coli* Rosetta™ 2 (DE3) hücrelerinden elde edilen hücre özütünün %12'lik SDS-PAGE analizi. M: Protein belirteci (kDa), 1: IPTG ile uyarım öncesi, 2: IPTG ile uyarım sonrası 4. sa'te alınan örnek, 3: Hücre özütü.

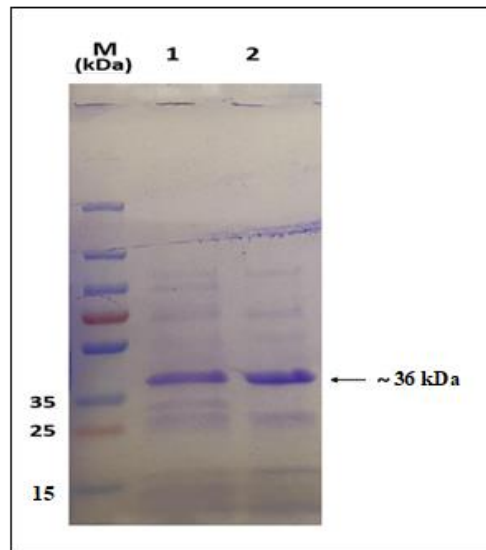
C-terminalinde 6x-His ile eksprese edilen *GkASNaz* proteini, 8.17 mL hücre özütünden bir Ni-NTA kolonu olan His-Trap FF (5ml) kullanılarak tek basamakta saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonucu elde edilen elüsyon profili %12'lik SDS-PAGE

ile analiz edilmiş ve *GkASNaz* proteini yaklaşık ~36 kDa büyüklüğünde kalın tek bir band olarak gözlemlenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Afinite kromatografisi elüsyon fraksiyonlarının SDS-PAGE analizi.
M: Moleküler protein belirteci, 1-8 Elüsyon fraksiyonları.

Beklenen büyüklüğe sahip rekombinant *GkASNaz* proteinlerin bulunduğu elüsyon fraksiyonları birleştirilmiş ve daha sonra 10 kDa MWCO Amicon® Ultra-15 ultrafiltrasyon filtresi kullanılarak proteinin içinde bulunduğu saflaştırma tamponu (5.5 mL) 50 mM Tris-HCl (pH 8.5) tampon solüsyonu ile değiştirilmiş ve konsantre edilmiştir (Şekil 3.3). Saflaştırılan ve konsantre edilen protein miktarları BCA yöntemi ile sırasıyla 0.163 ve 0.228 mg/mL olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3: Saflaştırılmış proteinin SDS-PAGE analizi. M: Moleküler protein belirteci
1: Saflaştırılmış protein 2: Konsantre edilmiş protein.

3.2. Asparajinaz Aktivitesinin Belirlenmesi

GkASNase'in aktivitesi, Nessler reaktifi kullanılarak amonyak miktarının ölçülmesi ile belirlenmiştir. *GkASNaz*'ın enzim aktivitesi L-asparajin substratını hidrolize etmesi sonucu açığa çıkan amonyak miktarının ölçümü ile belirlenmiştir. Amonyak miktarının belirlenmesi için farklı konsantrasyonlarda (0-3 mM) ve farklı sıcaklıklarda (37°C ve 55°C) amonyum sülfat standart grafiği hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisinin denklemi 37°C için $y=0.159x-0.0379$, 55°C için $y=0.1906x-0.0232$ 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 Eşitlik 3.1'e göre U/ μL cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Enzim Aktivitesi (unit/\mu L)} = \frac{[\text{NH}_3 (\mu\text{M}) \times \text{Reaksiyon hacmi (\mu L)}]}{[\text{Supernatant hacmi (\mu L)} \times \text{Reaksiyon süresi (dk)} \times \text{Enzim miktarı (\mu L)}]} \quad (3.1)$$

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 37°C ve 55°C sıcaklıklarda 12 dk inkübe edilmiş ve açığa çıkan amonyak miktarı Yöntem 2.5.5'te yer alan Nesslerizasyon yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

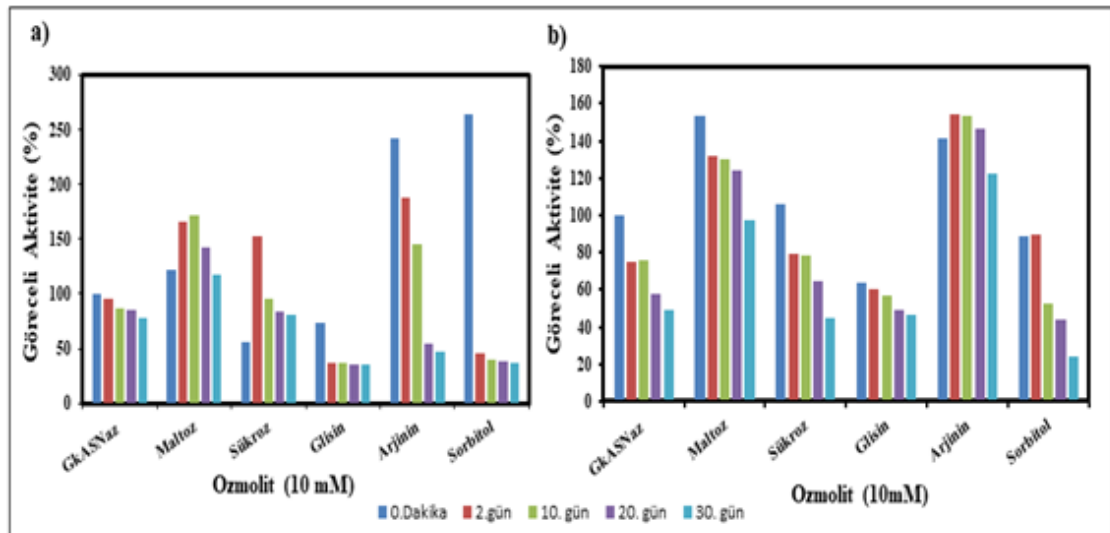
Tablo 3.1: *GkASNaz* enziminin saflaştırma sonuçları.

Saflaştırma Basamakları	Hacim (mL)	Total Protein (mg/mL)	Total Aktivite (U)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)	Saflaştırma (Kat)	Aktivite Verimi (%)
Hücre özütü	8.17	12.45	421.2	43.12	1.0	100
Saflaştırılmış Protein	5.5	0.90	261.6	221.77	5.14	62.1
Konsantre Protein	3	0.69	161.3	231.39	5.37	38.3

3.3. Farklı Ozmolit Konsantrasyonlarının *GkASNaz* Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Ozmolitlerin saflaştırılmış *GkASNaz* aktivitesi üzerine etkisi farklı konsantrasyonlarda maltoz, sorbitol, trehaloz, glisin, sükroz kullanılarak belirlenmiştir. Ozmolitler çözeltilere doğrudan uygulanmıştır. *GkASNaz* ozmolitlerin varlığında ve yokluğunda 37°C ve 55°C’de 12 dk inkübe edilmiş ve enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Test edilen şeker kaynaklı ozmolitler olan maltoz, sorbitol ve sükroz varlığında 37°C’da artan konsantrasyon miktarına paralel olarak enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir (Şekil 3.4a). 55°C’da ise sadece maltoz ve sükroz varlığında konsantrasyona bağlı olarak artış gözlenmiştir (Şekil 3.4b). Amino asit kaynaklı ozmolitler arasında arjinin 55°C’da ozmolit içermeyen enzim aktivitesine oranla yaklaşık 2 kat artış göstermiş ve artan arjinin konsantrasyonlarında enzim aktivitesi aynı oranda korunmuştur. Glisin amino asit varlığında ise artan konsantrasyonlara bağlı olarak enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir. 37°C’da ise arjinin en yüksek aktiviteyi 10 mM konsantrasyonunda göstermiş ancak glisin ozmolit içermeyen enzim ile karşılaştırıldığında artan konsantrasyonlarda enzim aktivitesinde değişiklik göstermemiştir.

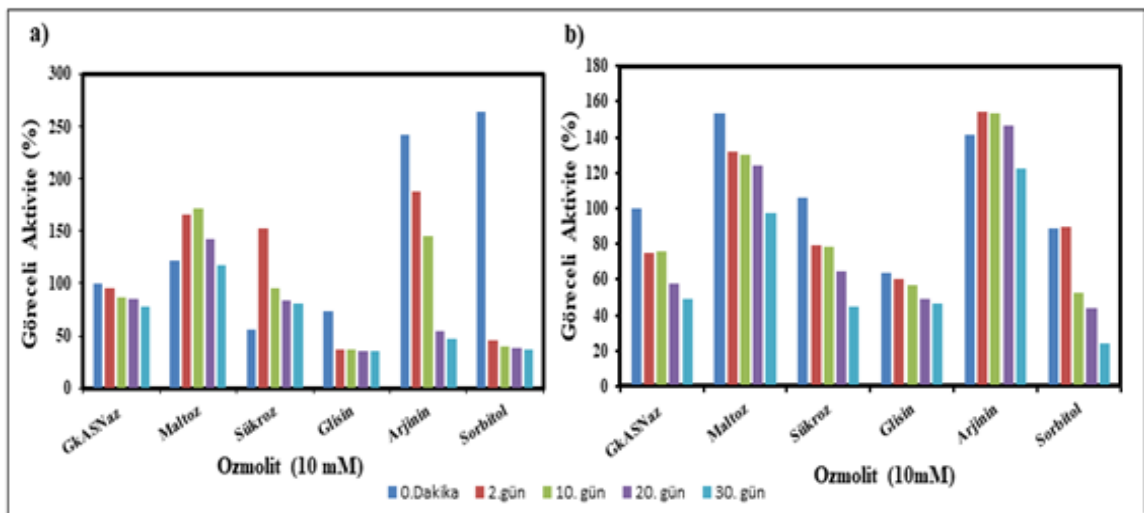


Şekil 3.4: Çeşitli ozmolitlerin farklı konsantrasyonlarının *GkASNaz* aktivitesi üzerine etkisi. a) 37°C, b) 55°C

3.4. Ozmolit Varlığında *GkASNaz*'ın Depolama Kararlılıklarının Belirlenmesi

Ozmolitler varlığında enzimin depolama kararlılığı, enzimin 10 mM ozmolitler varlığında ve yokluğunda 30 gün boyunca + 4°C'da inkübe edilerek belirlenmiştir. İnkübasyonun 2. 10. 20. ve 30. günlerinde *GkASNaz* aktivitesi hem 37°C hem de 55°C'de ölçülerek karşılaştırılmıştır (Şekil 3.5). Ozmolit içermeyen *GkASNaz* aktivitesi %100 olarak kabul edilmiştir. Ozmolit yokluğunda 37°C'da *GkASNaz* aktivitesini 30. günün sonunda %78 oranında korurken aynı sıcaklıkta ozmolit içermeyen enzim aktivitesi ile karşılaştırıldığında maltoz varlığında enzim aktivitesi 2. günün sonunda 1.5 kat artış göstermiş ve 30 gün boyunca enzim aktivitesini korumuştur. En yüksek enzim aktivitesi maltoz varlığında 2. gün (%166 oranında) ve 10. (%177 oranında) günde gözlenmiştir. Benzer şekilde süktroz varlığında en yüksek enzim aktivitesi 2. gün (%153 oranında) artış gözlenirken enzim aktivitesi 30 gün boyunca korunmuştur. Sorbitol ise koruma etkisi göstermemiştir. Benzer şekilde glisin amino asidi koruma etkisi göstermezken, en fazla koruma etkisini arjinin varlığında %187 oranında 2. gün gözlenmiştir (Şekil 3.5 a).

