



MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ALANINDA GELİŞMELER

EDİTÖR

DR. ÖĞR. ÜYESİ CAFER AKYÜREK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Alanında Gelişmeler

Editör

Dr. Öğr. Üyesi Cafer Akyürek

İmtiyaz Sahibi
Platanus Publishing®

Editör
Dr. Öğr. Üyesi Cafer Akyürek

Kapak & Mizanpaj & Sosyal Medya
Platanus Yayın Grubu

Birinci Basım
Aralık, 2024

Yayımcı Sertifika No
45813

Matbaa Sertifika No
47381

ISBN
978-625-6823-23-9

©copyright
Bu kitabın yayım hakkı Platanus Publishing'e aittir.
Kaynak gösterilmeden alıntı yapılamaz, izin
alınmadan hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Adres:Natoyolu Cad. Fahri Korutürk Mah. 157/B,
06480, Mamak, Ankara, Türkiye.
Telefon: +90 312 390 1 118
web: www.platanuskitap.com
e-mail: platanuskitap@gmail.com



PLATANUS PUBLISHING®

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1..... 5

Biyolojik Sentezlenen Nanoparçacıkların Biyomedikal Uygulamalarına Güncel Bir Bakış

Hatice Banu Kesinkaya

BÖLÜM 2..... 27

Enzim Aktivitesi ve Ölçüm Yöntemleri

Ceylan Fidan Babat



BÖLÜM 1

Biyolojik Sentezlenen Nanoparçacıkların Biyomedikal Uygulamalarına Güncel Bir Bakış

Hatice Banu Keskinkaya¹

¹ Dr.Öğr.Üyesi, Biyoteknoloji Bölümü, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6970-6939>

Giriş

Nanoteknoloji, çeşitli bilimsel alanlarda yeni bir inovasyon çağını başlatmıştır ve en ilgi çekici sınırlarından biri metal nanoparçacıkların (MNP'ler) sentezidir. Bu nano ölçekli malzemeler, küçültülmüş boyutları nedeniyle ayırt edici fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sergilemekte ve bu da onları çok çeşitli uygulamalar için oldukça cazip hale getirmektedir. Bu yeniliklerin laboratuvar ortamlarından pratik kullanıma geçirilmesi, gerçek dünyadaki etkilerine yönelik temel adımdır. Bu çığır açan teknolojilerin ticarileştirilmesi, geniş bir yelpazedeki insan ihtiyaçları ve küresel ilerleme için hayati önem taşımaktadır. Bununla birlikte, malzemelerin potansiyeline, sağlık değerlendirmelerine ve çevresel sonuçlarına titizlikle dikkat edilmelidir. Nanopartiküllerin (NP'lerin) hızlı müdahale gerektiren sağlık sorunlarına yol açtığı inkar edilemez. Dahası, bunların üretimi ve kullanımı, özellikle de hızla gelişen endüstriyel ortam bağlamında, büyük ölçüde düzenlenmemiş durumdadır. Yeni kimyasal süreçler minimum riskler göz önünde bulundurularak tasarlandığından, bir dizi temel ilkeye bağlı kalınarak tehlikeli bileşikler en aza indirilir veya ortadan kaldırılır. Bu durum, gelişmekte olan yeşil kimya endüstrisinin kritik rolünün altını çizmektedir. Öncelikle ayırt edici fizikokimyasal özellikleri ve geniş kapsamlı uygulamaları nedeniyle nanopartiküllerin üretilmesi için uygun sentetik metodolojilerin geliştirilmesine önemli zaman ve çaba harcanmıştır. Bununla birlikte, ağır metal kalıntılarından kaynaklanan çevresel tehlikeler, nanopartikül üretiminde çok sayıda fizikokimyasal tekniğin kullanımını sınırlamıştır. Sonuç olarak, nanopartikül sentezi için biyolojik yaklaşımların benimsenmesi sektörde umut verici bir trend olarak ortaya çıkmıştır. Bu değişim, toksik olmama, tekrar üretilebilirlik, ölçeklenebilirlik kolaylığı ve iyi tanımlanmış nanopartikül şekilleri elde etme yeteneği gibi çeşitli temel avantajlardan kaynaklanmaktadır. Son yıllarda, MNP'lerin sentezi için biyolojik sistemlerin yeteneklerinden yararlanmaya yönelik artan bir vurgu vardır ve bu da biyolojik olarak sentezlenmiş metal nanopartiküllerin (biyo-MNP'ler) ortaya çıkmasına neden olmuştur. Nanoteknoloji ve biyoteknolojinin yakınlaşması, MNP'lerin üretilmesinde yenilikçi ve çevre dostu yöntemlerin önünü açmıştır. İstenmeyen veya tehlikeli yan ürünlerin oluşumunu en aza indirmek ve güvenilir, sürdürülebilir ve çevre dostu sentez yöntemlerinin geliştirilmesini teşvik etmek için “yeşil sentez” tekniklerinin kullanılması çok önemlidir. Mikroorganizmaların, bitkilerin ve diğer doğal kaynakların kullanımını içeren biyojenik sentez, yalnızca geleneksel kimyasal yöntemlerle ilişkili çevresel etkileri azaltmakla kalmayıp aynı zamanda sentezlenen nanopartiküllerin özellikleri üzerinde hassas kontrol sağlayan sürdürülebilir bir yaklaşım sunmaktadır. Sonuç olarak, biyo-MNP'ler bilimsel di-

siplinler arasında büyük ilgi görmüş ve biyomedikal uygulamalar ön plana çıkmıştır. Biyomedikal alan, biyo-MNP'lerin çeşitli teşhis, tedavi ve görüntüleme uygulamaları için çok yönlü araçlar olarak önem kazanmasıyla birlikte dönüştürücü bir paradigma değişimine tanık oluyor. Benzersiz fizikokimyasal özellikleri, yüzey işlevselliği ve biyoyumlulukları onları hedefli ilaç dağıtımı, biyoalgılama, kanser tedavisi ve biyo-görüntüleme için ideal adaylar haline getirmektedir. Biyo-MNP'lerin boyut, şekil ve yüzey özelliklerini ayarlama yeteneği, biyolojik sistemlerle etkileşimlerini optimize etmek için çok önemli olan bir özelleştirme katmanı ekler. Bu bağlamda, biyolojik nanopartiküllerin sentezindeki son atılımlar hakkında bir güncelleme sağlıyor ve potansiyel uygulamaları ve gelecekteki beklentileri hakkında içgörüler sunuyoruz.

Metalik Nanopartiküllerin Biyolojik Sentezi

Metalik nanopartiküllerin biyolojik sentezi, mikroorganizmalar (bakteri, mantar, maya) ve bitkiler gibi doğal kaynakları kullanarak nano ölçekli metalik partiküller oluşturma sürecini ifade eder. Genellikle “yeşil sentez” olarak adlandırılan bu yaklaşım, toksik kimyasallar içerebilen veya zararlı yan ürünler üretebilen geleneksel fizikokimyasal yöntemlere çevre dostu ve sürdürülebilir bir alternatif sunmaktadır. Metalik nanopartiküllerin biyolojik sentezi sırasında, biyolojik ajanlar veya bu ajanlardan elde edilen özütler, metal iyonlarını bir öncü çözeltiden indirgemek ve stabilize etmek için kullanılır, bu da kontrollü boyut ve şekillere sahip nanopartiküllerin oluşumuna yol açar. Bu yöntem, aşağıdakiler de dahil olmak üzere çok sayıda avantajı nedeniyle büyük ilgi görmüştür:

Çevre dostu olma :Süreç genellikle hazır biyolojik materyalleri içerir, bu da geleneksel kimyasal süreçlerle ilişkili çevresel etkiyi azaltır.

Toksik değildir: Biyolojik sentez, hafif reaksiyon koşulları ve doğal indirgeyici maddeler kullanarak tehlikeli kimyasalların kullanımını en aza indirir ve nihai ürünlerdeki toksisiteyi azaltır.

Boyut ve Şekil Üzerinde Kontrol: Reaksiyon parametrelerini ayarlayarak ve belirli biyolojik ajanları kullanarak, ortaya çıkan nanopartiküllerin boyutunu ve morfolojisini kontrol etmek mümkündür.

Tekrarlanabilirlik: Biyolojik sentez yöntemleri standartlaştırılabilir, bu da tutarlı ve tekrarlanabilir nanopartikül üretimine yol açar.

Biyoyumluluk: Elde edilen nanopartiküller genellikle daha iyi biyoyumluluk sergileyerek onları çeşitli biyomedikal uygulamalar için uygun hale getirir.

Ölçeklenebilirlik: Bazı biyolojik sentez yöntemleri kolayca ölçeklendirilebilir ve nanopartiküllerin büyük ölçekli üretimine olanak tanır.

Çok yönlülük: Farklı metallerin nanopartiküllerini sentezlemek için çeşitli mikroorganizmalar ve bitki özleri kullanılabilir ve bu da çok yönlü bir yaklaşım sunar. Metalik nanopartiküllerin biyolojik sentezinin resimli bir gösterimi Şekil 1'de sunulmuştur.

Metalik Nanopartiküllerin Biyolojik Sentez Mekanizmaları

Metalik nanopartiküllerin (MNP'ler) biyolojik sentezi, kullanılan organizmaya veya biyomoleküle bağlı olarak değişen karmaşık biyokimyasal ve biyofiziksel mekanizmaları içerir. Bu mekanizmaları anlamak, belirli uygulamalar için MNP'lerin özelliklerini uyarlamak için gereklidir. Araştırmacılar, MNP'ler için biyolojik sentez yöntemlerinin verimliliğini, tekrarlanabilirliğini ve ölçeklenebilirliğini artırmak için bu süreçleri keşfetmeye ve optimize etmeye devam etmektedir. MNP'lerin biyolojik sentezinde yer alan bazı yaygın mekanizmalar şunlardır:

1. Metal iyonlarının indirgenmesi:

- Enzimatik indirgeme: Birçok biyolojik sentez yönteminde, enzimler indirgeyici ajanlar olarak çok önemli bir rol oynamaktadır. Nitrat redüktaz, lakkaz ve kloroperoksidaz gibi enzimler, kofaktörlerinden, yardımcı substratlarından veya aktif bölgelerinden elektron sağlayarak metal iyonlarının (örneğin Ag^+ , Au^{3+}) indirgenmesini katalize edebilir. Bu indirgeme işlemi metal nanopartiküllerin oluşumuna yol açar.

- Mikrobiyal indirgeme: Bakteriler ve mantarlar gibi bazı mikroorganizmalar metal iyonlarını hücre dışında indirgeyebilmektedir. Bu mikroorganizmalar elektron donörü olarak görev yapan spesifik biyomoleküller veya metabolitler (örn. NADH) üreterek metal iyonlarının MNP'lere indirgenmesini kolaylaştırır.

2. Çekirdeklenme ve büyüme :

- *Çekirdeklenme*: Metal iyonları indirgendiğinde, küçük atom kümeleri oluşturarak çekirdeklenme eğilimi gösterirler. Çekirdeklenme, oluşan nanopartiküllerin boyutunu ve sayısını belirleyen kritik bir adımdır. Sıcaklık, pH ve metal iyonlarının konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler çekirdeklenmeyi etkiler.

- *Büyüme*: Çekirdeklenmeden sonra nanopartiküller, yüzeylerine metal iyonlarının eklenmesiyle büyümeye devam eder. Büyüme hızı ve nanopartiküllerin şekli, reaksiyon koşulları ayarlanarak kontrol edilebilir.

3. Stabilizasyon ve kapatma:

-Biyomolekül etkileşimi: Biyolojik sistemde bulunan proteinler, peptitler veya polisakkaritler gibi biyomoleküller yeni oluşan MNP'lerle etkileşime girebilir. Bu biyomoleküller, MNP'lerin agregasyonunu ve çökmesini önleyerek stabilize edici ajanlar olarak hizmet edebilir.

- *Yüzey modifikasyonu*: MNP yüzeyine bağlanan biyomoleküller, yük ve reaktivite gibi yüzey özelliklerini de etkileyebilir. Bu yüzey modifikasyonu, MNP'leri belirli uygulamalara göre uyarlamak için kullanılabilir.

4. Boyut ve şekil kontrolü:

Biyolojik şablonlar: Bazı biyolojik sistemler, belirli şekillere sahip MNP'lerin oluşumu için şablonlar veya iskeleler sağlar. Örneğin, virüsler ve bitki proteinleri iyi tanımlanmış şekillere sahip MNP'leri sentezlemek için kullanılmıştır.

5. Hücre içi ve hücre dışı sentez:

- *Hücre içi sentez*: Bazı durumlarda, MNP'ler mikroorganizmaların hücreleri içinde sentezlenir. Bu hücre içi sentezlenen MNP'ler organizmalar tarafından depolanabilir veya atılabilir.

- *Hücre dışı sentez*: Diğer durumlarda, MNP'ler hücre dışı ortamda hücrelerin dışında oluşturulur. Bu hücre dışı sentez yöntemi biyo-MNP üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

6. pH ve sıcaklık bağımlılığı :

- pH etkisi: pH, metal iyonlarının redoks potansiyelini ve yükünü etkileyerek indirgenmelerini ve ardından nanopartikül oluşumunu etkilediği için biyolojik sentezde kritik bir rol oynar.

- Sıcaklık etkileri: Sıcaklık, reaksiyon hızlarını ve oluşan MNP'lerin stabilitesini etkileyebilir. MNP sentezini kontrol etmek için sıcaklık koşullarını optimize etmek esastır.

Metalik Nanopartiküllerin Bitki Bazlı Sentezi

Bitki nanoteknolojisi son zamanlarda nanopartiküllerin çevre dostu üretimi için basit, hızlı ve istikrarlı bir yaklaşım sunan yenilikçi yollar ortaya koymuştur. Nanopartikül sentezinde suyun indirgeyici ajan olarak kullanılması, biyoyumluluk, ölçeklenebilirlik ve tıpta uygulanabilirlik gibi çok sayıda avantajı beraberinde getirmektedir. Bu, bitkisel kaynaklardan elde edilen nanopartiküllerin, öncelikle erişilebilirlikleri ve tehlikesiz yapıları nedeniyle biyotıp ve çevresel uygulamalarda artan talebi karşılama potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Yakın zamanda yapılan araştırmalar, *Panax ginseng* yaprağı ve kökü özütleri kullanılarak altın ve gümüş nanopartiküller üretilebileceğini ortaya koymuş ve tıbbi bitkilerin uygulanabilir hammadde kaynakları olarak potansiyelini göstermiştir. Ayrıca, yapraklar, meyveler ve saplar gibi çeşitli bitki bileşenleri ve bunların özütleri metal nanopartiküllerin sentezi için kullanılmıştır.

Flavonoidler ve alkaloidler de dahil olmak üzere ikincil metabolitlerin rolü, metal tuzu indirgemesindeki önemli rollerinin yanı sıra proteinlerden ve amino asitlerden üretilen nanopartiküller için kapama ve stabilize edici maddeler olarak hizmet etme kabiliyetleri nedeniyle dikkat çekmiştir. Örneğin, karbonil grupları taşıyan polifenoller ve proteinlerle zenginleştirilmiş *Corallina officinalis* zt, altın nanopartiküllerin üretimini ve stabilizasyonunu kolaylaştırmada potansiyel sergilemiştir.

Biyolojik olarak sentezlenen nanopartiküller fizikokimyasal olarak sentezlenen muadilleriyle karşılaştırıldığında, literatür biyojenik nanopartiküllerin daha yüksek aktivite sergileme eğiliminde olduğunu göstermektedir. Kararlı ve tek dağılımlı metalik nanopartiküller elde etmek pH, inkübasyon süresi, karıştırma oranları ve sıcaklık üzerinde doğru kontrol gerektirir. Kri, mango, neem, zerdeçal ve guava gibi çeşitli bitkiler, altın nanopartiküllerin oluşturulması için araştırılmıştır. Polifenoller açısından zengin olan bu bitki zleri, organik maddenin parçalanmasını hızlandırarak nanopartikül oluşumunu daha da etkilemektedir. Dahası, bitkiler sadece yüzeylerinde değil, aynı zamanda uzak organ ve dokularda da metal iyonlarını azaltmak için olağanüstü bir kapasite gösterirler. Bu olgu, metal biyoakmlasyonu üzerine yapılan çalışmalarla kanıtlandığı üzere, metal birikiminin birincil biçimi olarak nanopartiküllerin (NP'ler) yaygınlaşmasına yol açmıştır. Örneğin, *Diopyros* kaki'nin yaprak ekstresi, sulu bir $H(2)PtCl(6)0.6H(2)O$ zltisinden platin nanopartiküllerin hücre dış sentezinde yeşil ve evre dostu bir indirgeyici ajan olarak kullanılmıştır. Benzer şekilde, *Murraya Koenigii* yaprak özütü hem indirgeyici hem de stabilize edici bir ajan olarak ikili bir rol oynayarak ortam koşullarında gümüş nanopartiküllerin ve 373 K'de altın nanopartiküllerin üretimini kolaylaştırmıştır. Elde edilen nanopartiküller UV-vis, transmisyon elektron mikroskobu (TEM), X-ışını kırınımı (XRD) ve FTIR analizi yoluyla kapsamlı karakterizasyona tabi tutulmuştur. Bu yenilikçi yöntem, yaklaşık 10 nm boyutunda iyi dağılmış gümüş nanopartiküller ve yaklaşık 20 nm boyutunda altın nanopartiküller vermiştir. Özellikle, bitki özütünün konsantrasyonunun indirgeme oranı, partikül boyutu ve aglomerasyon eğilimi üzerinde önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir.

Bu çeşitli çalışmaların da gösterdiği gibi, bitki nanoteknolojisi alanı nanopartikül sentezinde devrim yaratma konusunda büyük umut vaat etmektedir. Araştırmacılar, bitki bileşenlerinin stratejik kullanımı yoluyla, çok çeşitli potansiyel uygulamalara sahip nanopartiküllerin sürdürülebilir üretimi için yenilikçi yollar ortaya çıkarmaktadır.

Metalik Nanopartiküllerin Hayvan Temelli Sentezi

Metalik nanopartiküllerin hayvan temelli sentezi, metalik nanopartiküllerin üretimini kolaylaştırmak için çeşitli hayvan kaynaklı maddelerin veya bileşenlerin kullanılmasını içerir. Bu yöntemler üzerinde çalışan araştırmacılar, biyomedikal, katalitik ve çevresel uygulamalar da dahil olmak üzere çeşitli amaçlarla metalik nanoparçacıklar oluşturmak için hayvansal kaynaklı malzemelerin doğal özelliklerinden yararlanmayı amaçlamaktadır. Nanopartikül sentez yöntemlerinin çoğunluğu bitki bazlı veya mikrobiyal olsa da, hayvan bazlı malzemelerin bu amaçla kullanıldığı bazı örnekler de vardır. Fibrointitanyum dioksit nanokompozitler, nanohidroksiapatit (bir kalsiyum NP formu) ve diğer nanopartiküller dahil olmak üzere nanomalzemelerin sentezi için bir dizi doğal kaynak ve deniz organizması araştırılmıştır. Bu çevre dostu sentez yöntemlerinde örümcekler, ipekböcekleri ve ağaç karıncaları gibi çeşitli türlerden elde edilen ipek proteinleri kullanılmaktadır. Bir başka ipek proteini olan serisin de nanopartikül üretiminde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Süngerler ve denizyıldızları gibi enzimatik yeteneklere sahip deniz organizmalarının biyolojik silika nanopartiküller ürettiği bulunmuştur. Özellikle *Eisenia andrei* gibi türlerden elde edilen toprak solucanı özleri, özellikle triklorogold hidroklorür mevcut olduğunda nano-kırmızı altın oluşturmak için kullanılmıştır. Gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezinde, Polychaeta gibi deniz solucanları umut vaat etmektedir. Ayrıca, kitosan da dahil olmak üzere kabuklu hayvan kabuklarından elde edilen kitinler, titanyum dioksit ve kitosan içeren nanokompozitlerin geliştirilmesi için değerli bir kaynak sunmaktadır.

Metalik Nanopartiküllerin Mikrobiyom Tabanlı Sentezi

Metalik nanopartiküllerin mikrobiyom bazlı sentezi, metalik nanopartiküllerin üretimini kolaylaştırmak için bakteri veya mantar gibi mikroorganizmaların ve bunlarla ilişkili mikrobiyomların kullanılmasını içerir. Bu yaklaşım, çeşitli özelliklere sahip nanopartikülleri sentezlemek için mikroorganizmaların benzersiz metabolik yeteneklerinden ve çevrelerindeki mikrobiyota ile etkileşimlerinden yararlanır. Mikroplar altın, gümüş, bakır, çinko, titanyum, paladyum ve nikel gibi metalik NP'lerin sentezi için güvenli ve ucuz araçlar olarak kullanılabilir. NP'lerin sentezi mikroplar kullanılarak hem hücre dışı hem de hücre içi olarak gerçekleştirilebilir.

Son zamanlarda, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus sp.* ve *Pseudomonas stutzeri*'ye ait bakteri suşları AgNP'lerin biyosentezi için kullanılmıştır. Çinko oksit NP'ler *Aeromonas hydrophila* bakterisi kullanılarak basit ve uygun maliyetli bir yöntemle sentezlenmiştir. NP'lerin kristal yapısı atomik kuvvet mikroskopu (AFM) ile gözlemlenmiş ve bu da NP'lerin ortalama 57,72 nm boyutunda küresel ve oval olduğunu göstermiştir.

Mantarlar, çeşitli sektörlerde kullanılabilecek birçok biyoaktif bileşiğin mükemmel kaynaklarıdır. Metalik NP'lerin fungal sentezi kültür koşullarına bağlıdır. Önceki bir çalışmada, *Trichothecium sp.* kültür koşulları Au iyonlarını azaltarak hücre dışı NP sentezine neden olmuş, ancak çalkalama ile kültürlendiğinde hücre içi NP üretmiştir. Başka bir çalışmada, *Fusarium oxysporum* kullanılarak AgNP'lerin biyosentezi rapor edilmiş ve substrat konsantrasyonu ile inkübasyon sıcaklığının etkisi incelenmiştir.

Maya hücreleri, ağır metallerin biyoremediasyonu için en önemli ajanlardan biri olarak hareket eder. Mayalar düşük maliyetli ortamlarda kolaylıkla kültürlenebilmekte ve çeşitli ağır metalleri uzaklaştırabilmektedir. *Saccharomyces cerevisiae*, biyotransformasyon yoluyla AgNP'lerin biyosentezi için kullanılmıştır. Hem kurutulmuş hem de taze kültür *S. cerevisiae* biyokatalizör olarak kullanılmıştır. *Pichia jadinii*, 1 ila 100 nm arasında değişen AuNP'lerin hücre içi sentezi için kullanılmıştır. Bu çalışmada, AuNPs boyutunu ve şeklini düzenlemek için *P. jadinii*'nin büyümesi ve hücrel aktiviteyi kolayca kontrol edilmiştir.