Ozmolitler en yüksek korumayı 55°C'de göstermiştir. Enzim ozmolit yokluğunda enzim aktivitesini 30. gün %52 oranında kaybederken, maltoz varlığında 30. gün enzim aktivitesini %97 oranında arjinin varlığında ise %122 oranında korumuştur (Şekil 3.5 b).

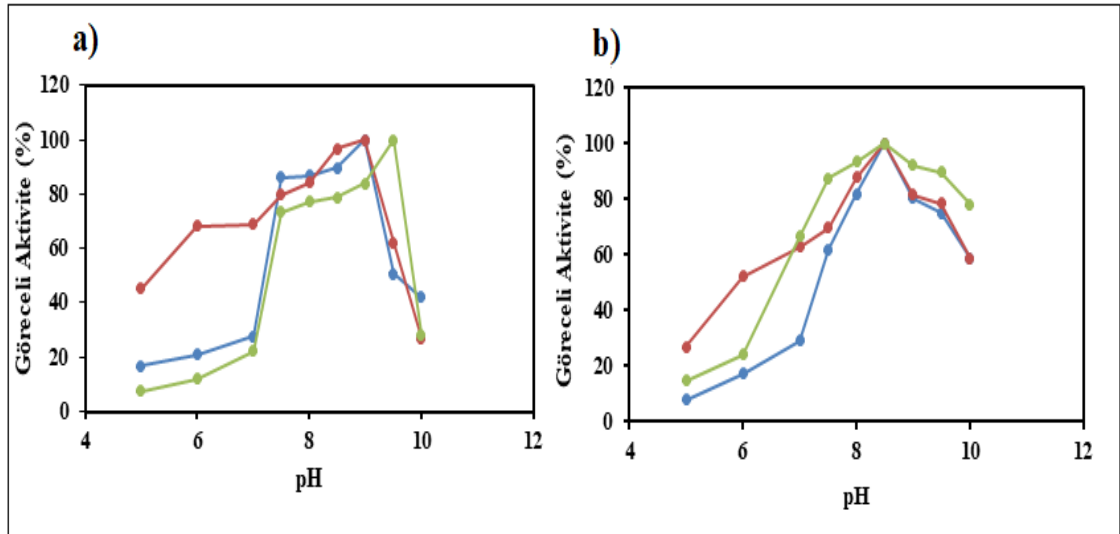


Şekil 3.5: *GkASNaz*'ın ozmolitler varlığında ve yokluğunda +4°C'de depolama kararlılığı. 37°C, b) 55°C'de Göreceli Enzim Aktiviteleri.

3.5. Ozmolit Varlığında pH'ın *GkASNaz* Aktivitesi Üzerine Etkisi

Enzimin stabilitesi maltoz ve arjinin varlığında diğer ozmolitlere oranla daha yüksek olduğu için çalışmalara bu ozmolitler ile devam edilmiştir. Çeşitli pH koşullarında (pH 5.0–10.0) enzimin ozmolitlerin varlığı ve yokluğunda 12 dk inkübe edilmesinin ardından kalan aktivite belirlenmiş ve Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

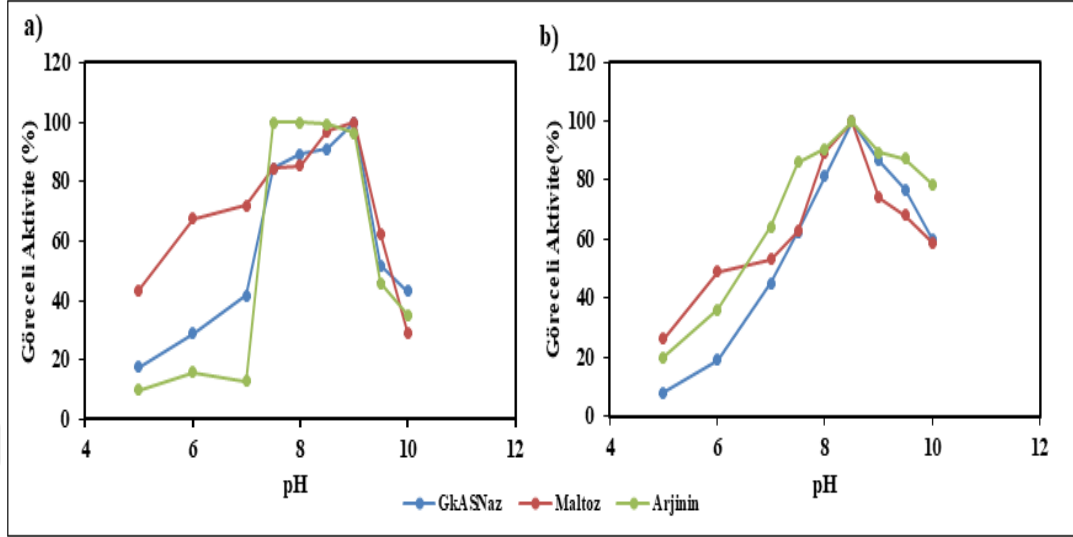
37°C'da *GkASNaz*'ın maksimum aktivitesi (%100) maltoz içeren ve içermeyen durumlarda pH 9.0' da belirlenirken, arjinin varlığında enzimin maksimum aktivitesinde artış gözlenmiştir ve pH 9.5 olarak belirlenmiştir. 55°C'de ise ozmolitlerin varlığında ve yokluğunda *GkASNaz* maksimum aktiviteyi pH 8.5'te göstermiş. Bununla birlikte maltoz varlığında enzim aktivitesi pH 5.0-8.0 aralığında artış gösterirken, arjinin tüm pH değerlerinde enzim aktivitesini yaklaşık 2 kat arttırmıştır.



Şekil 3.6: Maltoz ve arjinin varlığında pH'ın *GkASNaz* aktivitesi üzerindeki etkisi. 37°C, b) 55°C'de göreceli enzim aktiviteleri.

GkASNaz'ın ozmolitler varlığında pH stabilitesi Şekil 3.7' de gösterilmiştir. Enzim ozmolitler varlığında +4°C'da 2 gün inkübe edildikten sonra, enzim aktivitesi 37°C ve 55°C'de ölçülerek belirlenmiştir. pH stabilite deneyleri sonucunda *GkASNaz* arjinin varlığında 37°C'da maltoz içeren ve ozmolit içermeyen enzime oranla en yüksek aktiviteyi pH 7.5-9.0 arasında göstermiş, maltoz varlığında ise pH 5.0-7.0 arasında enzim stabilitesinde yaklaşık 2 kat artış gözlenmiştir. 55°C'de maltoz enzim

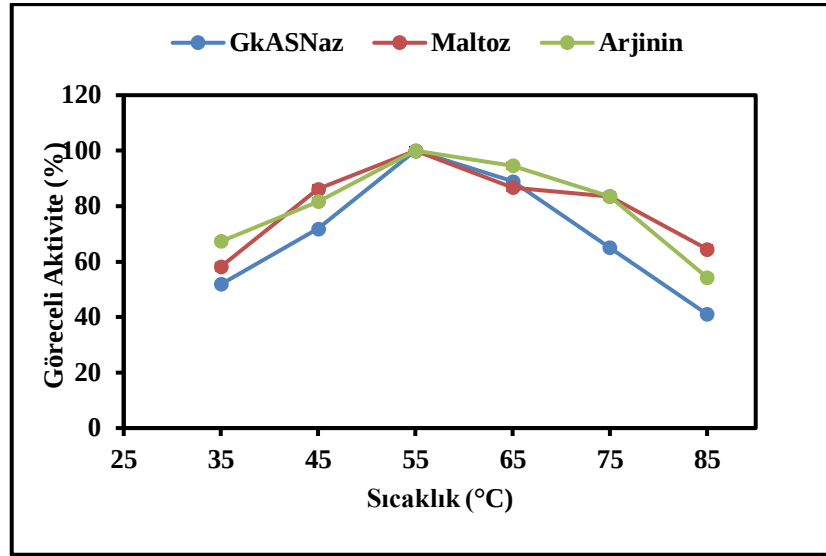
stabilitesini pH 5.0-7.0 aralığında artırırken arjinin varlığında ozmolit içermeyen enzime göre stabilitesi 1-1.5 kat arttırmıştır.



Şekil 3.7: *GkASNaz*ın maltoz ve arjinin varlığında pH stabilitesi. a) 37°C, b) 55°C'de göreceli enzim aktiviteleri.