Birçok çalışma, virüslerin nano ölçekten mikro ölçeğe kadar malzeme sentezi için biyo-şablon görevi gören uygun bir grup olarak kabul edildiğini göstermektedir. Son zamanlarda, malzeme bilimi araştırmacıları viral NP'leri (VNP'ler) yeni hibrit nanomalzemelerin sentezi için şablon veya iskele olarak kullanmaktadır. Virüsler kullanılarak nanomalzemelerin sentezi, geniş bir boyut, şekil, bileşim ve fizikokimyasal özellik yelpazesi sağlayan temiz, toksik olmayan ve çevre dostu bir yöntemdir. Bir çalışmada, ünlü bir bitki patojenik virüsü olan kabak yaprağı kıvrılma Çin virüsü (SLCCNV), gümüş ve altın nanomalzemeleri üretmek için biyotemplate olarak kullanılmıştır. SLCCNV, güneş ışığı varlığında HAuCl₄ ve AgNO₃ öncüllerine maruz bırakılmış ve çevre dostu bir şekilde SLCCNV-metalik-hibrit nanomalzemelerin hızlı (~5 dakika) oluşumu gözlenmiştir. Bir başka araştırmada, tütün mozaik virüsü ve sığır papilloma virüsü, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Musa paradisiaca* ve *Nicotiana benthamiana* bitki özleri ile katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Bu iki virüs, virüs içermeyen bir kontrole kıyasla

NPs sayısının azalmasını ve artmasını önemli ölçüde teşvik etmiştir. Bu viral sentezlenmiş nanomalzemeler biyotıpta geniş bir uygulama alanına sahiptir ve biyosensörler için katalizör görevi görür.

Biyosentezlenmiş Metalik Nanopartiküllerin Geliştirilmesi

Biyosentezlenmiş metalik nanopartiküller, çeşitli mikroorganizmalar, bitkiler ve diğer biyolojik varlıkları indirgeyici ve dengeleyici ajanlar olarak kullanarak biyolojik yöntemlerle üretilen nanopartiküllerdir. Bu nanopartiküller, çevre dostu ve sürdürülebilir üretim süreçleri nedeniyle sıklıkla "biyojenik nanopartiküller" veya "yeşil nanopartiküller" olarak adlandırılır.

Altın Nanopartiküller

Altın atomlarından oluşan altın nanopartikülleri, çapları birkaç nanometreden birkaç yüz nanometreye kadar değişen çeşitli boyut aralıklarını kapsar. Bu nanopartiküller, küçük boyutları ve etkileyici yüzey alanı-hacim oranı nedeniyle belirgin özellikler gösterir ve bunları toplu altın özelliklerinden ayırır. Altın nanopartiküllerinin çok yönlü nitelikleri, onları çeşitli alanlarda paha biçilmez kılar ve sürekli olarak keşif için yeni uygulamalar ortaya çıkarır. Organik moleküllerin yüklenmesini artırmak için nanopartikül tabanlı iletim sistemlerini keşfetmeye yönelik kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Özellikle nanoteknoloji alanında, bu partikül sistemleri proteinlerin, lipidlerin ve karbonhidratların dahil edilmesini gerektirir. Özellikle, nanopartiküller tipik olarak 10 ila 1000 nm arasında değişen boyut boyutlarına sahip kolloidal sistemleri temsil eder.

Olağanüstü optik absorpsiyon özelliklerine sahip altın, tespit amaçları için ideal bir aday olarak dururken, fototermal özellikleri onu bir antikanser ajanı olarak güçlü kılar. Karmaşık altın nanoyapıları, ilaç salım etkinliğini optimize etmek için titizlikle tasarlanabilir. Stratejiler, ilaç parçacıklarının metal nanoparçacık yüzeylerine bağlanmasını ve tuzak verimliliğini artıran içi boş iç yapıların oluşturulmasını kapsar. Bu yapılar, çeşitli optik özellikleri birleştirmek için genellikle kolayca değiştirilebilir. Ayrıca, nanoparçacık yüzeyi, kontrollü ilaç dağıtımını kolaylaştırmak için ısıya duyarlı monomerlerle kaplanabilir. Bu polimerler, sıcak koşullarda büzülerek ve daha soğuk ortamlarda genişleyerek ilaç yüklü partikül süspansiyonu difüzyon hızlarının manipülasyonunu sağlar. Bu yenilikçi yaklaşım, altının fototermal özellikleriyle sinerjik olarak birleştirilebilir ve ilaç uygulaması için yeni bir yol sunar. Örneğin, tümör bölgesine yakın altın nanopartiküllerinin erimesini indüklemek için bir lazeri tümör bölgelerine odaklayarak, spesifik olmayan toksisiteyi en aza indirirken etkili ilaç dağıtımı geliştirilebilir.

Sakız akasyası (GA), gemsitabin hidroklorür (GEM) yüklü kolloidal altın nanopartiküllerini başarıyla oluşturmak için polisakkarit bazlı bir teknik olarak kullanılmıştır. Bir altın taşıyıcıya verildiğinde gem'in geliştirilmiş suda çözünürlüğü ve ilaç salım hızı, kolloidal GEM-GAaunp'lere bağlanabilir. Sonuç olarak, partikül boyutundaki önemli artışlar, suda çözünürlüğün artması ve iyileştirilmiş bir ilaç salım profili nedeniyle gem'in hedefleme etkinliği önemli ölçüde artırılmıştır.

Gümüş Nanopartiküller

Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), çeşitli biyomedikal bağlamlarda çok yönlü uygulamalar bularak en önemli ve büyüleyici nanomalzemelerden biri olarak durmaktadır. Bu alanda, bitki özleri kullanılarak AgNP'lerin çevre dostu yeşil sentezi, çevreye duyarlı bir alternatif sunarak büyük ilgi görmüştür. Özellikle, *Impatiens balsamina*, *Lantana camara* ve *Cucumis prophetarum* yaprak özlerinden yararlanılarak, AgNP'lerin biyosentezinde hem indirgeyici hem de kapaklayıcı ajanlar olarak ikili roller gösterilmiştir. Dikkate değer bir başka örnek, *Salvia* cinsinin bir üyesi olan *Salvia officinalis*'in, dikkate değer antibakteriyel, antiplazmodiyal, antioksidan, antienflamatuar ve anti-inflamatuar özelliklere sahip agnp'ler üretme kapasitesiyle ünlü kullanımı etrafında dönmektedir. İlginç bir şekilde, sardunya yaprağı ekstresi, AgNP'lerin hücre dışı sentezinde kullanılmıştır. Bu işlem, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile kanıtlandığı gibi, 16 ila 40 nm arasında bir boyut aralığını kapsayan yarı doğrusal üst yapılar verir. Bu agnp'ler olağanüstü stabilite ve kristallik sergiler.

Daha ileri araştırmalar, metalik gümüş nanopartiküllerin hücre dışı sentezinde beş bitki yaprağı ekstraktının (Çam, Hurma, Ginkgo, Manolya ve Platanus) potansiyelini araştırmıştır. Bitki yaprağı ekstraktları, sulu AgNO₃ çözeltilerinde Ag (+) ila Ag (0) için etkili indirgeyici ajanlar olarak görev yapmış ve kararlı gümüş nanopartiküller elde edilmiştir. Bu nanopartiküllerin oluşumunu nicel olarak izlemek için UV görünür spektroskopisi kullanılmıştır.

Ek olarak, *Azadirachta indica* yaprağı ekstresi, agnp'lerin hızlı biyosentezi için güçlü bir indirgeyici ajan olarak araştırılmıştır. Bu araştırma, AgNP'lerin büyüme, glutatyon-S-transferaz (GST) aktivitesi, toplam protein konsantrasyonu ve *Staphylococcus aureus*'a karşı güçlü antibakteriyel etkinlik üzerindeki etkilerini araştırdı. Agnp'lerin sentezi, *Mentha piperita* (Nane) ve *Ocimum tenuiflorum*'un (Tulsi) birlikte kullanımıyla da yeniliğe tanık oldu. Bu kombinasyon, özellikle *Streptococcus mutans*'a karşı olağanüstü antimikrobiyal aktiviteye sahip agnp'ler verdi. Son araştırmalar, Mi-agnp'leri sentezlemek için *Mangifera indica* yaprak özleri kullanarak yeşil sentez sınırını genişletmiştir. Bu Mi-AgNP'lerin ortalama büyüklüğü 62 ± 13 nm olan polikristalin, küresel şekilli olduğu bulundu.

Paladyum Nanopartikülleri

Paladyum nanopartikülleri (PdNP'ler), geniş kapsamlı uygulamaları nedeniyle araştırmacılardan önemli ilgi görmüştür. Bununla birlikte, PdNP'leri sentezlemek için geleneksel yöntemler genellikle zararlı çözücülerin ve indirgeyici maddelerin kullanılmasını gerektirir ve bu da toksik kirleticilerin ve yan ürünlerin oluşumuna yol açar. Bu acil çevresel endişeleri gidermek için, paladyum nanopartiküllerinin bitki özleri kullanılarak yeşil sentezi umut verici ve sürdürülebilir bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bu biyosentez yaklaşımı, bitki özlerinin doğal çevre dostu olmasından yararlanarak geleneksel yöntemlerle ilişkili dezavantajları ortadan kaldırır. Özellikle, biyolojik olarak sentezlenen bu nanopartiküller, gelişmiş seçicilik ve katalitik özellikler de dahil olmak üzere avantajlı özellikler sergiler ve bu da onları çeşitli uygulamalar için oldukça çekici hale getirir.

Bu yeşil sentezin zorlayıcı bir örneği, paladyum nanopartiküllerinin (PdNP'ler) biyofabrikasyonu ve sonraki fotokatalitik uygulamaları için sulu *Saccharomyces cerevisiae* ekstraktının kullanılmasını içerir. Ayrıca, *Diospyros kaki* yapraklarının özü, hem *Escherichia coli* hem de *Staphylococcus aureus*'a karşı yeterli antibakteriyel etkinlik gösteren ve sırasıyla 18 ve 10.5 mm ölçülerinde inhibisyon bölgeleri veren PdNP'leri sentezlemek için bir biyouyarıcı olarak kullanılmıştır. Dikkate değer bir başka çalışma, *Shewanella loihica* PV-4 kullanarak Pd-NP'lerin biyosentezlenmesinin fizibilitesini, krom kontaminasyonunun giderilmesi için verimli katalizörler olarak potansiyel uygulamalarına özel bir odaklanma sergilemiştir.

Demir Nanopartikülleri

Demir oksit nanopartikülleri (Fe NP'ler), düşük toksisiteleri ve günlük uygulamalarda önemli faydaları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Doğada, iki tür demir oksit, hematit ve manyetit, bilimsel araştırmalarda farklı rollere sahiptir. Özellikle, 10-100 nm boyut aralığındaki demir oksit nanoparçacıkları, çeşitli çalışmalarda önemli bir rol oynamıştır.

Ziziphora clinopodioides yaprak ekstraktının bir indirgeyici ajan olarak kullanılmasının, fenolün FeCl₃ çözeltisinden yeşil sentezinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bu Fe NP'ler, anemik yabani farelerde immünolojik, hematolojik ve biyokimyasal belirteçlerde dikkate değer gelişmeler sergilemiştir. Dahası, in vitro DPPH'ye karşı güçlü antioksidan aktivite göstermiş ve ek olarak, Fe NP'ler HUVEC hücre hattında potansiyel biyomedikal uygulamalarını gösteren doza bağlı önemli hücre canlılığı etkileri sergilemiştir.

Yapılan başka bir araştırmada Fe NP'ler, indirgeyici ajan olarak Phoenix dactylifera özü ve substrat olarak demir sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) kullanılarak biyosentezlenmiştir. Sentezlenen bu Fe NP'lerin antimikrobiyal aktivitesi, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus leutus* ve *Klebsiella pneumoniae* dahil olmak üzere çeşitli bakteri suşlarına karşı değerlendirilmiştir. Sonuçlar, *Escherichia coli*'ye karşı gözlenen maksimum inhibisyon bölgesi ile difransiyel antimikrobiyal potansiyel ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, ayrı bir çalışmada Fe NP'lerin sentezi için *Mentha spicata* kullanılmış ve bunların Fitoftora istilacılarına karşı antimikrobiyal etkinlikleri araştırılmıştır.

Çinko Oksit Nanopartikülleri

Çinko oksit nanoparçacıkları (ZnO-NP'ler), benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle değer verilen metal oksit nanomalzemelerinin en önemli örneğidir. Bu nanopartiküller, sentezleri için çeşitli bitki kaynaklarını kullanan çok sayıda çalışma ile araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Örneğin, *Calotropis gigantea*'nın yaprak özü, ZnNO_3 tuzu varlığında, 30-35 nm boyut aralığına sahip nanopartikülleri başarıyla vermiştir. Bu yeşil sentezlenmiş ZnO-NP'lerin işlevselleştirilmesi, çeşitli alanlardaki potansiyellerini ortaya çıkarmıştır. Bu nanopartiküller umut verici anti-diyabetik özellikler, yüksek biyouyumluluk ve önemli antibakteriyel aktivite sergiler. *Wattakaka volubilis* yaprağı ekstreğinde bulunan organik bileşenler kullanılarak, çinko iyonlarının indirgenmesi ve kapatılmasıyla ZnO-NP'ler üretilmiştir. Anti-diyabetik uygulamalarının ötesinde, bu nanopartiküller güvenlik avantajlarına sahiptir, bu da onları güvenilir farmasötik formülasyonlar ve ölçeklenebilirlik için uygun hale getirir. Bu gelişme, anti-diyabetik etkilerinden sorumlu aktif bileşenlerin tanımlanması ve çıkarılması ihtiyacını vurgulayarak ilaç tasarımının evrimi ile uyumludur.

Yapılan başka bir çalışmada, sulu *Ageratum conyzoides* özleri kullanılarak demir nanoparçacıkları sentezlendi ve antimikrobiyal ve fotokatalitik özellikleri değerlendirilmiştir. Kapsamlı karakterizasyon, UV-Vis spektrofotometrisi, FT-IR spektrofotometrisi, X-ışını difraktometrisi ve taramalı elektron mikroskopunu içeriyordu. Ekstraktların gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) profili, toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğinin nicelleştirilmesiyle ikincil metabolitlerin varlığını ortaya çıkarmıştır. Antimikrobiyal aktivite, antibiyotik siprofloksasine kıyasla orta derecede aktivite gösteren beş mikroorganizmaya karşı değerlendirilmiştir. Ek olarak, nanopartiküller, metilen mavisini bozmada fotokatalitik verimlilik sergileyerek % 92'lik bir bozunma verimliliği elde edilmiştir. Bu bulgular, mikroorganizma kontrolü ve fotokatalitik süreçlerde potansiyel uygulamalarla birlikte demir iyonlarının Fe NP'lere biyolojik olarak indirgenmesinde *Ageratum konizoides* rolünün altını çizmektedir.

Platin Nanopartikülleri

Platin nanopartikülleri (Pt NP'ler), çeşitli biyoteknolojik, nanomedikal ve farmakolojik alanlarda yoğun araştırmalar altında paha biçilmez bilimsel araçları temsil eder. Antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser özellikleri de dahil olmak üzere dikkate değer özellikleri kapsamlı araştırmaları teşvik etmiştir.

Dikkate değer bir çalışmada, platin nanoparçacıkları, sulu kloroplatinik asit ($H_2PtCl_6H_2O$) varlığında indirgeyici ajan olarak *Ocimum sanctum* yaprağı ekstresi kullanılarak sentezlenmiştir. 100 ° C'lik bir reaksiyon sıcaklığında bir *O. sanctum* yaprağı suyunun kullanılması, platin iyonlarının nanopartiküllere daha verimli bir şekilde dönüştürülmesiyle sonuçlandı [82]. Başka bir araştırmada, *At-riplex halimus* yaprağı sulu ekstresi, platin nanopartiküllerinin (At-Pt NP'ler) yeşil sentezinde önemli bir rol oynamıştır. Bu atptnp'ler 3 aylık bir süre boyunca dikkate değer bir stabilite sergiledi. MB boyasının bozunması için oldukça etkili katalizörler olarak hizmet ettiler ve Gram negatif bakterilere karşı önemli antibakteriyel etkinlik gösterdiler. Ek olarak, At-Pt NP'ler güçlü antioksidan özellikler sergilemiştir. Bu bulgular, çeşitli bilimsel ve biyomedikal çabalarda platin nanopartiküllerinin çok yönlü uygulamalarının ve umut verici potansiyelinin altını çizmektedir.

Selenyum Nanopartikülleri

Selenyum, insan sağlığındaki hayati rolü nedeniyle son yıllarda artan ilgi görmüştür. Bu temel unsur, tiroid hormonunun düzenlenmesi ve bağışıklık sistemi işlevi dahil olmak üzere kritik metabolik yollarda rol oynar. Selenyum, antioksidan enzimlerin dahil edilmesini kolaylaştırdığı için hücrelerin serbest radikallerin neden olduğu hasarlardan korunmasında da kilit rol oynar.

Kayda değer bir çalışmada, fitofabrik selenyum nanopartikülleri (PF-SeNP'ler) olarak bilinen selenyum nanopartikülleri, *Emblica officinalis*'in sulu meyve özü kullanılarak basit, yeşil, uygun maliyetli ve çevre dostu bir yöntemle sentezlenmiştir. *E. officinalis*'in meyve özünün fenolikler, flavonoidler ve tanenler gibi ikincil metabolitler açısından zengin olduğu bulunmuş ve bu da onu nanoparçacık biyosentezi için oldukça uygun hale getirmiştir. PF-Snp'ler olağanüstü antioksidan, antimikrobiyal ve biyoyumlu özellikler sergilemiştir. Bu nanopartiküller çok çeşitli antimikrobiyal aktivite sergiledi, mantarlar en duyarlı olanıydı, bunu Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler izledi. Önemli olarak, sitotoksitesite çalışmaları, PF Snp'lerin sodyum selenitten önemli ölçüde daha az toksik ve daha güvenli olduğunu ortaya koymuştur.

Başka bir çalışmada, selenyum nanopartikülleri (SeNP'ler) üç farklı bitkiden elde edilen ekstraktlar kullanılarak sentezlenmiştir: *Allium cepa* (soğan), *Malpighia emarginata* (acerola) ve *Gymnanthemum amygdalinum* (boldo). Antibakteriyel aktivite, et suyunda mikro seyreltme kullanılarak değerlendirilmiştir, ardından *Staphylococcus aureus*, metisiline dirençli *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* dahil bakteri suşlarına karşı zaman öldürme eğrisi analizi yapılmıştır (Tablo 1 ve 2). Gözlenen antimikrobiyal etkinlik ve düşük hemolitik konsantrasyon, bu nanopartiküllerin, çok ilaca dirençli suşlar da dahil olmak üzere Gram pozitif bakterilere karşı potansiyel faydasını gösterir ve böylece geniş bir uygulama yelpazesi açar.

Biyosentezlenmiş Metalik Nanopartiküllerin Biyomedikal Uygulaması

Metalik nanopartiküller (MNP'ler), tıbbi teşhis, moleküler biyoloji, biyogörüntüleme, ilaç dağıtımı ve tümör hedeflemeyi kapsayan çeşitli biyomedikal uygulamalarda kapsamlı fayda sağlar.

Tıbbi Tanı ve Moleküler Biyoloji

Metalik nanopartiküllerin dikkat çekici özellikleri biyomedikal amaçlar için kullanılmasıdır. Parçacık boyutu küçüldükçe, yüksek yüzey alanları makro boyutlu yapılardan farklı özellikler kazandırır. Metalik nanoparçacık sentezi aşağıdan yukarıya veya yukarıdan aşağıya yaklaşımlar kullanır. Aşağıdan yukarıya yöntem, öncelikle termal ayrışma yoluyla, uygun maliyetli ve esnek ve homojen parçacıklar verir. Özellikle biyolojik sentez, toksik olmaması, maliyet etkinliği, sürdürülebilirliği ve çevre dostu olmasıyla öne çıkmıştır.

2.Biyogörüntüleme

İnvaziv olmayan tekniklerdeki gelişmeler, ilaç geliştirme, teşhis ve hücre biyoloji gibi alanlardan yararlanarak tıbbi araştırmalarda devrim yarattı. Yenilikler MRI, elektro-optik görüntüleme, ultrasonik taramalar, pozitron emisyon tomografisi ve moleküler biyogörüntüyü kapsar. Altın ve gümüş nanopartiküller gibi soy metaller, yakın kızılötesi aralıktaki verimli foton emisyonlarından yararlanarak görüntülemeyi geliştirmede önemli roller oynar. Bu nanopartiküller güçlü kontrast maddeler olarak işlev görür.

3.Manjetik Rezonans Görüntüleme (MRG)

Üstün uzamsal çözünürlüğü, invazivliği ve tahribatsızlığı ile tanınan MRG, nanoteknoloji nedeniyle gelişti. Nanopartiküller (NP'ler), hücre ve moleküler düzeyde kalite için kontrast maddeler olarak özel terapötik uygulamalar, özellikle süperparamanyetik demir oksit NP'ler için olasılıkların kilidini açmıştır.

4.X-ışını Bilgisayarlı Tomografisinde (BT) Kontrast Maddeler

X-ışını bilgisayarlı tomografi, çeşitli tıbbi uygulamalarda çok önemlidir, ancak görünürlüğü artırmak için genellikle kontrast maddeler gerektirir. Metalik nanopartiküller, yüksek X-ışını absorpsiyonu ve özgül ağırlıkları nedeniyle iyot bazlı ajanlara alternatif olarak araştırılmaktadır. Organik moleküller ile yüzey modifikasyonu yoluyla toksisiteyi azaltma çabaları devam etmektedir.

5.Doku Yapımı

Nanopartiküller, düşük toksisite, uyarlanabilirlik, kontrast artırıcı etkiler, aktif hedefleme ve hassas kontrol gibi ideal özellikler sunarak doku mühendisliğinde önem kazanmıştır. Au nanopartikülleri ve BGC nanopartikülleri (biyoaktif cam seramik bazlı nanopartiküller) kök hücre tedavisi ve doku rejenerasyonunda umut verici seçimlerdir.

6.Protein Tespiti

Proteinler biyolojik sistemlerde önemli roller oynar ve bunların tespit edilmesini ve anlaşılmasını gerektirir. Altın nanopartikülleri, protein-protein etkileşimi çalışmaları için immünositokimya da sıklıkla kullanılır. Yüzeyle geliştirilmiş Raman saçılma spektroskopisi, protein probu işlevselliğini artırır.

7.İlaç Dağıtımı

Metal nanomalzemeler, etkili tıbbi tedavi ve teşhis için umut verici yollar sunar. Yüksek elektriksel ve termal stabilite, geniş yüzey alanı ve biyoaktivite dahil olmak üzere benzersiz fizikokimyasal özellikleri, onları ilaç dağıtımında paha biçilmez kılar. Metal nanopartiküller, özellikle kapsülleme yoluyla ilaç geçirgenliğini ve tutulmasını artırarak onları çeşitli terapiler için uygun hale getirir.