3.6. Osmolit Varlığında Sıcaklığın *GkASNaz* Aktivitesi Üzerine Etkisi

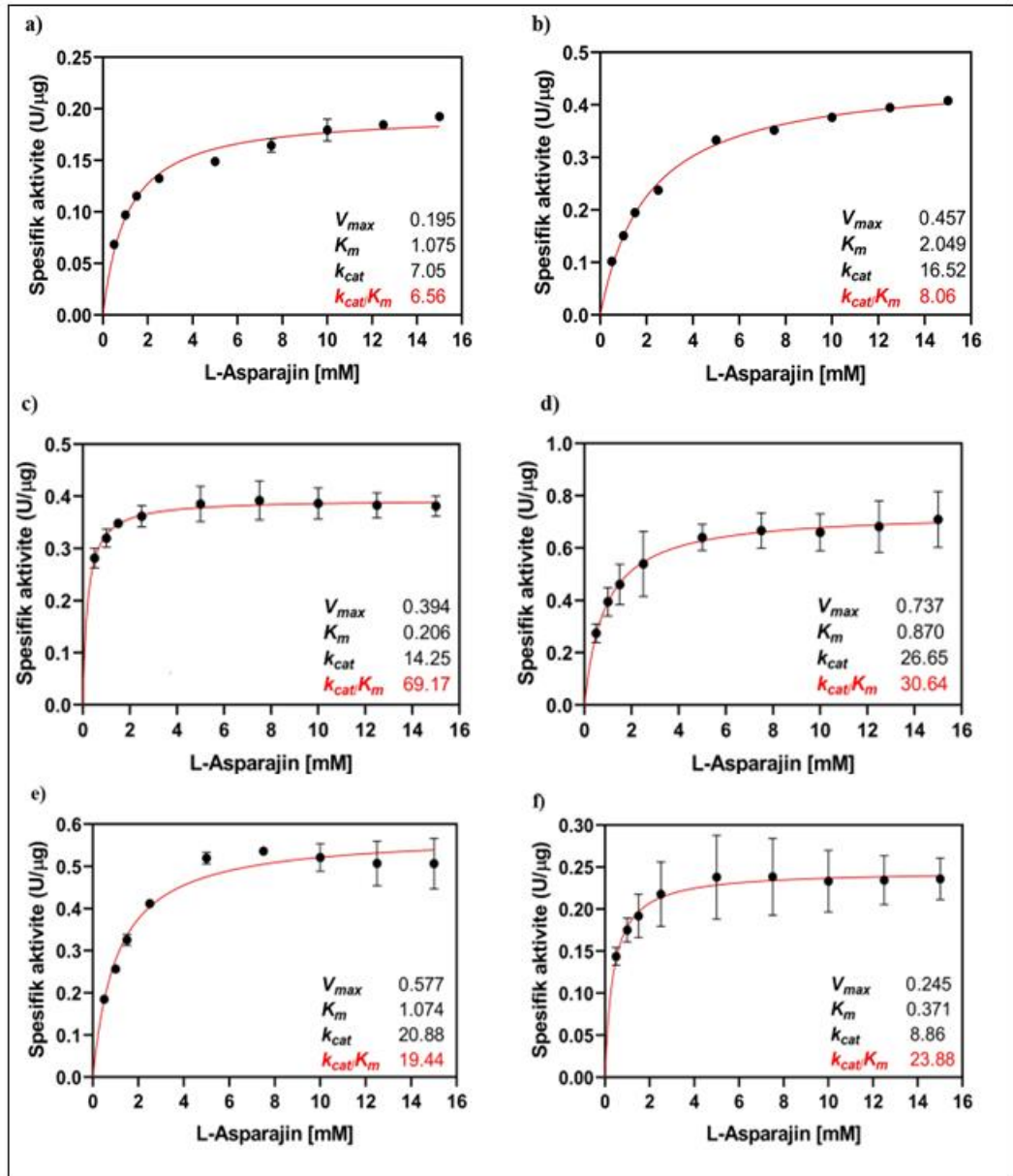
GkASNaz ozmolitler varlığında optimum sıcaklığını belirlemek için enzim pH 8.5'te, 35-85°C aralığında değişen farklı sıcaklıklarda 12 dk inkübe edilerek aktiviteleri belirlenmiştir. Şekil 3.8'de gösterildiği gibi *GkASNaz* aktivitesi maltoz ve arjinin varlığında tüm sıcaklık aralıklarında artış göstermiş ve her üç ortamda optimum sıcaklık 55°C'de tespit edilmiştir.



Şekil 3.8: Maltoz ve arjinin varlığında sıcaklığın *GkASNaz* aktivitesi üzerine etkisi.

3.7. Osmolit Varlığında Enzimin Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Michaelis-Menten denklemi, enzim kinetiğinde reaksiyon hızının substrat konsantrasyonuna bağlı olarak gerçekleşen değişimini gösterir. Enzimin maksimum hızının yarısı K_m olarak ifade edilmektedir. K_m değeri, bir enzimin substrat ile etkileşim gücünü ve etkinliğini değerlendirmek için önemli bir parametredir ve her enzim için farklıdır. Dolayısı ile substratın enzime olan ilgisinin bir ölçüsü olarak görülmektedir. *GkASNaz*'ın osmolitler varlığında ve yokluğunda K_m ve V_{max} parametrelerinin hesaplanması için artan substrat konsantrasyonlarında hem 37°C hem de 55°C'deki spesifik aktivite değerlerinden elde edilen veriler kullanılarak doğrusal olmayan Michealis–Menten grafikleri çizilmiştir (Şekil 3.9). Şekil 3.9'da yer alan enzimin maltoz ve arjinin varlığında ve yokluğunda belirlenen kinetik parametreleri Tablo 3.2'de de gösterilmektedir.



Şekil 3.9: Maltoz ve arjinin varlığında *GkASNaz*'ın Michaelis-Menten grafikleri. a- b) *GkASNaz*, sırasıyla 37°C, 55°C, c-d) *GkASNaz*+Maltoz, sırasıyla 37°C, 55°C e-f) *GkASNaz*+Arjinin, sırasıyla 37°C, 55°C.

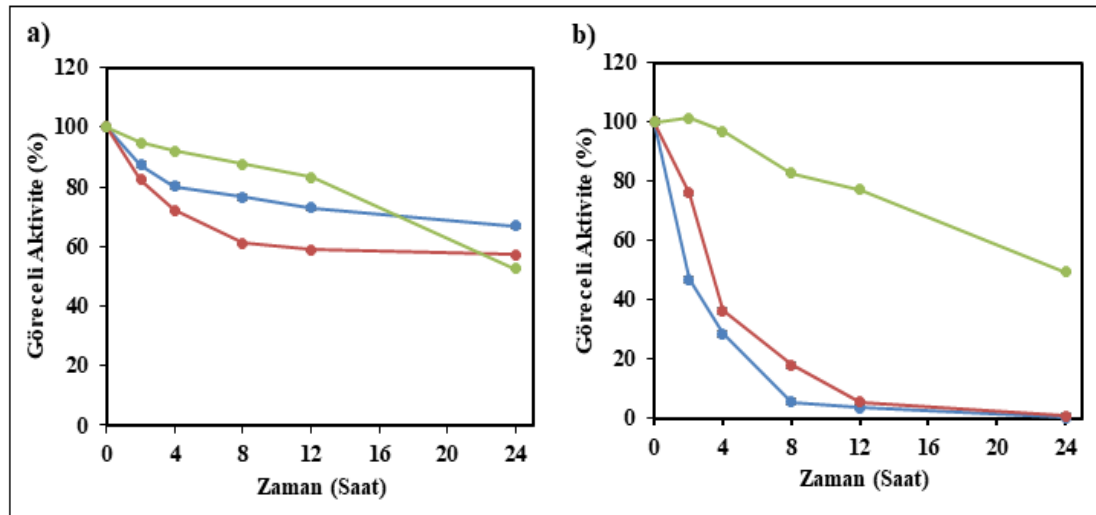
Tablo 3.2: Maltoz ve arjinin varlığında *GkASNaz*'ın kinetik parametrelerinin karşılaştırılması.

Sıcaklık	Enzim	V_{max} (U/mg)	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ min ⁻¹)	Katalitik Etkinlik Oranı
37°C	<i>GkASNaz</i>	0.195	1.075	7.05	6.56	--
	<i>GkASNaz</i> + Arjinin	0.245	0.371	8.86	23.88	3.6
	<i>GkASNaz</i> + Maltoz	0.394	0.206	14.25	69.17	10.5
55°C	<i>GkASNaz</i>	0.457	2.049	16.52	8.06	--
	<i>GkASNaz</i> + Arjinin	0.577	1.074	20.88	19.44	2,4
	<i>GkASNaz</i> + Maltoz	0.737	0.870	26.65	30.64	3.8

GkASNaz'ın, 37°C'de ozmolit içermeyen K_m değeri 1.075 mM olarak belirlenirken, arjinin ve maltoz ozmolitler varlığında K_m değerleri sırasıyla 0.371 ve 0.206 olarak hesaplanmıştır. 55°C'de ise *GkASNaz*'ın K_m değerleri sırasıyla 2.049, 1.074 ve 0.870 olarak bulunmuştur. Her iki sıcaklık değeri ve her iki ozmolit varlığında enzimin substratı L-asparjine olan afinitesinde artış gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, arjinin ve maltoz varlığında enzimin katalitik etkinlik oranında artış gözlenmiştir. Arjinin ile kıyaslandığında maltoz varlığında enzimin katalitik etkinliğinde görülen artış 37°C'de yaklaşık 3 kat, 55°C'de ise 1.6 kat olarak hesaplanmıştır.

3.8. Ozmolit Varlığında Enzimin Termal Kararlılıklarının Belirlenmesi

Ozmolitler katlanmamış durumun serbest enerjisini yükselterek katlanmış durum konformasyonunu destekler. Maltoz ve arjinin ozmolitleri varlığında ve yokluğunda *GkASNaz*'ın 37°C ve 55°C'teki termal kararlılıkları Şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10: Maltoz ve arjinin varlığında *GkASNaz*'ın termal kararlılığı. (a) 37°C ve (b) 55°C.

GkASNaz, 37°C'de 24 sa'in sonunda aktivitesini %66 oranında korurken, 55°C'ta ise 4 sa'lik inkübasyon sonunda aktivitesinin yaklaşık %70'ini kaybetmiştir. Arjinin varlığında her iki sıcaklıkta enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir. *GkASNaz* aktivitesi 37°C'da 12. Sa'in sonunda başlangıç aktivitesini %73 oranında korurken, 55°C sıcaklıkta ise bu oran %77 olarak bulunmuştur. Maltoz varlığında ise 37°C sıcaklıkta 12 sa'e kadar başlangıç aktivitesini %59 oranında korurken 55°C'de enzim aktivitesinin tamamını kaybetmiştir.

Tablo 3.3: *GkASNaz*ın maltoz ve arjinin varlığında termal stabilite parametreleri.