8.Kanser İlacı Dağıtımı

Etkili kanser terapötikleri, sağlıklı dokulara verilen zararı en aza indirirken maksimum biyoyararlanım ve bölgeye özgü etki için çaba gösterir. Altın nanoparçacıkları (AuNP'ler), kanser hücreleri üzerinde düşük toksisite, yüzey modifikasyonu kolaylığı ve hedefe yönelik aktivite sergiler. Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) ayrıca antikanser özellikleri göstererek apoptozu indükler ve ROS oluşumunu artırır. Demir oksit nanopartikülleri (IONP'ler), dış manyetik alanlar altında yüksek hedefleme yetenekleri sunarak, sağlıklı hücrelere minimum zarar vererek terapötik etkinliği artırır. Çinko oksit (ZnO), bakır oksit, seryum oksit (CeO), titanyum dioksit (TiO₂) ve paladyum nanopartikülleri (Pd NP'ler) dahil

olmak üzere bir dizi metal nanopartikül, kanser tedavisinde ilaç dağıtımı için kullanılmaktadır. Bu nanopartiküller apoptoza, ROS üretimine ve tümör baskılanmasına katkıda bulunur.

9.Nanovasinler

Metalik nanomalzemeler, çok sayıda değerli özellik ile karakterize edilen en çeşitli nanomalzeme sınıflarından birini temsil eder. Çok sayıda çalışma, nanopartiküllerin (NP'ler) hücre alımını, antijen sunan hücrelerin (APC'ler) aktivasyonunu ve sitokin ve kemokin salınımının indüklenmesini kapsayan bağışıklık tepkilerini uyarma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Bilimsel araştırmalar, gümüş nanopartiküller gibi metalik nanopartiküllerin makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerini aktive etme yeteneğine sahip olduğunu özellikle göstermiştir. Benzer şekilde, altın nanoparçacıklarının sitokin salgılanmasını indüklediği ve verimli hücrel penetrasyon sergilediği, böylece antijen sunan hücrelerin uyarılması yoluyla ilk savunma mekanizmalarını aktive ettiği bilinmektedir.

Yeşil Sentezlenmiş Metalik Nanopartiküllerin Sitotoksitesi

Ana Husus

Nanoteknolojideki önemli bir zorluk, metal nanopartiküllerin çevreye potansiyel olarak salınması ve insanlara maruz kalmasıdır. Nanopartiküllerin artan ticari kullanımının, insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olabilecek yüksek maruz kalma seviyelerine yol açması muhtemeldir. Bu endişe, bu potansiyel riskleri ele alan geniş nanotoksikoloji alanına girmektedir. Çeşitli nanomalzemeler, gastrointestinal sistem yoluyla yutulması, deri yoluyla emilmesi veya solunması yoluyla insan vücuduna girebilir. Birkaç koruyucu katmandan oluşan cilt, hem insanlarda hem de hayvanlarda fizyolojik bir bariyer olarak hayati bir rol oynar. Hastalıkların yayılmasına veya maddelerin zararlı etkilerine karşı savunma mekanizması görevi görür. Nanopartiküller yutulduğunda, metabolik hızı yüksek bir organ olan karaciğerde birikerek glutatyon tükenmesi, bozulmuş mitokondriyal fonksiyon ve artan oksidatif stres gibi sorunlara yol açtığı bilinmektedir. Yutulan nanopartiküller için bir başka endişe alanı da solunum sistemi üzerindeki potansiyel etkileridir. Birçok metal nanopartikülün oksidatif mekanizmalar ve diğer yollarla akciğer fonksiyonunu olumsuz etkilediği bulunmuştur.

Yeşil Sentez ile Üretilen Metalik Nanopartiküllerin Sitotoksitesi

Nanomalzemeler, özellikle çevre dostu yöntemler kullanılarak üretilenler, tıp endüstrisinde, özellikle kontrollü ilaç dağıtım sistemleri ve potansiyel antikanser ajanları olarak önemli umut vaat ediyor. Bununla birlikte, antikanser tedavilerinde kullanılan metalik nanopartiküllerin güvenliği konusunda hala endişeler

vardır. Araştırmalar, nanopartiküllerin boyutunun sitotoksisitesini olumsuz etkileyebileceğini göstermiştir. Bitkiler tarafından üretilen metalik nanopartiküllerin çoğu tipik olarak dairesel veya neredeyse küreseldir ve ortalama ölümcül doz 120 g / ml'dir. Daha az güçlü nanoparçacık varyantları mevcut olsa da, bazı bitki aracılı üretim teknikleri hiçbir zararlı etki göstermemiştir. Örneğin, MTT tahlili kullanılarak MOLT-4 hücre hattındaki Ag-Np'lerin sitotoksitesini değerlendirirken, bu nanopartiküller düşük konsantrasyonlarda dikkate değer antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Sitotoksite analizlerine göre, çevresel olarak üretilen Ag-Np'ler, MOLT-4 hücre hattı için daha güçlü bir monoklonal antikör olan sisplatin için 1.8'in aksine, 0.011 m'lik bir IC50 sergilemiştir.

Yeşil Sentezlenmiş Metalik Nanopartiküllerle İlişkili Mevcut Zorluklar

Hedeflenen Eylemin Zorlukları

Etkili terapötik etki, ilaçların MNP'lerden hastalık bölgesine kesin olarak verilmesini gerektirir. Nanopartiküller, ilaç moleküllerinin çeşitli biyolojik engelleri aşmalarına yardımcı olmada çok önemli bir rol oynar. Örneğin, oral nanopartiküller (NP'ler) mide asidinde stabilite göstermeli ve sistemik bulunabilirliği sağlamak için bağırsak epitelinde gezinmelidir. Benzer şekilde, intravenöz olarak enjekte edilen nanopartiküller, belirlenen hedeflerine ulaşmak için çok sayıda biyolojik engeli aşmalıdır. Mnp'lerle kanser tedavisi bağlamında, ilaç verilmesi genellikle yüksek kanser hücresi yoğunluğu ve geniş tümör stroması tarafından engellenir. Ek olarak, tümörler içinde yüksek interstisyel sıvı basıncının varlığı, transvasküler ilaç dağıtımını azaltan ve bozulmuş lenfatik drenajdan kaynaklanan bir bariyer görevi görür. Verimliliği ve yakınlığına ve etkinliğine dayanır.

Yeşil Sentezlenmiş Metalik Nanopartikül Analizi ve Karakterizasyonunun Zorlukları

Metal nanopartiküllerin karmaşıklığı, oluşturulan NP'lerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini kapsamlı bir şekilde tanımlamak için gelişmiş test tekniklerini gerektirir. MNP'lerin analizi için en son test tekniklerinin geliştirilmesine rağmen, genellikle aktif formülasyonlar ile aktif olmayan veya daha az aktif olanlar arasında ayırım yapmakta zorlanırlar.

Farmakoloji ve Güvenlik Sorunları

Plazma ilaç konsantrasyonunun geleneksel değerlendirmesi, nanopartiküllerin farmakokinetik özelliklerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bununla birlikte, MNP'ler tarafından sergilenen çok çeşitli nano boyutlar nedeniyle, tek tip farmakokinetik özelliklerin elde edilmesi zordur, bu da biyoeşdeğerliklerini ve terapötik etkinliklerini belirlemeyi zorlaştırır. Ayrıca,

özellikle uzun süreler boyunca uygulandığında, metal nanopartiküllerin *in-vivo* toksisitesi ile ilgili veri kıtlığı vardır.

Düzenleyici Zorluklar

FDA ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA), kanser tedavisinde kullanılmak üzere birkaç nanopartikül için onay vermiş olsa da, düzenleyici kurumlar henüz yumuşak madde içeren tıbbi ürünler için kılavuzlar oluşturmamıştır. Sonuç olarak, NPs'nin değerlendirilmesi şu anda yalnızca bireysel vakalar için zaman alıcı, özel risk-fayda analizlerine dayanmakta ve düzenleyici gecikmelere yol açmaktadır. MNP'lerin güvenli kullanımını sağlamak için, son teknoloji ürünü, çok yönlü araçlar geliştirmeye ve nanoparçacık uygulamaları için kapsamlı kılavuzlar oluşturmaya acil bir ihtiyaç vardır.

Özet ve Gelecek Perspektifleri

Bu kapsamlı inceleme, metalik nanoparçacıklar (MNP'ler) dünyasını inceleyerek üretim tekniklerini ve sayısız biyolojik uygulamalarını araştırmaktadır. Mevcut literatürün titizlikle incelenmesi ve nanosistemlerin klinik ortamlarda pratik olarak uygulanması yoluyla, bu derleme, özellikle ilaç dağıtım sistemlerine odaklanarak nanotıptaki son gelişmelerin panoramik bir görünümünü sunmaktadır. Son yirmi yılda, bir dizi yenilikçi, uygun maliyetli ve güvenilir sentez yöntemi ortaya çıkmıştır. Bu gelişmeler sadece hibrit MNP'lerin fizikokimyasal özelliklerini geliştirmekle kalmadı, aynı zamanda hastalık teşhisi ve tedavisi alanında yeni olasılıkları da ortaya çıkardı. Son araştırma eğilimleri, MNP'lerin biyolojik alanda oynayabileceği çeşitli rollerin derinlemesine araştırılmasına yol açmıştır. MNP'lerin çok yönlülüğü, ortaya çıkan diğer sağlık uygulamalarının yanı sıra doku ve organla ilgili zorlukların yönetilmesinde, hedeflenen ilaç dağıtımında, tekil ajan hastalık teşhisinde ve tedavisinde kullanımlarının önünü açan yüzey modifikasyonlarından ve özel işlevselleştirmeden büyük ölçüde etkilenmiştir.

MNP'ler, yirmi birinci yüzyılda biyoloji ve tıp alanlarına önemli katkılar sağlayan vazgeçilmez araçlar olarak ortaya çıkmıştır. Özellikle kanser tedavisinde ilaç hedeflemeyi ve dağıtımını artırmadaki önemli rolleri geniş çapta kabul görmüştür. Ayrıca, MNP'ler, kanser hücreleri için etkili görüntüleme teşhis araçları olarak hizmet edecek ve kesin tanı ve izlemeyi kolaylaştıracak şekilde gelişmiştir. Biyomedikal alanda, mnp'lerin geleneksel tedavilere güvenli, verimli ve uygun maliyetli bir alternatif olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, biyolojik engellerde gezinirken potansiyel etkilerini sınırlayan zorluklarla karşılaşılır. Bu biyolojik kısıtlamalar, ilaç şirketlerinin metalik nanotıplara yatırım yapmalarını potansiyel olarak engelleyen önemli engeller oluşturmaktadır. Bu engellerin üstesinden gelmek için hastalık patofizyolojisi anlayışımızı ve var olan hastalar arası

ve hasta içi varyasyonları derinleştirmek zorunludur. MNP'lerin fizikokimyasal özelliklerinin değiştirilmesi, hastalık bölgesine yönelik ilaç hedeflemesini iyileştirmenin bir başka kritik yönüdür. Hasta biyolojisi ile MNP davranışı arasındaki karmaşık etkileşime ilişkin bilgi eksikliği, klinik çalışmalarda genellikle iyimser beklentilerin yetersiz kalmasına neden olur. Bu konunun ele alınması, ideal olarak uygun hayvan modellerinde güvenlik, etkinlik, biyo-dağılım ve farmakokinetiği kapsayan klinik öncesi verilerin titizlikle değerlendirilmesini gerektirir. MNP'ler, gelişmiş geçirgenlik ve retansiyon (EPR) etkisi yoluyla kemoterapötik ilaçlar için taşıyıcı olarak umut vaat ederken, etkinliği, tümörlerin heterojen dağılımı, hastalar arası değişkenlik ve hasta içi varyasyonlar nedeniyle öncelikle sınırlı sayıda tümör tipinde belgelenmiştir. Bu nedenle, kanser tedavisinde nanoparçacık boyutu için herkese uyan tek bir yaklaşımdan kaçınılmalıdır.

MNP'lerin sentezlenmesi, hem kimyasal hem de yeşil yöntemleri içeren karmaşık ve zorlu bir süreçtir. Yüksek üretim maliyetleri, sentez tekniklerinin incelikleri ve MNP'lerin karmaşık yapıları, büyük ölçekli üretim için sınırlamalar sunar. Biyomedikal alandaki MNP'lerin tüm potansiyelinden yararlanmak için nanoparçacık sentez süreçlerinin yeniden düşünülmesine dikkat edilmelidir. Yeşil sentez sürdürülebilir bir yaklaşım sunarken, kullanılan malzemelerin sadece çevre dostu değil, aynı zamanda uygun maliyetli ve tehlikeli maddelerden yoksun olması da zorunludur. Ayrıca, MNP'lerin klinik güvenliği, klinik toksisite potansiyelleri göz önüne alındığında kapsamlı bir değerlendirme gerektirir. Tıbbi, biyolojik ve sağlık sektörlerinde çeşitli metal nanoparçacıkları ve kompozitleri popülerlik kazandıkça, kapsamlı toksikolojik ve güvenlik değerlendirmeleri giderek daha önemli hale geliyor. MNP'lerin kendi kendine toksisitesini azaltma stratejileri arasında iyon dopingi, işlevselleştirme ve konjuge polimermetal oksit nanoparçacıklarının geliştirilmesi yer alır.

Son teknolojik gelişmeler, çok yönlü uygulamalar için MNP'lerin kapsamlı bir şekilde test edilmesinin yolunu açmıştır. Günümüzde birincil uygulamaları malign hücrelerin tedavisi olsa da, çeşitli terapötik ilaç sınıfları için ilaç dağıtım sistemleri (DDS) olarak MNP'lerin araştırılması ivme kazanmaktadır. Ek olarak, MNP'lerin antibakteriyel özellikleri, geleneksel antibiyotiklere potansiyel olarak uygun maliyetli bir alternatif sunan, kendi kendine enfeksiyon yeteneğine sahip tıbbi cihazlar oluşturmak için kullanılabilir. Sonuç olarak, MNP'lerle ilgili zorlukların ele alınması, kanser tedavisi ve ötesi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik uygulamalar için klinik çevirilerini önemli ölçüde ilerletme vaadinde bulunmaktadır. Devam eden çözüm arayışı şüphesiz sağlık hizmetlerinde MNP'lerin gelişen manzarasına katkıda bulunacaktır.

KAYNAKÇA

- Saravanan A, Kumar PS, Karishma S, Vo DVN, Jeevanantham S, Yaashikaa PR, George CS (2021) A review on biosynthesis of metal nanoparticles and its environmental applications. *Chemosphere* 264:128580
- Kulkarni N, Muddapur U (2014) Biosynthesis of metal nanoparticles: a review. *J Nanotechnol* Article ID 510246, 8. <https://doi.org/10.1155/2014/510246>
- Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Govindan N (2016) Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications—an updated report. *Saudi Pharm J* 24(4):473–484
- Dikshit PK, Kumar J, Das AK, Sadhu S, Sharma S, Singh S, Kim BS (2021) Green synthesis of metallic nanoparticles: applications and limitations. *Catalysts* 11(8):902
- Habibullah G, Viktorova J, Ruml T (2021) Current strategies for noble metal nanoparticle synthesis. *Nanoscale Res Lett* 16(1):47
- Sagadevan S, Imteyaz S, Murugan B, Lett JA, Sridewi N, Weldegebrail GK, Oh WC (2022) A comprehensive review on green synthesis of titanium dioxide nanoparticles and their diverse biomedical applications. *Green Process Synth* 11(1):44–63
- Ojha S (2022) Green synthesis of metallic nanoparticles: Advancements and future perspectives. *Biol Sci* 2(3):262–268
- Keat CL, Aziz A, Eid AM, Elmarzugi NA (2015) Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioresources Bioprocess* 2(1):47
- Bhagat DS, Gurnule WB, Bumbrab GS, Koinkar P, Chawla PA (2023) Recent advances in biomedical applications of biogenic nanomaterials. *Curr Pharm Biotechnol* 24(1):86–100. <https://doi.org/10.2174/1389201023666220513101628>
- Kulkarni D, Sherkar R, Shirsathe C, Sonwane R, Varpe N, Shelke S, More MP, Pardeshi SR, Dhaneshwar G, Junnuthula V, Dyawanapelly S (2023) Biofabrication of nanoparticles: sources, synthesis, and biomedical applications. *Front Bioeng Biotech* 2(11):1159193
- Guleria A, Sachdeva H, Saini K, Gupta K, Mathur J (2022) Recent trends and advancements in synthesis and applications of plant based green metal nanoparticles: a critical review. *Appl Organomet Chem* 36(9):e6778
- Kaur M, Gautam A, Guleria P, Singh K, Kumar V (2022) Green synthesis of metal nanoparticles and their environmental applications. *Curr Opin Environ Sci Health* 29(4):100390. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2022.100390>
- Kurhade P, Kodape S, Choudhury R (2021) Overview on green synthesis of metallic nanoparticles. *Chem Pap* 75(10):5187–5222
- Al-Radadi NS (2022) Laboratory scale medicinal plants mediated green synthesis of biocompatible nanomaterials and their versatile biomedical applications. *Saudi J Biol Sci* 29(5):3848–3870. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.02.042>

- Das RK, Brar SK (2013) Plant mediated green synthesis: modified approaches. *Nanoscale* 5(21):10155–10162
- Singh P, Kim YJ, Wang C, Mathiyalagan R, Yang DC (2016) The Development of a green approach for the biosynthesis of silver and gold nanoparticles by using-panax ginsengroot extract, and their biological applications. *Artif Cell Nanomed, Biotechnol* 44:1–8. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1011809>
- Duan H, Wang D, Li Y (2015) Green chemistry for nanoparticle synthesis. *Chem Soc Rev* 44:5778–5792. <https://doi.org/10.1039/c4cs00363b>
- El-Kassas HY, El-Sheekh MM (2014) Cytotoxic activity of biosynthesized gold nanoparticles with an extract of the red seaweed *corallina officinalis* on the MCF-7 human breast cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:4311–43
- <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.10.4311>
- Habeeb Rahuman HB, Dhandapani R, Narayanan S, Palanivel V, Paramasivam R, Subbarayalu R, Muthupandian S (2022) Medicinal plants mediated the green synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications. *IET Nanobiotechnology* 16(4):115–144
- Pedroso-Santana S, Fleitas-Salazar N (2023) The use of capping agents in the stabilization and functionalization of metallic nanoparticles for biomedical applications. *Part Part Syst Charact* 40(2):2200146
- Yaqoob AA, Ahmad H, Parveen T, Ahmad A, Oves M, Ismail IM, Mohamad Ibrahim MN (2020) Recent advances in metal decorated nanomaterials and their various biological applications: a review. *Front Chem* 8:341
- Song JY, Kwon EY, Kim BS (2010) Biological synthesis of platinum nanoparticles using *Diopyros kaki* leaf extract. *Bioprocess Biosyst Eng* 33(1):159–164
- Philip D, Unni C, Aromal SA, Vidhu VK (2011) *Murraya Koenigii* leaf-assisted rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 78(2):899–904
- Das RK, Pachapur VL, Lonappan L et al (2017) Biological synthesis of metallic nanoparticles: plants, animals and microbial aspects. *Nanotechnol Environ Eng* 2:18. <https://doi.org/10.1007/s41204-017-0029-4>
- Yaraki MT, ZahedNasab S, Zare I, Dahri M, Moein Sadeghi M, Koohi M, Tan YN (2022) Biomimetic metallic nanostructures for biomedical applications, catalysis, and beyond. *Ind Eng Chem Res* 61(22):7547–
- Aramwit P, Bang N, Ratanavaraporn J, Ekgsit S (2014) Green synthesis of silk sericin-capped silver nanoparticles and their potent anti-bacterial activity. *Nanoscale Res Lett* 9(1):79
- Romano G, Almeida M, Coelho AV, Cutignano A, Gonçalves LG, Hansen E, Khnykin D, Mass T, Ramšak A, Rocha MS, Silva TH (2022) Biomaterials and bioactive

natural products from marine invertebrates : from basic research to innovative applications. *Marine Drugs* 20(4):219

- Li Xiangqian XuH, Chen ZS, Chen G (2011) Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *J Nanomater* 2011:270974
- Singh P, Kim YJ, Zhang D, Yang DC (2016) Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends Biotechnol* 34:588–599
- Hulkoti NI, Taranath TC (2014) Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. *Colloids Surf, B* 121:474–483
- Narayanan KB, Sakthivel N (2010) Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Coll Interface Sci* 156(1):1–13
- Iravani S (2014) Bacteria in nanoparticle synthesis: current status and future prospects. *Int Sch Res Not* 2014:359316
- Jayaseelan C, Rahuman AA, Kirthi AV, Marimuthu S, Santhoshkumar T, Bagavan A, Gaurav K, Karthik L, Rao KV (2012) Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 90:78–84
- Ahmad A, Senapati S, Khan MI, Kumar R, Sastry M (2005) Extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by an alkalotolerant fungus. *Trichothecium* sp *J Biomed Nanotechnol* 1:47–53. <https://doi.org/10.1166/jbn.2005.012>
- Husseiny SM, Salah TA, Anter HA (2015) Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusariumoxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. *Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci* 4:225–231
- Korbekandi H, Mohseni S, Mardani Jouneghani R, Pourhossein M, Iravani S (2016) Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 44:235–
- Gericke M, Pinches A (2006) Microbial production of gold nanoparticles. *Gold Bull* 39:22–28. <https://doi.org/10.1007/BF03215529>
- Khan AA, Fox EK, Górzny MŁ, Nikulina E, Brougham DF, Wege C, Bittner AM (2013) pH control of the electrostatic binding of gold and iron oxide nanoparticles to tobacco mosaic virus. *Langmuir* 29:2094–2098



BÖLÜM 2

Enzim Aktivitesi ve Ölçüm Yöntemleri

***Ceylan Fidan Babat*¹**

¹ Arş. Gör. , Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van, Türkiye, ORCID: 0000-0003-3135-7056

GİRİŞ

Biyolojik bilimlerin temel hedeflerinden biri, canlı organizmalarda gerçekleşen tüm kimyasal süreçlerin moleküler temellerini ortaya çıkarmaktır. Biyokimyasal reaksiyonların büyük çoğunluğu enzim adı verilen protein gen ürünleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu anlamda, enzimler spesifik olarak katalizlediği reaksiyon hızlarını büyük ölçüde artıran biyolojik katalizörler olarak da tanımlanmaktadır. Makromoleküllerin, metabolik ve sinyal moleküllerinin biyosentezi, modifikasyonu ve bozunmasını içeren biyokimyasal yolların açıklanması, ilgili enzimlerin saflaştırılmasını ve bu enzimlerin spesifik kimyasal reaksiyonları katalizlediğinin doğrudan gösterildiği deneysel yöntemlerin kullanılmasını gerektirir (Harris ve Keshwani, 2009).

Enzim analizleri özel bir enzimin tanımlanması, bir organizma veya doku gibi belirli bir örnekte bu enzimin varlığının veya yokluğunun kanıtlanması ve bir numunedeki enzim miktarının belirlenmesi gibi çeşitli amaçlara hizmet etmeye yönelik yapılır. Bu bağlamda nitel yaklaşımlar için net bir pozitif veya negatif sonuç yeterliyken, nicel yaklaşımlar mümkün olduğunca kesin veriler sunmalıdır. Enzimlerin en büyük avantajlarından biri, doğrudan tespit yoluyla belirlenmesi gereken işlevsel proteinler veya nükleik asitler gibi hücrenin diğer bileşenlerinin aksine, katalize edilmiş reaksiyonlarıyla tanımlanabilmeleridir (Bisswanger, 2014).