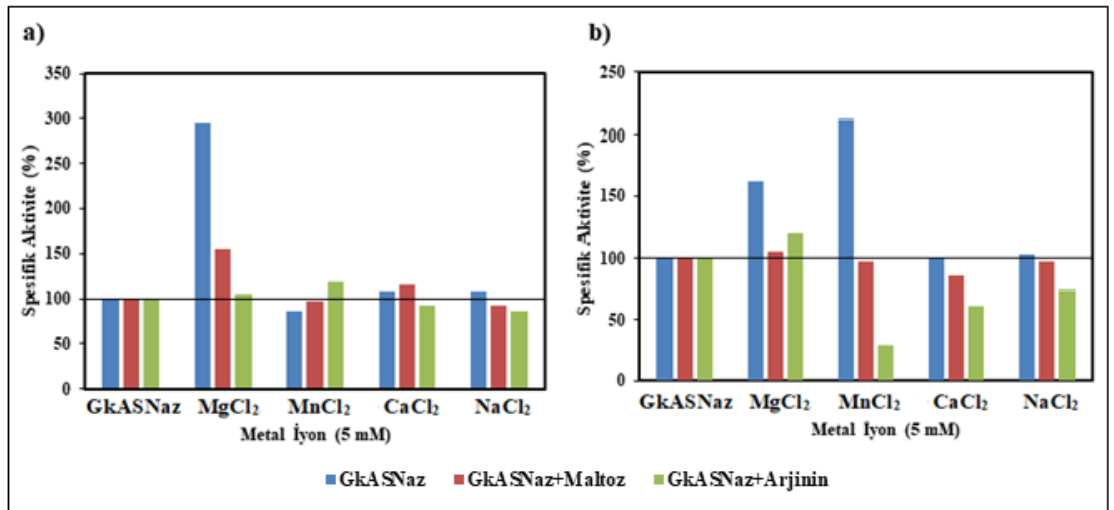
	<i>GkASNaz</i>		<i>GkASNaz</i> +Maltoz		<i>GkASNaz</i> +Arjinin	
Sıcaklık	37 °C	55 °C	37°C	55°C	37°C	55°C
$k_d(h-1)$	0.029	0.248	14.5±0.09	0.198	0.029	0.032
$t_{1/2}(h)$	24±0.015	2.8±0.02	14,5	3.5±0.06	23.6±0.1	22±0.03
SF	1	1	0.6	1.25	0.98	7.86

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; sıcaklığın 37°C' dan 55°C'a yükselmesiyle birlikte k_d değerinin de arttığı görülmektedir. *GkASNaz*'ın 37 °C k_d değeri 0.029 iken 55 °C k_d değeri 0.248 olarak ölçülmüştür. Bununla beraber sıcaklığa bağlı olarak k_d değerindeki artışın enzimin yarılanma ömründe azalmaya neden olduğu bilinmektedir. *GkASNaz*'ın maltoz ve arjinin varlığındaki $t_{1/2}$ değerleri, 37 °C'de arjinin varlığında aynı kalırken maltoz varlığında ise 2 kat azalmıştır. Bu çalışmada

da artan sıcaklık $t_{1/2}$ değeri azalmaya neden olmuştur. Sıcaklığın 37 °C ve 55 °C olduğu koşullarda enzimin $t_{1/2}$ değeri sırasıyla 24 ve 2.8 dk olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte 55 °C’da enzimin yarılanma ömür değerleri maltoz varlığında yaklaşık 1.3 oranında arjinin varlığında ise yaklaşık 7.9 oranında artış göstermiştir.

3.9.Ozmolit Varlığında Çeşitli Metal İyonlarının (5 mM) L-Asparaginaz Aktivitesine Etkisi

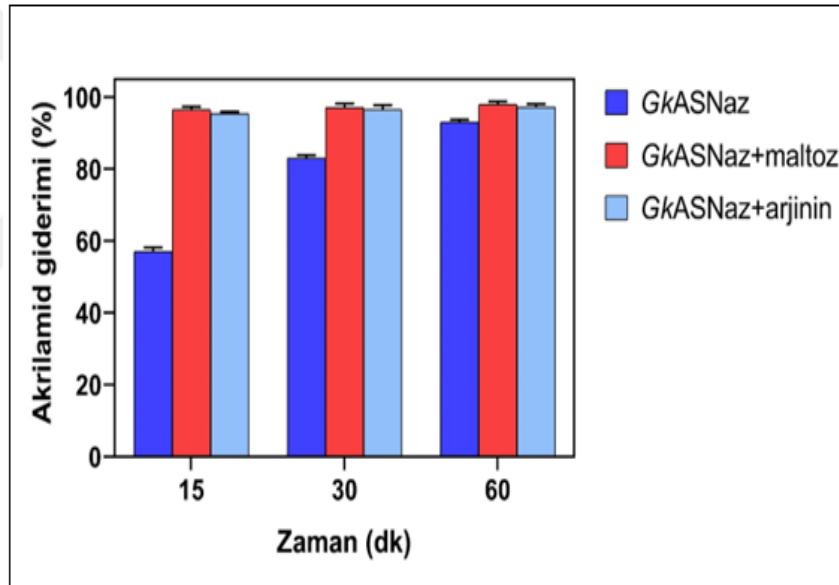
Çeşitli metal iyonlarının ozmolitler varlığında *GkASNaz* aktivitesi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla *GkASNaz* metal iyonları (5 mM) ve ozmolitler (30 Mm) içeren 50 mM TrisHCl tamponu (pH 8.5) içinde oda sıcaklığında 1 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda enzimin hem 37°C hem de 55°C’deki aktivitesi yöntem 2.5.5’te belirtilen koşullarda ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 3.11’de gösterilmiştir. Enzim aktiviteleri ozmolit içermeyen enzim aktivitesinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Enzim 37°C’da en yüksek aktiviteyi $MgCl_2$ varlığında gösterirken (% 295), 55°C’de ise en yüksek aktivite $MnCl_2$ varlığında (%212) gözlenmiştir. 37°C’da maltoz varlığında $MgCl_2$ enzim aktivitesi üzerindeki etkisini yaklaşık %40 oranında korurken diğer metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinde önemli bir etkisi görülmemiştir. Benzer bir şekilde arjinin varlığında metal iyonlarının enzim aktivitesi üzerinden önemli bir etkisi gözlenmemiştir. Maltoz varlığında 55°C’de ise $MgCl_2$ ve $MnCl_2$ ’ün enzim aktivitesi üzerinde gösterdiği etki sırasıyla %33 ve %54 oranında azalırken arjinin varlığında $MgCl_2$ ’un inhibe edici etkisi gözlenmiştir.



Şekil 3.11: Arjinin ve maltoz varlığında metal iyonlarının *GkASNaz* aktivitesi üzerine etkisi. a) 37°C, b) 55°C.

3.10. Ozmolit Varlığında Enzimin Akrilamid Giderim Potansiyeli Üzerine Etkisi

Maltoz ve arjinin varlığında ve yokluğunda 2 gün 4°C’da inkübe edilen *GkASNaz*’ın *GkASNaz*’ın akrilamid giderim potansiyeli, asparajin-nişasta gıda modeli kullanılarak HPLC ile test edilmiştir. Akrilamid giderimi için 0.5 ünite enzim kullanılmış ve 15, 30 ve 60 dk’lık reaksiyon süresi sonunda akrilamid giderimi Şekil 3.12’de gösterilmiştir. *GkASNaz*’ın başlangıç aktivitesi için 15, 30 ve 60 dk muamele süreleri uygulandığında, akrilamid azaltma değerleri serbest enzim için sırasıyla %57±1.2, %83±0.9 ve %93±0.8 iken, maltoz varlığında *GkASNaz* için %96.5±0.9, %97.1±1.1 ve %98±0.8, arjinin varlığında *GkASNaz* için %95.4±0.6, %96.5±1.3 ve %97.3±0.8 olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.12 Arjinin ve maltoz varlığında metal *GkASNaz*’ın akrilamid giderim potansiyeli.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

L-asparajinaz, ilaç ve gıda endüstrisinde önemli uygulamaları olan dolayısıyla ekonomik değeri yüksek bir enzimdir. L-asparajinaz, esas olarak L-aspartik asit ve amonyumdaki asparajin hidrolizini katalize eden bir enzimdir. Başta akut lenfoblastik lösemi olmak üzere lenfoid sistemin malign hastalıkları ve Hodgkin lenfomaları gibi farklı kanserlerin tedavisinde bir alternatif olarak ilaç endüstrisinde önemli uygulamaları bulunmaktadır. L-asparajinazın antineoplastik etkisi, dolaşımdaki plazma havuzunda bulunan L-asparajin içeriğinin L-aspartik asit ve amonyağa indirgenmesine bağlanmaktadır. Tümör hücreleri alışılmadık derecede yüksek L-asparajin gereksinimine sahiptir ancak çok düşük seviyelerde L-asparajin sentetaz içerirler ve bu nedenle hızlı malign büyümelerini sürdürmek için plazma L-asparajine bağımlıdırlar (Luhana ve ark., 2013). Harici terapötik L-asparajinaz, plazma L-ASN'nin tükenmesine neden olarak tümör hücrelerinin beslenme yoksunluğu nedeniyle ölümüyle sonuçlanır (Ando ve ark., 2005). Bununla birlikte, sağlıklı hücreler L-aspragine sentezleyebildikleri için etkilenmeden kaçarlar. Terapötik kullanımının yanı sıra, L-asparaginaz son zamanlarda gıda endüstrisinde akrilamid azaltıcı bir ajan olarak dikkat çekmektedir. Benzer şekilde L-asparajinaz, L-asparajinin hidrolizini katalize etme yolu ile ticari kızarmış gıdalarda indirgeyici şekerlerin bu aminoasit ile reaksiyona girmesine izin vermeyerek akrilamid seviyelerini azaltmakta ve bunun yanında gıdaların özelliklerini (renk, lezzet, doku, güvenlik vb.) korumaktır (Capuano ve ark., 2011)

L-asparaginaz gibi ilaç olarak kullanılan protein yapıda olan enzimler çevresel etmenlere karşı oldukça duyarlıdır. Enzimlerin inaktivasyonları veya etkinliklerinin azalması sıcaklık, ortam pH'ı, denatüre edici ajanlar gibi birçok faktörün etkisi ile gerçekleşir (Pande ve ark., 2000) Bu nedenle enzimlerin stabilizasyonu enzimin aktivitesinin korunması açısından zorunlu hale gelmiştir. (Mateo ve ark., 2003) Protein agregasyonu hem gıda hem de ilaç endüstrisinde önemli bir sorundur. Protein agregasyonu, protein moleküllerinin istenmeyen ve genellikle geri dönüşü olmayan kümelenmesini veya bir araya toplanmasını ifade eder (Frank ve ark., 1972). Bu süreç, ürünlerin kalitesini, stabilitesini ve etkinliğini tehlikeye atabilecek agregatların veya fibrillerin oluşmasına yol açabilir. Bu nedenle protein stabilitesi konusu,

proteinlerin genellikle endüstriyel, tıbbi ve farmasötik sektörlerde kullanılması nedeniyle sulu çözeltilerdeki stabilitesini arttırmanın olası yollarını araştırmak için bilim adamları için önemli bir konu haline gelmiştir.

Karmaşık bir sistem olarak proteinler, katlanmış hallerinde çeşitli konformasyonlarda bulunur. Bir proteinin termodinamik olarak kararlı yapısı, amino asit dizilerinin, amino asit zincirlerinin hidrofilik ve hidrofobik özelliklerine ve bunların birbirleri ve çevrelerindeki çözeltiliyle oluşturdukları etkileşimlere dayanır (Yoshioka ve ark., 2011; Gruebele .,1999).