1. Enzim Aktivitesinin İfadesi

Enzimler katalizör oldukları için normalde substratlarından çok daha düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Bu nedenle bir enzimin aktivitesini mutlak terimlerle ifade etmek için kullanılan deney prosedürün gerçek başlangıç hızını ölçtüğünden ve bunun enzim konsantrasyonu ile orantılı olduğundan emin olmak gerekir. Bu koşullar altında hız/enzim konsantrasyonu oranı, bir enzimin aktivitesini kantitatif olarak ifade etmek için kullanılabilecek bir sabit olacaktır. Bu sabitin kullanılması, farklı laboratuvarlardan aynı enzimle elde edilen verilerin karşılaştırılmasını, hücrelere veya dokulara yönelik fizyolojik veya farmakolojik faktörlerin etkilerinin değerlendirilmesini, enzim saflaştırma derecesinin izlenmesini ve farklı enzimlerin veya aynı enzimin farklı substratlarla aktivitelerinin karşılaştırılmasını kolaylaştırır (Tipton, 1992).

En sık kullanılan nicelik, Uluslararası Birim (IU) veya Enzim Birimi/Enzim Ünitesi olarak adlandırılan Birim (Unit)'dir. Bir Enzim Ünitesi, 1 dakikada 1 μ mol substratın dönüşümünü katalize eden (veya 1 μ mol ürün üreten) enzim miktarı olarak tanımlanır. Bir enzim preparatının özgül aktivitesi ise mg protein ba-

şına düşen, Enzim Ünitesi (Birim) sayısıdır. Bir enzimin moleküler ağırlığı biliniyorsa, aktiviteyi moleküler aktivite olarak ifade etmek mümkündür. Moleküler aktivite, enzimin μmol 'ü başına düşen enzim ünite sayısı olarak tanımlanır; başka bir deyişle, dakikada mol enzim başına oluşan ürünün veya kullanılan substratın mol sayısıdır. Bu terim, dakikada enzim aktif bölgesi başına dönüştürülen substratın mol sayısına karşılık gelmeyebilir çünkü bir enzim molekülü birden fazla aktif bölge içerebilir. Bu durumda 1 mol enzim başına düşen aktif bölge sayısı biliniyorsa, aktivite, dakikada katalitik merkez başına (aktif bölge) kullanılan substratın veya oluşan ürünün molekül sayısına karşılık gelen katalitik merkez aktivitesi olarak ifade edilebilir (Ramsay ve Tipton, 2017). Enzim devir (turnover) sayısı terimi de oldukça sık kullanılmaktadır. Devir sayısı, bir enzimin substratını dönüştürme hızını tanımlar; genellikle tek bir enzim molekülü tarafından dönüştürülebilen substrat moleküllerinin sayısı cinsindendir ve saniyede birkaç molekülden birkaç milyon moleküle kadar değişebilir (Smejkal ve Kakumanu, 2019). Enzim aktivitesi birimi ve ondan türetilen nicelikler sıklıkla kullanılsa da, Uluslararası Biyokimya Birliği Adlandırma Komisyonu alternatif olarak katal'in (kat) kullanılmasını önermiştir. Katal, açıklanan diğer birimlerden farklıdır çünkü zaman birimi olarak dakika yerine saniye kullanılır. Bir katal, saniyede 1 mol substratın dönüşümüne karşılık gelir. Katal ve Enzim üniteleri arasındaki bağlantı Eşitlik 1 ve Eşitlik 2'de gösterildiği gibidir (Ramsay ve Tipton, 2017).

$$1 \text{ kat} = 60 \text{ mol} \cdot \text{dk}^{-1} = 6 \times 10^7 \text{ Ünite} \quad (\text{Eş 1})$$

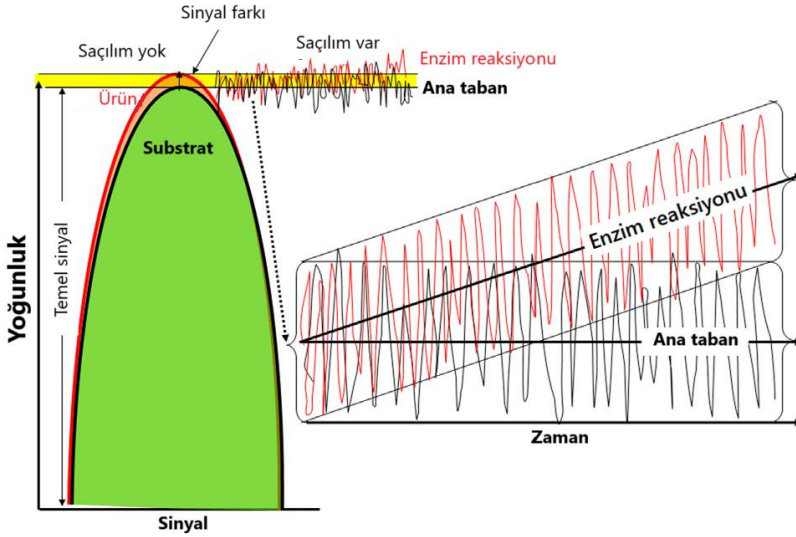
$$1 \text{ Ünite} = 1 \mu\text{mol} \cdot \text{dk}^{-1} = 16.67 \text{ nkat} \quad (\text{Eş 2})$$

2. Enzim Analizleri İçin Temel Koşullar

Enzim katalizli reaksiyonlarda ortak olan, bir substratın bir ürüne dönüşmesi ve ürünün zamana bağlı oluşumunu gözlemlemektir. Bu amaçla, ürünü tanımlamayı sağlayacak bir prosedür bulunmalıdır. Ürün oluşumu doğrudan substratın kaybolmasıyla da bağlantılı olduğundan, substratın azalması da reaksiyonun gözlenmesi için kullanılabilir. İki veya daha fazla ürünün oluştuğu veya reaksiyona iki veya daha fazla substrat molekülünün dahil olduğu durumlarda ise, yalnızca bir bileşenin belirlenmesi yeterlidir. Özetle, en kolay tespit edilebilir reaksiyon bileşeni seçilmelidir (Bisswanger, 2014).

Substrat ve ürünün gözlenen özellikte farklılık göstermesi gerekliliği enzim analizlerinde basit ama önemli bir koşuldur. Kullanılan yöntemle ürün oluşumu çok iyi tespit edilse de substrat eşit yoğunlukta benzer bir sinyal gösteriyorsa, enzim devri gözlemlenemez. Substrat ve ürünün benzer sinyaller vermesi durumu genellikle birçok izomeraz reaksiyonunda olduğu gibi her iki bileşende yalnızca küçük moleküler değişiklikler meydana gelmesinden kaynaklanır (Şekil 1, sol).

Bu tür değişiklikler esas olarak tespit edilebilir, ancak genellikle nicelleştirilmesi zordur, çünkü büyük sinyaller çoğunlukla güçlü saçılmaya ile de sonuçlanır, böylece enzim reaksiyonu tarafından üretilen küçük fark bu gürültü içinde kaybolur. Bu gibi durumlarda sinyal-gürültü oranı analiz edilmelidir (Şekil 1, sağ). Kural olarak, reaksiyon tarafından gösterilen sinyalin yoğunluğu gürültüyü en az iki kat aşmalıdır. Saçılma hücre homojenatları gibi bulanık çözeltiyle çalışılırken kaçınılmazdır ve ölçümler arasındaki tutarsızlık önlenemez. Saçılmaya sebep olan diğer etkenler kontaminasyonlar, zayıf çözünen maddelerden kaynaklanan bulanıklık, kirlenme, toz veya hava kabarcıklarıdır. Yalnızca gözlenen bileşen (substrat veya ürün) sinyali (örneğin absorbens) üretirken, diğer bileşenler gözlenen aralıkta hiçbir sinyal (absorbans) göstermiyorsa, saçılma en düşüktür; böylece reaksiyon aslında sıfırdan başlar ve sinyaldeki herhangi bir değişiklik devam eden bir reaksiyonun gösterir (Bisswanger, 2014).

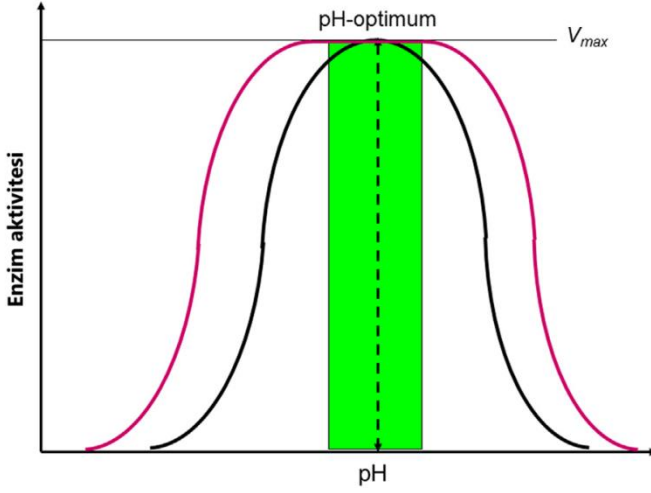


Şekil 1. Hem substrat hem de ürün, aralarında yalnızca küçük bir farkla benzer büyük bir sinyal gösterdiğinde bir enzim reaksiyonunu gözlemlemenin zorlukları (sol taraf). Sağ taraf: sinyal-gürültü oranı: güçlü saçılma verileri için sinyalin yoğunluğu, yani enzim reaksiyonu, temel gürültüyü en az iki kat aşmalıdır (Bisswanger, 2014).

2.1 Enzim Aktivitesi Üzerine pH'ın Etkisi

Enzimler yalnızca sınırlı bir pH aralığında aktiftir. Enzimlerin aktif olduğu pH aralığı enzim türüne göre değişebilir, örneğin bazı enzimler için aktif olabileceği pH aralığı 5-10 iken diğer bazı enzimler için pH aralığı yalnızca 1 birim farklılık gösterecek kadar dar olabilir. Aralık içerisinde maksimum aktivitenin (V_{max} için en yüksek değer) elde edildiği pH değeri optimum pH değeridir (Şekil 2). Aktivite ayrıca kullanılan tamponun doğasından da etkilenebilir. Farklı tamponların kullanımı nedeniyle test edilen pH aralığında enzim aktivite göstermeyebilir. Bu durumda belirli bir pH için alternatif tamponlar test edilmelidir. Optimum pH'ın reaksiyon yönüne özgüdür. Çoğu durumda, özellikle reaksiyonda bir protonun alımı/verimi varsa iki yöndeki optimum pH'lar farklı olacaktır. Örneğin nikotinamid kofaktörlü (NAD(P))-spesifik dehidrogenazlarda NAD(P)⁺ 'in oksitleyici kofaktör olarak kullanıldığı optimum pH genellikle 9 ila 10 aralığında iken, NAD(P)H tarafından substratın indirgenmesi için optimumun pH 6 ila 7 civarındadır (Scopes, 2002).

Bir enzim, ortam pH'sinde bir değişiklik meydana geldiğinde konformasyonel değişikliklere uğrayabilir. Bu durum, amino asitlerdeki yük ile açıklanır. Enzimin içinde, birbirine çekilen pozitif ve negatif yüklü amino asitler bulunur. Enzimin şekli, amino asitler arasındaki çekici kuvvetlere atfedilir. pH değiştiğinde, amino asitlerdeki yükler etkilenir; bu nedenle, amino asitler arasındaki çekim kuvveti kaybolur. Sonuç olarak, enzim, çoğunlukla kalıcı olarak, denatüre bir enzim üreten konformasyonel bir değişikliğe uğrar (Chu ve Robledo, 2022).