Protein stabilitesini arttırmak için kullanılan popüler stratejilerden biri, katlanmış topluluğu destekleyen şekerler, polioller ve nötr amino asitler gibi küçük organik moleküller olan yardımcı çözücülerin (ozmolitler) kullanılmasıdır (Mojtabavi ve ark., 2019). Ozmolitlerin herhangi bir yan etkisi olmayan terapötik kullanımları (Wlodarczyk ve ark., 2018) proteinlerin toplanma hikayesi açısından onları diğerlerinden ayırmaktadır.

Bu bilgiler ışığında, mikrobiyal L-ASNaz enzimini ozmolitler ile birlikte kullanarak stabilitesinin korunması ve aynı zamanda akrilamid giderimi konusunda daha verimli kullanılmayı düşündürmüştür. Ozmolitlerin, çeşitli enzimlerin depo koşullarında stabilitesini koruduğunu gösteren literatürde birçok çalışma yer almasına rağmen bilgilerimiz dahilinde L-asparaginaz ile yapılan sadece bir çalışma bulunmaktadır (Wlodarczyk ve ark., 2019). Aynı zamanda ozmolitlerle birlikte asparajinazın akrilamid giderimi konusunda da literatürde bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, *Geobacillus kaustophilus* DSM7263^T L-asparaginaz enziminin çeşitli osmolitler (maltoz, süktroz, trehaloz, glisin ve arjinin) varlığında aktivitesi, kinetik parametreleri, stabilitesi ve akrilamid giderimindeki etkisi çalışılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızın ilk aşamasında laboratuvarımızda daha önce pET-22b(+) vektörüne klonlanmış olan *GkASNaz* geni, *E. coli* RosettaTM 2 (DE3) hücrelerinde IPTG (1 mM) ile uyarılarak yüksek miktarda eksprese edilmiştir. *GkASNaz*'ın ifadesi, proteinin moleküler ağırlığının yaklaşık 36 kDa olduğunu gösteren hücre özütünden SDS-PAGE ile doğrulanmıştır. Daha sonra karboksi-terminalinde 6x-His kuyruğu taşıyan enzim, Ni-NTA afinite kromatografisi ile tek basamakta saflaştırılmış ve filtrasyon işlemi ile Tris-HCl tamponu içinde konsantre edilmiştir. Yaklaşık olarak 36 kDa moleküler ağırlığa sahip monomer yapıda bir protein Saflaştırılmış enzim,

elektroforez jelinde 36 kDa büyüklüğünde kalın bir bant oluşturarak laboratuvarımızda daha önce uygulanan ekspresyon çalışmalarını desteklemiştir (Özdemir ve ark., 2022). *GkASNaz* aktivitesi enzimin L-asparajini hidrolizi sırasında açığa çıkan amonyak miktarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Enzim 5.7 kat saflaştırılmış ve saflaştırmanın spesifik aktivitesi %38.3 verimle 231.39 U/mg'dır.

Çalışmamızın ikinci aşamasında, ozmolitlerin (amino asitler, polioller ve karbonhidratlar) saflaştırılmış *GkASNaz* enziminin spesifik aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirdik. L-asparaginaz enzimin yukarıda bahsedildiği gibi iki önemli uygulama alanı bulunmaktadır. Bu anlamda ozmolitler ile yapılan çalışmalarda enzim reaksiyonları enzimin fizyolojik şartlarda aktivitesini belirleyebilmek için 37°C'de, enzimin akrilamid giderimindeki etkisini gözlemleyebilmek için de 55°C'de gerçekleştirilmiştir. Her ozmolitin konsantrasyonuna ve/veya ortamın pH'ına (çözücü koşulları) bağlı olarak spesifik olarak etki ettiği iyi bilinmektedir. İlk olarak, seçilen ozmolitlerin artan konsantrasyonlardaki (0, 10, 20, 30, 60, 90 mM) enzim aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Her iki sıcaklıkta artan ozmolit konsantrasyonlarında enzime göre yüksek aktivite maltoz, sükroz ve arjinin varlığında gözlenmiştir. Sorbitol 37°C'da artan konsantrasyonlara bağlı olarak yüksek aktivite gösterirken 55°C'de ozmolit içermeyen enzime göre önemli bir artış göstermemiştir.

Ozmolitler ile yaptığımız çalışmada, *GkASNaz* tüm ozmolitlerin 10 mM konsantrasyon varlığında yüksek aktivite göstermiştir. Bir sonraki adımda bu konsantrasyondaki ozmolitler varlığında enzim aktivitesinin korunması incelenmiştir. Buna göre, enzim 10 mM ozmolitler içeren reaksiyon tamponunda +4°C'da 30 gün inkübe edilmiş ve farklı zaman aralıklarında enzim aktiviteleri ölçülmüş ve aynı şartlarda ozmolit yokluğunda enzim aktivitesi ile karşılaştırılmıştır. 37°C'da yapılan ölçümlerde enzim 2. günün sonunda enzim aktivitesini %95 oranında korurken 30. gün sonunda %78'ini korumaya devam etmiştir. Maltoz ve arjinin varlığında *GkASNaz*'ın depolama stabilitesinin arttığı gözlenmiştir. Bu artış maltoz varlığında 2. gün %166 ve 30. gün %116, arjinin varlığında ise 2. gün %187 olarak tespit edilmiştir. Arjinin ile birlikte 37°C'da 20. ve 30.günlerde enzime negatif etkiye bulunmuştur. 55°C'de yapılan ölçümlerde ise hem maltoz hem arjinin varlığında depolama stabilitesinin arttığı gözlenmiştir. Bu artış enzim ile karşılaştırıldığında 30. günün sonunda maltoz varlığında 2 kat arjinin varlığında ise 2.5 kat olarak

belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz veriler sonucunda bundan sonraki çalışmalarımıza *GkASNaz* aktivitesi üzerinde arttırıcı etki gösteren ve aynı zamanda literatürde olağanüstü bir protein stabilizatörü olduğu bilinen ve enzimlerin aktivitesinin korunmasına yardımcı olan doğal ozmolitler; arjinin (Khan ve ark., 2010) ve maltoz ile devam edilmiştir.

Bir proteinin çözünürlüğü, protein yüzeyindeki hidrofobik ve hidrofilik kalıntıların dağılımına bağlıdır. Çözünürlüğü belirleyen diğer temel faktörler pH, sıcaklık, tampon bileşimi, konformasyon ve stablitedir (Maity ve ark., 2009).

Ozmolitlerin enzimin pH etkinliği üzerindeki etkisine bakıldığında maltoz hem 37 °C'da hem de 55°C'de, pH 7.5 ile pH 10.0 aralığında enzim ile benzer davranışlar sergilemiştir ancak maltoz her iki sıcaklık derecesinde düşük pH aralığında (pH 5.0 ve pH 7.0) aktivitesini arttırmıştır. Bu artış 37°C'da yaklaşık 3 kat olarak belirlenmiştir. Arjinin varlığında 37°C'de tüm pH değerleri enzim aktivitesinin altında kalırken enzimin optimum pH'sı 9.0 'dan pH 9.5'a yükselmiştir. Bununla birlikte 55°C'da arjinin enzim aktivitesinde etkisini göstermiş ve enzim aktivitesinde yaklaşık 2 kat artış sağlamıştır. Benzer şekilde ektoin varlığında *Bacillus halodurans*'tan rekombinant bir ksilanaz ile yapılan çalışmada bu ozmolitin düşük (4.5 ve 5.0) ve yüksek pH'da (11.0 ve 12.0) artış gösterdiği bulunmuştur (Van-Thuoc ve ark., 2012).

GkASNaz optimum sıcaklık değeri maltoz ve arjinin varlığında değişmemiş ve her üç ortamda optimum sıcaklık 55°C'de tespit edilmiştir. Her iki ozmolit varlığında 55°C'nin altında ve üstündeki sıcaklık derecelerinde enzim aktivitesi artış göstermiştir. Bu artış maltoz varlığında 45°C'da 1.9, 75°C'da 1.3 85°C'da ise 1.5 kat olarak belirlenmiştir. 2020 yılında yayınlanan bir çalışmada Joghee ve arkadaşları, Nε-asetil L-lizinin α-amilazın pH 5.0' de incelenen ektoin, prolin, glisin betain, trehaloz ve sükroz ozmolitlerinin varlığında enzimin 40°C olan enzim optimum sıcaklığını 50°C'a arttırdığı ve enzimin termodinamik stabilitesini geliştirdiği tespit edilmiştir (Joghee ve ark., 2020). Benzer şekilde literatürde, RNaz-A ve hekzokinaz için sorbitol, RNaz-A için glukoz, lizozomlar için trehaloz, ve laktat dehidrojenaz için dimetilglisin gibi ozmolit ilavesiyle enzimlerin denatürasyon sıcaklığında kayda değer artışlar olduğu bildirilmiştir (Ishrat ve ark., 2018; Xie ve ark., 1997; Jeong ve ark.,2021; Göller ve Galinski, 1999; Ishrat ve ark., 2018; Xie ve ark., 1997; J. Jeong ve ark., 2021; Göller ve ark., 1999.)

Osmolitler, proteinlerin katlanmış halini destekledikleri için iyi bilinen biyokatalizör stabilizatörleridir. Osmolit ilavesiyle enzimlerin denatürasyon sıcaklığını arttırmanın yanı sıra osmolitler enzim katalizli reaksiyonların kinetiğini ve termodinamiğini de etkilemektedir (Gajardo-Parra ve ark., 2022). Biyoreaksiyonların kinetiğini iyileştirmek için, yardımcı çözücü ilavesi, V_{max} değerini sabit (veya artırılmış) tutarken K_m 'yi azaltmayı amaçlamaktadır (Wangler ve ark., 2019). *GkASNaz*'ın hem maltoz hem de arjinin varlığında kinetik parametreleri, substrat olarak L-asparajinin kullanılmasıyla belirlenmiştir. Enzim reaksiyon öncesinde 2 gün osmolitler varlığında +4°C'da inkübe edilmiştir. Sonuçlara göre *GkASNaz*'ın K_m değerleri hem 37°C hem de 55 °C'de kontrollerine kıyasla azalmış ve V_{max} değerleri artmıştır. Her iki sıcaklıkta maltoz varlığında arjinine oranla daha düşük K_m değerleri ile sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar, enzimin katalitik etkinliğinin osmolitlerin varlığıyla arttığını ve maltozun arjininden daha etkili olduğunu göstermektedir. Farklı olarak *Erwinia chrysanthemi*'den (ErA II) elde edilen rekombinant L-asparaginaz II'nin süktroz ve sorbitol varlığında kinetik parametreyi (K_m) önemli ölçüde değiştirmemiş ve sonuç olarak ErA II'nin genel katalitik etkinliği (k_{cat}/K_m) aynı kalmıştır (Wlodarczyk ve ark., 2019).

Termal inaktivasyon deneyi, *GkASNaz*'ın 37 ve 55°C sıcaklıklarda 24 sa inkübe edilmesiyle belirlenmiştir. 37°C'ta *GkASNaz*, 12 sa'lik inkübasyonun ardından başlangıç aktivitesinin %73'ünü korurken 55°C'da %96 kaybetmiştir. Her iki sıcaklıkta *GkASNaz* arjinin varlığında enzim stabilitesini 12. sa'in sonunda 37°C'da %83, 55°C ise %77 korumuş, 24. sa'in sonunda ise her iki sıcaklıkta da %50 kalan aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, *GkASNaz* yapısının arjinin aracılı stabilizasyonu, yüksek sıcaklıkta enzim aktivitenin korunmasına kesinlikle yardımcı olmuştur.

Metal iyonlarının, enzimin aktivitesini yüksek sıcaklıkta termal denatürasyondan koruyarak muhafaza etmede önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (El-Naggar ve ark., 2018). Bir dizi metal iyonunun ($MgCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$ ve $NaCl_2$) maltoz veya arjinin varlığında ve yokluğunda *GkASNaz* aktivitesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. *GkASNaz* aktivitesi 37 ve 55°C sıcaklıklarda $CaCl_2$ ve $NaCl_2$ gibi metal iyonlarından etkilenmediği gözlenmiştir. Osmolitler varlığında bu metaller enzim aktivitesinde çok önemli bir değişiklik göstermemiştir. $MgCl_2$ her iki sıcaklıkta enzim aktivitesini arttırırken 37°C'da maltoz varlığında artış göstermekle beraber enzime göre daha az aktivite göstermiştir. *GkASNaz*'ın 37°C'de $MnCl_2$

varlığında %15 oranında azalırken sadece arjinin varlığında enzim aktivitesinde %20 artış gözlenmiştir. 55°C’de ise enzim hem MgCl₂ hem de MnCl₂ varlığında yüksek oranda artış göstermiş ancak ozmolitler varlığında sadece MgCl₂ ile çok düşük oranda artış gözlenmiştir (maltoz %6, arjinin %18). MnCl₂ ise 55°C’da ozmolitlerin varlığında enzime inhibe edici etki göstermiştir. Bu oran maltoz için %3 iken arjinin için %78 olarak belirlenmiştir. Farklı olarak Norouzi ve arkadaşlarının trehaloz ve prolin ilavesiyle PersiXyn2 enzimi ile yaptıkları çalışmada metal iyonlarının önemli etki gösterdiğini görmüşlerdir. 40°C’da yapılan çalışmalarda MgCl₂’nin varlığı, enzimatik aktiviteyi %86.79 oranında inhibe edilirken trehaloz varlığında %135.52 oranında artış göstermiş, prolinin varlığında ise inhibe edici etki göstermiştir. Enzim aktivitesini 2 kat arttıran MnCl₂ her iki ozmolit varlığında enzim aktivitesini daha da arttırmıştır (Sara Norouzi ve ark., 2020)

Akrilamid, karbonhidrat açısından zengin gıdaların yüksek sıcaklıkta işlenmesi veya pişirilmesi sırasında oluşur. Bu sebeple gıda endüstrisi, tahıl taneleri (çavdar, buğday, yulaf, mısır), yumrular (patates), fasulye, tohumlar ve depo kökleri gibi çeşitli ürünlerden elde edilen gıdalarda akrilamid varlığı sorunuyla karşı karşıyadır (Ciesarová, 2016). Enzimler, özellikle de asparajinaz, işlenmiş ürünlerde akrilamid oluşumunu azaltmada etkili olmuştur. Asparajinaz son ürün kalitesini olumsuz etkilemeden L-asparajinazı hidroliz etme yolu ile gıdalardaki akrilamid seviyesini düşürmektedir. *GkASNaz* ile yaptığımız daha önceki çalışmalarda (Özdemir ve ark., 2023, 2024) enzimin akrilamid giderimindeki etkinliğini belirledik. Bu çalışmada ise ozmolitlerin *GkASNaz* enzimi üzerindeki koruyucu etkisini enzimin akrilamid gideriminde göstermeyi amaçladık. *GkASNaz*’ın ozmolitler varlığında akrilamid azaltma performansları nişasta ile test edilmiştir. Ozmolit varlığında +4°C’da 2 gün inkübe edilen *GkASNaz* ile gerçekleştirilen 15 dk’lık reaksiyon sonunda ozmolit içermeyen enzime göre yaklaşık 1.7 kat artış göstererek akrilamid miktarının yaklaşık %97 oranında azaltığı HPLC ile gözlemlenmiştir. 60 dk’lık reaksiyon sonunda ise enzimin akrilamid giderim performansı ozmolit yokluğunda artarken (%95) maltoz ve arjinin varlığında ise korunmuştur (%97).

GkASNaz’ın ozmolit varlığında ölçülen enzim aktivitesi sonuçlarına göre 55°C sıcaklıkta gıda endüstrisinde akrilamid giderimi için önem oluştururken, 37°C sıcaklıkta ise ilaç sektöründe enzimlerin stabilitesini korumasını açısından önem teşkil etmektedir.

Genel olarak osmolitler, proteinler için denatürasyon veya agregasyonu önleyebilen güçlü stabilizatörler/koruyuculardır. Osmolitler aynı zamanda farmasötik ürünlerin stabilizasyonu gibi biyoteknolojik uygulamalarda da kullanılarak ürün kalitesi ve verimliliği üzerinde olumlu etkileri vardır (Arakawa ve ark., 2006). Bu moleküllerin çoğu, doğal protein konformasyonunu destekleyebilir (Stärtzel ve ark., 2016) ürün performansını geliştirebilir veya daha etkili ve güvenli bir ilaç sağlayabilir (Elder, 2016). Arginin, FDA onaylı biyolojik ilaçlar arasında en sık kullanılan üçüncü amino asittir. Konsantrasyonuna bağlı olarak stabilizatör olarak görev yapabilen arginin, stabilitesinden ödün vermeden proteinlerin çözünürlüğünü artırır (Platts, 2015). Aynı zamanda proteinleri inklüzyon cisimciklerinden çözer ve kromatografik saflaştırma adımları sırasında topaklanmayı önler.

Enzimlerin aktivitesi depolama ve endüstriyel uygulamalar sırasındaki stabilitelerine bağlıdır (Misset, 1993). Protein yapısındaki ilaçların hazırlanması ve hastaya verilmesi süresince ortamdaki enzimin aktivitesini negatif etkileyen faktörleri ortadan kaldırmak amacıyla osmolitlerden faydalanabilir. Osmolitlerin ilaçlarla birlikte kullanılabilmesi geleceğe yönelik büyük bir perspektif olabilir. Bu organik osmolitlerle kullanılan protein bazlı ilaçlarda stabilitenin sağlanmasına ve bununla birlikte enzim aktivitesini koruyarak ilacın etkisini arttırmada önemli bir strateji olarak öne çıkmaktadır (Mojtabavi ve ark., 2019).

Her bir unlu mamul için değerlendirilen akrilamid azaltım stratejilerine L-Asparaginaz enziminin osmolitler varlığında akrilamidin gerekli olabilecek referans seviyelerinin altına düşürülmesi konusunda sektöre yol gösterecektir. Bu çalışma sonucunda, asparajinaz enzimini osmolit varlığında kullanılarak fırıncılık ürünlerinde yüksek oranlarda akrilamid indirgenmesi sağlanmıştır. Bu strateji, gıda endüstrisine fırıncılık ürünlerinde akrilamidin azaltması için bir kılavuz olarak kullanılabilir. Akrilamid azaltma stratejisi için bir araç olarak öngörülen asparajinaz enziminin osmolit ile kullanımı, ısıl işlem parametrelerinde ve ürün formülasyonlarında herhangi bir değişiklik yapmayı gerektirmemesi, duyuşal özellikleri koruması gibi nedenlerle iyi bir seçenek olarak öne çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

- Adamczak, K. M., (2018), "Effect of osmolytes on the thermal stability of proteins: replica exchange simulations of Trp-cage in urea and betaine solutions", *Phys. Chem. Chem. Phys.* (16), 1174–82.
- Adhikary, R. Z., (2014), "Evidence of an unusual N-H center dot center dot center dot N hydrogen bond in proteins", *Journal of the American Chemical Society* (136), 13474–13477.
- Alagöz, D. T., (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), 09739.
- Alam, S. A., (2018), "Asparaginase conjugated magnetic nanoparticles used for reducing acrylamide formation in food model system", *Bioresource Technology* (269), 121–126.
- Ando, M. S., (2005), "Selective apoptosis of natural killer-cell tumours by L-asparaginase", *British Journal of Haematology*, (130(6)), 860-868.
- Appelletti, D. C., (2008), "Helicobacter pylori-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent, Biochemical and biophysical research communications", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (377(4)), 222- 1226.
- Arakawa, T. E., (2006), "Small Molecules Pharmacological Chaperones: From Thermodynamic Stabilization to Pharmaceutical Drugs", *Biochimica et Biophysica acta*, (1764(11)), 1677-1687.
- Asselin, B., (2015), "Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring", *Leukemia & Lymphoma*, (56:8), 2273-2280.
- Attri P, V. P., ((2012)), "TMAO and sorbitol attenuate the deleterious action of atmospheric pressure non-thermal jet plasma on α -chymotrypsin", *RSC Adv.*, (18), 7146–55.
- Azmi, W. N., (2017), "An Antileukemic Glutaminase Free L-Asparaginase from *Bacillus brevis*", *Current Biotechnology*, (6(1)), 58-68.
- Bagnasco, S. B., (1986), "Predominant osmotically active organic solutes in rat and rabbit renal medullas", *The Journal of Biological Chemistry*, (5;261(13)), 5872-5877.
- Baier, S., (2001), "Impact of preferential interactions on thermal stability and gelation of bovine serum albumin in aqueous sucrose solutions," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (49(5)), 2600–2608.
- Bano, S. V., (1980), "Preparation And Properties Of L-Asparjinase From Green

Chillies (*Capsicum annum* L.)”, *Journal of Biosciences*, (2(4)), 291.

Batool, T. M., (2016), “A Comprehensive Review on L-Asparjinase and Its Applications”, *Applied Biochemistry and Biotechnology* (178), 900–923.

Bell TL, A. M., (2004), “Ecophysiology of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus* spp”, *Plant Ecology*, (171(1-2)), 35-52.

Bhat, J. K., (1998), “Thermal stability of proteins in aqueous polyol solutions: Role of the surface tension of water in the stabilizing effect of polyols”, *The Journal of Physical Chemistry*, (102(36)), 7058–7066.

Bon, E. P., (1997). “Asparjinase II of *Saccharomyces cerevisiae* GLN3/URE2 reulation of a periplasmic enzyme”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, (63-65), 203-212.

Borowitzka, L. J., (1974), “The salt relations of marine and halophilic species of the unicellular green alga *Dunaliella*”, *Archiv fur Mikrobiologie*, (96), 37–52.

Brandau, D. T., (2003), “Thermal stability of vaccines”, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, (92(2)), 218-31.

Broome, J., (1963), “Evidence that the L-asparjinase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects I. Properties of the L-asparjinase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance”, *The Journal of Experimental Medicine*, (118), 99–120.

Cachumba, J. J., (2016), “Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production”, *Brazilian Journal of Microbiology*, (47 Suppl 1(Suppl 1)), 77-85.

Cachumba, J. J., (2016), “Current applications and different approaches for microbial l-asparjinase production”, *Brazilian Society for Microbiology*, (47 (Suppl. S1)), 77–85.

Campbell, H. A., (1967), “Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification, and antitumor activity”, *Biochemistry*, (6(3)), 721-730.

Canchi, D. R., (2010), “Equilibrium Study of Protein Denaturation by Urea”, *Journal of the American Chemical Society*, (132(7)), 2338–2344.

Capuano, E., (2011), “Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism , toxicity , occurrence in food and mitigation strategies”, *LWT - Food Science and Technology*, (44), 793–810.

Chakravarty, N. P., (2021), “A potential type-II L-asparaginase from marine isolate *Bacillus australimaris* NJB19: Statistical optimization, in silico analysis and structural modeling”, *International Journal of Biological Macromolecules*, (174), 527-539.

Chandel, T. K., (2017), "Impact of Osmolytes in Conformational Modulation of Protein and Its Applications in Biotechnology", *Chemistry*, 143-160.

Chhabra, G. C., (2017), "Osmolytes: Key Players in Regulating Protein Aggregation", *Cellular Osmolytes*.

Choi, B. H., (2019), "The Diverse Functions of Non-Essential Amino Acids in Cancer", *Cancers*, (11(5)), 675.

Christoph Held, G. S., (2016), "Compatible solutes: thermodynamic properties relevant for effective protection against osmotic stress", *Fluid Phase Equilibria*, (407), 224-235.

Clementi., (1922), "A. La désamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physiologique de sa présence dans l'organisme", *Archives Internationales de Physiologie*, (19(4)), 369-398.

Costa-Silva, T. A., (2020), "Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer", *Blood Reviews*(43), 100651.

Das, U. H., (2007), "Inhibition of protein aggregation: supramolecular assemblies of arginine hold the key", *PloS One*, (2(11)), 1176.

Davis, J. P., (2007), "Comparisons of the foaming and interfacial properties of whey protein isolate and egg white proteins *Colloids and Surfaces B*", *Biointerfaces*, (54(2)), 200–210.

De Martel, C. G., (2020), "Global burden of cancer attributable to infections in 2018 a worldwide incidence analysis", *The Lancet Global Health*, (8(2)), 180–190.

Deshpande, N. C., (2014), "Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*", *The Scientific World Journal*, 895167.

Dhankhar, R. G., (2020), "Microbial enzymes for deprivation of amino acid metabolism in malignant cells biological strategy for cancer treatment", *Applied Microbiology and Biotechnology*, (104(7)), 2857–2869.

Dolowy, W. C., (1966), "Toxic and antineoplastic effects of L-asparaginase. Study of mice with lymphoma and normal monkeys and report on a child with leukemia", *Cancer*, (19(12)), 1813–1819.

Dutta, S. R., (2015), "L-Asparaginase And L-Glutaminase From *Pseudomonas aeruginosa* Production And Some Physicochemical Properties", *Faculty of Biotechnology and Food Sciences*, (05(01)), 34-39.

Elder, D. P., (2016), "Pharmaceutical excipients quality, regulatory and biopharmaceutical considerations", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (87), 88-99.

El-Ghonemy, D., (2014), "Medical microbiology & Diagnosis microbial amidases and their industrial applications", *Medical Microbiology & Diagnosis*, (4), 1-16.

El-Naggar, N. E., (2018), "Purification, characterization and immunogenicity assessment of glutaminase free L-asparaginase from *Streptomyces broloosae* NEAE-115", *MC Pharmacology & Toxicology*, (19(1)), 51.

Endicott, M. J., (2021), "Amino acid metabolism as a therapeutic target in cancer", *Amino acids*, (53(8)), 1169-1179.

Fedotova, M. V., (2019), "Compatible osmolytes-bioprotectants Is there a common link between their hydration and their protective action under abiotic stresses", *Journal of Molecular Liquids*, (292), 111339.

Gama-Baumgartner, F., (2004), "Citric acid to reduce acrylamide formation in French fries and roasted potatoes", *Mitteilungen Aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, (95), 110-117.

Gao, J. B., (2009), "Localized thermodynamic coupling between hydrogen bonding and microenvironment polarity substantially stabilizes proteins", *Nature Structural & Molecular Biology*, (16(7)), 684-690.

Gekko, K. (1981), "Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol", *Biochemistry*, (20(16)), 4677-4686.

Govrin, R. T., (2018), "Zwitterionic Osmolytes Resurrect Electrostatic Interactions Screened by Salt", *Journal of the American Chemical Society*, (140(43)), 14206-14210.

Göller, K. A., (1999), "Protection of a model enzyme (lactate dehydrogenase) against heat, urea and freeze-thaw treatment by compatible solute additives", *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, (7), 37-45.

H., Y. P., (2005), "Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses", *The Journal of Experimental Biology*, (208(Pt 15)), 2819-2830.

Hendriksen, H. V., (2009), "Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (57(10)), 4168–4176.

Huang, Y. K., (2006), "Determination Of Glutamine In Mammalian-Cell Culrures With A Flow-Injection Analysis Wall-Jet Electrode System", *Analytical Letters*, (28 (4)), 93-603.

Imada, A. I., (1973), "Asparjinase And Glutaminase Activities Of Microorganisms", *Journal of General Microbiology*, (76(1)), 85-99.

Ishrat, M. H., (2018), "Sugar osmolytes-induced stabilization of RNase A in

macromolecular crowded cellular environment”, *International Journal of Biological Macromolecules*, (115), 349-357.

Iyer, P., (2008), “Enzyme stability and stabilization Aqueous and non-aqueous environment”, *Process Biochemistry*, (43), 1019-1032.

Izadpanah Qeshmi, F., (2014), “Persian Gulf is a bioresource of potent L-asparaginase producing bacteria identification & molecular differentiating”, *International Journal of Environmental Research*, (8), 813-818.

J., P. R., (2001), “Origins of Cancer Therapy”, *The Yale Journal of Biology and Medicine*, (74(6)), 391-398.

Jahan, I., (2019), “Effect of Osmolytes on Conformational Behavior of Intrinsically Disordered Protein α -Synuclein”, *Biophysical Journal*, (117(10)), 1922-1934.

Jaworska, K. H.-Z.-C., (2019), “TMA, a forgotten uremic toxin, but not TMAO, is involved in cardiovascular pathology”, *Toxins*, (11(9)), 490.

Jeong, S. J.-V., (2021), “Trehalose causes low-grade lysosomal stress to activate TFEB and the autophagy-lysosome biogenesis response”, *Autophagy*, (17(11)), 3740-3752.

Jiang H, L. G., (2018), “Genetics of trehalose biosynthesis in desert derived trehalose in the adaptation of the yeast to extreme environments”, *Current Genetics*, (64(2)), 479-491.

Jiang, J. B., (2021), “Asparagine A Metabolite to Be Targeted in Cancers”, *Metabolites*, (11(6)), 402.

João C.F. Nunes, M. R.-E., (2023), “A flow-through strategy using supported ionic liquids for L-asparaginase purification”, *Separation and Purification Technology*, (315.), 123718.

Joghee, N. N., (2020), “N ϵ -Acetyl L- α Lysine Improves Activity and Stability of α -Amylase at Acidic Conditions A Comparative Study with other Osmolytes”, *Protein and Peptide Letters*, (27(6)), 551-556.

K. H. Krumbhaar EB., (1919), “The blood and bone marrow in yellow cross gas (mustard gas) poisoning”, *John Herr Musser Department of Research Medicine*.

K., R. P., (2015), “Enzymes principles and biotechnological applications”, *Essays in Biochemistry*, (59), 1-41.

Khan, S. H., (2010), “Naturally Occurring Organic Osmolytes From Cell Physiology to Disease Prevention”, *IUBMB life*, (62(12)), 891-895.

Kidd, J., (1953), “Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum, I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum”, *The Journal of*

experimental medicine, (98(6)), 565-582.

Knierbein, M. V., (2019), "Thermodynamic properties of aqueous osmolyte solutions at high-pressure conditions", *Biophysical Chemistry*, (253), 106211.

Kossowska, D. K., (2018), "Do Osmolytes Impact the Structure and Dynamics of Myoglobin", *Molecules (Basel, Switzerland)*, (23(12)), 3189.

Kumar K, V. N., (2012), "The various sources and application of L asparjinase", *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*, (3), 197–205.

Kumar, N., (2013), "Structure and effect of sarcosine on water and urea by using molecular dynamics simulations Implications in protein stabilization", *Biophysical Chemistry*, (171), 9-15.

Kushwah, N. J., (2020), "Osmolytes A Possible Therapeutic Molecule for Ameliorating the Neurodegeneration Caused by Protein Misfolding and Aggregation", *Biomolecules*, (10(1)), 132.

Laishram Rajendrakumar Singh, T. A., (2017), "Cellular Osmolytes from Chaperoning Protein Folding to Clinical Perspectives", *Cellular Osmolytes*, 3707-3708.

Lang, S., (1904), "Über desamidierung im Tierkörper", *Beitr hem Physiol Pathol*, (5), 321-345.

Li, J. C., (2020), "Polyol and sugar osmolytes can shorten protein hydrogen bonds to modulate function", *Communications Biology*, (3(1)), 528.

Liu, W. W, (2019), "Inhibitory effects of shell of *Camellia oleifera* Abel extract on mushroom tyrosinase and human skin melanin", *Journal of Cosmetic Dermatology*, (18(6)), 1955–1960.

Lo, H. F., (2018), "Protective Effect of Biological Osmolytes against Heat and Chaotropic Agent-Induced Denaturation of *Bacillus licheniformis* γ -Glutamyl Transpeptidase", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, (28(9)), 1457-1466.

Lomelino, C. L., (2017), "Asparagine synthetase Function, structure, and role in disease", *The Journal of Biological Chemistry*, (292(49)), 19952-19958.

Lone, T., (2018), "Role of Asparaginase Enzyme in Food Processing Industry to Reduce the Acrylamide Level", *International Journal of Recent Scientific Research*, (9).

Luhana, K., (2013), "Production, purification and characterization of extracellular L-asparaginase (Anti Cancerous Enzyme) from *Aspergillus Niger*", *International Journal of Chemtech Applicaions*, (2), 14-25.

M., G., (1999), "The fast protein folding problem", *Annual Review of Physical Chemistry*, (50), 485–516.

- Maity, H. K., (2009), "Effects of pH and arginine on the solubility and stability of a therapeutic protein (Fibroblast Growth Factor 20) relationship between solubility and stability", *Current Pharmaceutical Biotechnology*, (10(6)), 609-625.
- Martini, S. B., (2013), "Water-protein interactions the secret of protein dynamics", *Scientific World Journal*, (13), 138916.
- Masi, C. D., (2013), "Sensory 596 properties of under roasted coffee beverages", *Journal of Food Science*, (78(8)), 1290-1300.
- Mateo, C., L.-L., (2003), "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity", *J Colloid Interface Sci.*, (190), 437-448.
- Maxwell, M. M., (1956), "The amino acid requirements of the Walker carcinosarcoma 256 in vitro", *Cancer Research*, (16(10 Part 1)), 979-984.
- Mehrabi, M. H., (2008), "Stabilization of firefly luciferase against thermal stress by osmolytes", *International Journal of Biological Macromolecules*, (43(2)), 187-191.
- Mojtabavi, S. S., (2019), "Osmolyte-Induced Folding and Stability of Proteins Concepts and Characterization", *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, (18(Suppl1)), 13-30.
- Momeni, L., (2019), "Making bovine trypsin more stable and active by erythritol: A multispectroscopic analysis, docking and computational simulation methods", *Journal of Molecular Liquids*, (292), 111389.
- Moosa, M. M., (2020), "Ligand interactions and the protein order-disorder energetic continuum", *Seminars in Cell & Developmental Biology*, (99), 78-85.
- Mostafa, S. A., (1979), "L-asparaginase-producing *Streptomyces* from the soil of Kuwait Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene", *Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung, Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes*, (134(4)), 325-334.
- Mostafa, Y., Alrumman, S., Alamri, S., Hashem, M., Al-izran, K., Alfaifi, M., Taha, T., (2019), "Enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase by marine *Bacillus velezensis* and cytotoxic activity against breast cancer cell lines", *Electronic Journal of Biotechnology*, (42), 6-15.
- Munir, N., (2019), "L-Asparaginase potential in acrylamide mitigation from foodstuff: A mini-review", *Progress in Nutrition*, (21), 1-10.
- Norouzi, S. B., (2020), "Improvement of PersiXyn2 activity and stability in presence of Trehalose and proline as a natural osmolyte", *International Journal of Biological Macromolecules*, (163), 348-357.
- Nunes, J. C.-E., (2020), "Recent Strategies and Applications for l-Asparaginase Confinement", *Molecules (Basel, Switzerland)*, (25(24)), 5827.

Misset., (1993), “Stability of Industrial Enzymes”, Studies in Organic Chemistry, (47), 111-131.

Oza, V. P., (2011), “Cloning, expression and characterization of l-asparaginase from *Withania somnifera* L. for large scale production”, 3 Biotech, 1(1), 21-26.

Özdemir, F. İ., (2022), “Biochemical characterization and detection of antitumor activity of l-asparaginase from thermophilic *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263T”, Protein Expression and Purification, (199), 106146.

Özdemir, İ. (2023), “Covalent immobilization of recombinant L-asparaginase from *Geobacillus kaustophilus* on ReliZyme supports for mitigation of acrylamide, Biocatalysis and Biotransformation”, Iocatalysis and Biotransformation(127), 1-14.

Özdemir, İ., (2024), “Evaluation of multi-walled carbon nanotubes bearing aldehyde groups of different lengths for the immobilization of *Geobacillus kaustophilus* l-asparaginase”, Molecular Catalysis, (555), 113903.

P., S., (2016), “The Application of Amino Acids in Freeze Dried Protein Formulations”, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology.

Pande, G. A., (2000), “Heteropolymer freezing and design: towards physical models of protein folding”, American Physical Society, (72), 259-314.

Pekar, A. H., (1972), “Conformation of proinsulin. A comparison of insulin and proinsulin self-association at neutral pH”, Biochemistry, (11(22)), 4013-4016.

Platts, L., (2015), “Controlling protein stability: Mechanisms revealed using formulations of arginine, glycine and guanidinium HCl with three globular proteins”, International Journal of Pharmaceutics, (486(1-2)), 131-135.

Qu, Y. B., (1998), “Osmolyte-driven contraction of a random coil protein”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, (95(16)), 9268–9273.

Ran, T. J., (2021), “Structures of l-asparaginase from *Bacillus licheniformis* Reveal an Essential Residue for its Substrate Stereoselectivity”, Journal of Agricultural and Food Chemistry, (69(1)), 223-231.

Reslan, M., (2018), “Choline ionic liquid enhances the stability of Herceptin® (trastuzumab)”, Chemical Communications, (54).

Saladino, G. M.-O., (2011), “A Simple Mechanism Underlying the Effect of Protecting Osmolytes on Protein Folding”, Journal of Chemical Theory and Computation, (7(11)), 3846-3852.

Sangeun Yim, M. K., (2019), “Purification and characterization of thermostable l-asparaginase from *Bacillus amyloliquefaciens* MKSE in Korean soybean paste”, LWT - Food Science and Technology, (109), 415-421.

Sarquis, M. O., (2012), “A Novel and sensitive agar plug assay for screening of asparaginase producing endophytic fungi from *Aegle marmelos*”, *Acta Biologica Szegediensis*, (56), 175-177.

Savitri, Asthana, N., (2003), “Microbial L-asparaginase: a potent antitumor enzyme”, *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 184–194.

Schmid, A. D., (2001), “Industrial biocatalysis today and tomorrow”, *Nature*(409), 258 -268.

Shakambari, G., (2019), “L-Asparaginase A promising biocatalyst for industrial and clinical applications”, *Iocatalysis and Agricultural Biotechnology*, (17), 213-224.

Siebenaller JF, S. G., (1989), “Biochemical adaptation to the deep sea”, *CRC Crit Rev Aquat*, (1), 1-25.

Singer, M. A., (1998), “Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo”, *Molecular Cell*, (1(5)), 639-648.

Singh, L. R., (2011), “Protein and DNA destabilization by osmolytes: The other side of the coin”, *Life Sciences*, (88(3-4)), 117–125.

Street, T. O., (2006), “A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, 103, 13997–14002”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (103(38)), 13997–14002.

Su, Y. G., (2018), “Effects of betaine supplementation on L-threonine fed-batch fermentation by *Escherichia coli*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*”, (41(10)), 1509-1518.

Sudhir, A., (2021), “Unraveling the Influence of Osmolytes on Water Hydrogen-Bond Network: From Local Structure to Graph Theory Analysis”, *Annals of Microbiology*, (62), 3927-3944.

Sudhir, A. P., (2012), “Production and amplification of an l-asparaginase gene from actinomycete isolate *Streptomyces* ABR2”, (62(4)), 1609-1614.

Swain, A. L., (1993), “Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (90(4)), 1474-1478.

Ufnal M, Z. A., (2015), “TMAO: A small molecule of great expectations”, *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, (31(11-12)), 1317-1323.

Van-Thuoc, D. H.-K., (2013), “Ectoine-mediated protection of enzyme from the effect of pH and temperature stress: a study using *Bacillus halodurans* xylanase as a model”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, (97(14)), 6271-6278.

Vimal, A., (2017), “Biotechnological production and practical application of L-asparaginase enzyme”, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, (33(1)), 40-61.

Vinci, R. M., (2012), “Acrylamide formation in fried potato 676 products present and future, a critical review on mitigation strategies”, *Food Chemistry*, (133), 1138-1154.

Voges, M. F., (2017), “Influence of natural solutes and ionic liquids on the yield of enzyme-catalyzed reactions: measurements and predictions”, *Organic Process Research & Development*, (21), 1059-1068.

Wang, J., (2019), “Zwitterionic poly (carboxybetaine) functionalized conducting polymer polyaniline nanowires for the electrochemical detection of carcinoembryonic antigen in undiluted blood serum”, *Bioelectrochemistry* (Amsterdam, Netherlands), (125), 90-6.

Wangler, A., (2018), “Co-solvent effects on reaction rate and reaction equilibrium of an enzymatic peptide hydrolysis”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11317-11326.

Wangler, A. H., (2019), “Thermodynamic Activity-Based Solvent Design for Bioreactions”, *Trends in Biotechnology*, (37(10)), 1038-1041.

Welch, W. J., (1996), “Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding”, *Cell Stress & Chaperones*, (1(2)), 109-115.

Wlodarczyk, S.-S., (2019), “Effect of osmolytes on the activity of anti-cancer enzyme L-Asparaginase II from *Erwinia chrysanthemi*”, *Process Biochemistry*, (81), 123-131.

Wlodarczyk, S. R., (2018), “Influence and effect of osmolytes in biopharmaceutical formulations”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (131), 92-98.

Xie, G., (1997), “Mechanism of the stabilization of ribonuclease A by sorbitol: preferential hydration is greater for the denatured than for the native protein”, *Protein Science : a publication of the Protein Society*, (6(1)), 211-221.

Yancey, P., (2015), “Co-evolution of proteins and solutions: Protein adaptation versus cytoprotective micromolecules and their roles in marine organisms”, *The Journal of Experimental Biology*, (218), 1880–1896.

Yancey, P. H., (1979), “Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes”, *The Biochemical Journal*, (183(2)), 317-323.

Yancey, P. H., (1982), “Living with water stress: evolution of osmolyte systems”, *Science* (New York, N.Y.), (217(4566)), 1214-1222.

Yayanos, A. A., (1979), “Isolation of a Deep-Sea Barophilic Bacterium and Some of

Its Growth Characteristics”, *Science* (New York, N.Y.), 205(4408), 808-810.

Yoshioka, S. F., (2011), “Effect of sugars on the molecular motion of freeze-dried protein formulations reflected by NMR relaxation times”, *Pharmaceutical Research*, (28(12)), 3237–3247.

Zuo, S., (2014), “BioChemical Characterization of an Extremely Thermostable L-Asparaginase from *Thermococcus gammatolerans* EJ3”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, (109), 122-129.



ÖZGEÇMİŞ

Özge DEMİRTAŞ, İlk ve orta öğrenimimi Akhisar’da tamamlamıştır. 2004 yılında lisans eğitime başladığı Bülent Ecevit Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü 2009 yılında başarıyla tamamlayarak aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Bir süre ara vererek 2022 yılında kaldığı yerden devam etmiştir. Halen, biyoteknolojik ilaç üreten bir firmada kalite kontrol uzmanı görevinde çalışmaktadır.