Şekil 2. Bir enzimin aktivitesi için pH optimum eğrisi (siyah). Yeşil alan fizyolojik aralığı gösterir. Kırmızı çizgi enzimin daha geniş pH kararlılık eğrisini gösterir (Bisswanger, 2014).

2.2. Enzim Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

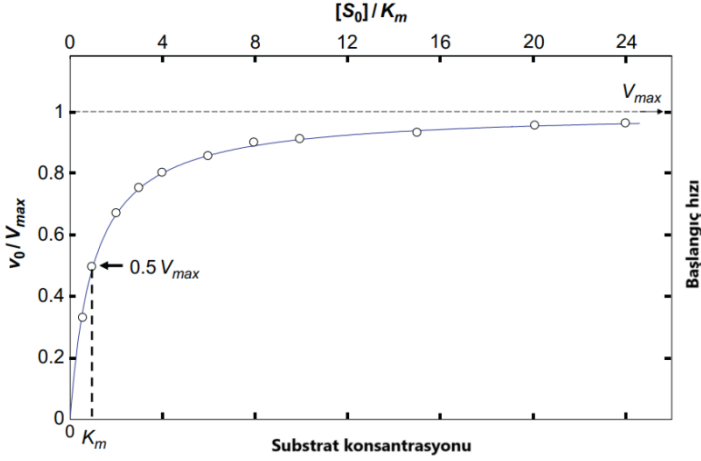
Sıcaklık kinetik sabitleri, enzim kararlılığını ve reaktif çözünürlüğünü etkiler ve bunların hepsi reaksiyon hızları üzerinde geniş bir etkiye sahiptir. İki zıt mekanizma olan aktivasyon (sıcaklık artışıyla sabit hız artışı) ve denatürasyon (enzimin dördüncül ve üçüncül yapılarının termal olarak açılması) reaksiyon sıcaklığının artışıyla meydana gelir. Genel olarak, 50-60°C'ye kadar, aktivasyon denatürasyona göre daha baskın olan mekanizmadır. Ancak termofilik enzimler hariç, 60°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatürasyon baskın hale gelir ve reaksiyon hızı yavaşlar ve 80-90°C civarında durur. Bir enzimin optimum sıcaklığı, birim zamanda substratın ürüne en çok dönüştüğü sıcaklıktır. Herhangi bir enzim için optimum sıcaklık yalnızca zamana göre değil, aynı zamanda enzim preparatının pH, konsantrasyon ve saflığındaki değişikliklere göre de değişebilir (Vitolo, 2020).

2.3. Enzim Aktivitesi Üzerine Substrat Konsantrasyonunun Etkisi

Tek substratlı enzim katalizli reaksiyonda, reaksiyonun başlangıç hızı ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişki Michaelis-Menten denklemi (Eşitlik 3) ile açıklanır ve enzim substrat konsantrasyonuna hiperbolik bir tepki verir (Şekil 3) (Miyana ve Unno, 2011).

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (E\check{s}.3)$$

Bu eşitlikte [S] substrat konsantrasyonunu, v ölçölen hızı, Vmax sonsuz substrat konsantrasyonunda maksimum teorik hızı ve Km ise Michaelis sabitini ifade etmektedir.



şekil 3. Enzim katalizli reaksiyonun hızı üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi (Scanlon vd., 2018).

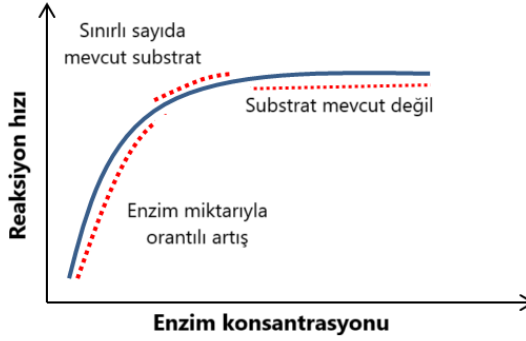
Çok düşük substrat konsantrasyonunda ($<0,1 K_m$), v_0 artan substrat konsantrasyonu ile doğrusal olarak artar (birinci dereceden reaksiyon). $0,1 K_m$ ila $\sim 90 K_m$ arasındaki substrat konsantrasyonlarında ilişki eğriseldir (karışık dereceli reaksiyon). Tüm enzim substratla ($[S] > 100 K_m$) bağlandığında (doyduğunda), hız substrat konsantrasyonundan bağımsızdır, yani sıfırıncı dereceden bir hızdır. şekil 3'deki veriler $1/v_0 - 1/[S]$ olarak çizildiğinde, doğrusal bir ilişki bulunur; Lineweaver–Burk yöntemi (Lineweaver ve Burk, 1934) olarak adlandırılan bu yöntem, $0,5 K_m$ ile $5 K_m$ arasındaki substrat konsantrasyonlarını kullanarak Vmax ve Km'nin kolayca belirlenmesine olanak tanır (Scanlon vd., 2018).

Özetle substrat konsantrasyonundaki artış, belirli bir seviyeye kadar reaksiyon hızını da artırır. Optimum pH, sıcaklık ve enzim konsantrasyonu seviyeleri kullanılarak substrat konsantrasyonu artırıldığında, daha fazla substrat molekölü enzimle etkileşime girer ve daha fazla ürün oluşur. Ancak tüm enzimler substrat

moleküllerine bağlandığında, daha fazla substrat eklenmesi reaksiyon hızı üzerinde hiçbir etkiye sahip olmayacaktır, aksine reaksiyon hızı azalacak ve sonunda sabit hale gelecektir (Scanlon vd., 2018; Kuddus, 2019).

2.4. Enzim Aktivitesi Üzerine Enzim Konsantrasyonunun Etkisi

Genellikle, enzim katalizli bir reaksiyonun hızı, yeterli substrat mevcutsa, numunede bulunan enzim miktarıyla orantılıdır. Daha fazla enzim molekülü mevcut olduğunda, reaksiyon, tüm substrat molekülleri kullanıldığında belirli bir seviyeye kadar daha hızlı olacaktır. Bu aşamadan sonra, daha fazla enzim eklenmesi reaksiyon hızını etkilemeyecektir, çünkü bağlanacak bir substrat yoktur. Substrat konsantrasyonunun aksine, mevcut enzim miktarı molar bazda mümkün olduğunca düşük olmalıdır (Şekil 4) (Bisswanger, 2014; Kuddus, 2019).



Şekil 4. Enzim katalizli reaksiyonun hızı üzerine enzim konsantrasyonunun etkisi

2.5. Enzim Aktivitesi Üzerine Kofaktörlerin Etkisi

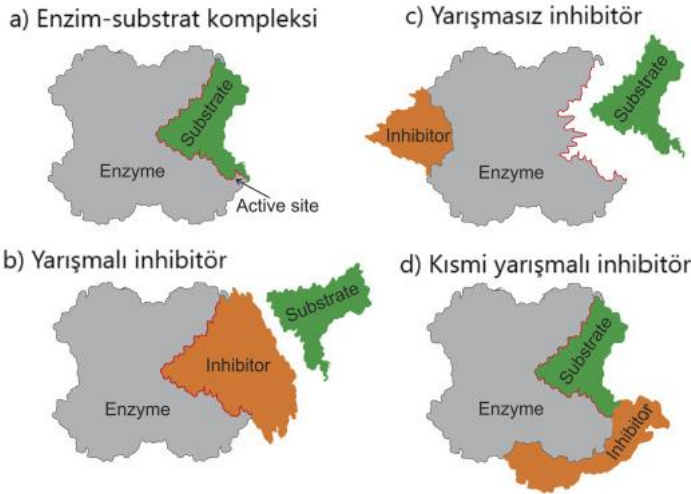
Kofaktörler, enzimlerin çoğunun katalitik aktiviteleri için ihtiyaç duyduğu protein olmayan ayrışabilir gruplardır. Bunlar, enzimin aktif bölgesine sıkı bir şekilde bağlı inorganik veya organik bileşikler içerir. İnorganik kofaktörler arasında Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{2+} gibi metal iyonları bulunur ve birincil katalitik merkez, substratı ve enzimi bağlamak için bir köprü görevi görür ve ayrıca katalitik aktif formunda enzimatik protein konformasyonu için bir dengeleyici madde olarak işlev görebilir. Aktif olmak için metal iyonlarına ihtiyaç duyan enzimlere metaloenzimler denir. Organik kofaktörler arasında vitaminler veya bunların türevleri bulunur. Kofaktörler, koenzimler ve prostetik gruplar olarak ayrılır. Koenzimler vitaminlerden sentezlenir ve enzimin aktif bölgesine gevşek bir şekilde

bağlanır ve kinetik olarak ikinci bir substrat olarak kullanılır. Bu nedenle, koenzimler bir ürüne dönüştürülür. Bazı örnekler nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+), flavin adenin dinükleotid (FAD^+), CoA, tiamin, biotin ve riboflavindir. Prostetik gruplar, inaktif enzime (apoenzim olarak adlandırılır) çok sıkı bir şekilde bağlanan, hatta bazı durumlarda kovalent olarak bağlanan kofaktörlerdir. Bunların örnekleri biotin ve hem grupları, sitokrom C, flavin mononükleotid ve FAD 'dir. Prostetik gruba bağlandıktan sonra, apoenzim holoenzim olarak adlandırılır (Juárez-Enríquez vd., 2022; Bachosz vd., 2023).

2.6. Enzim Aktivitesi Üzerine İnhibitörlerin Etkisi

Enzim inhibitörleri, enzimlere bağlanabilen ve reaksiyon hızını azaltabilen bileşiklerdir. Geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak sınıflandırılırlar. Geri dönüşümsüz inhibitörler, enzimle sıkı bir şekilde bağlanır ve kararlı bir kompleks oluşturur (genellikle farklı fonksiyonel gruplarla kovalent bağlar yoluyla) ve tüm katalitik aktivitesini kalıcı olarak azaltır. Geri dönüşümlü inhibitörler, enzime kovalent olmayan bir şekilde bağlanan ve reaksiyon hızını yavaşlatan veya engelleyen moleküllerdir. Enzim ve inhibitör arasındaki etkileşimler, hidrojen ve iyonik bağların yanı sıra hidrofobik etkileşimleri de içerir. Genellikle, enzime bağlandıklarında kimyasal reaksiyonlara girmezler ve seyreltme veya diyalizle kolayca uzaklaştırılabilirler (Roskoski, 2007).

Geri dönüşümlü inhibitörler yarışmalı, yarışmasız ve kısmi yarışmalı inhibisyon olmak üzere üç sınıfa ayrılabilir (Şekil 5).



Şekil 5. (A) enzim-substrat kompleksini, (B) yarışmalı, (C) yarışmasız ve (D) kısmi yarışmalı inhibitörleri gösteren diyagram (Juárez-Enríquez vd., 2022).

Yarışmalı inhibitörler aktif bölgeye karşı bir afiniteye sahiptir (Şekil 5B), substratın yapısal analoglarıdır ve enzime bağlanmak için substratla rekabet ederler, böylece enzim-substrat kompleksinin oluşumu önlenir. Substrat ve inhibitörün bağıl konsantrasyonu inhibisyon seviyesini etkiler. Bu tür inhibisyon, yüksek konsantrasyonda substrat eklenerek geri döndürülebilir. İnhibisyon derecesi, substrat ve inhibitör konsantrasyonuna bağlıdır (Bacon, 1965).

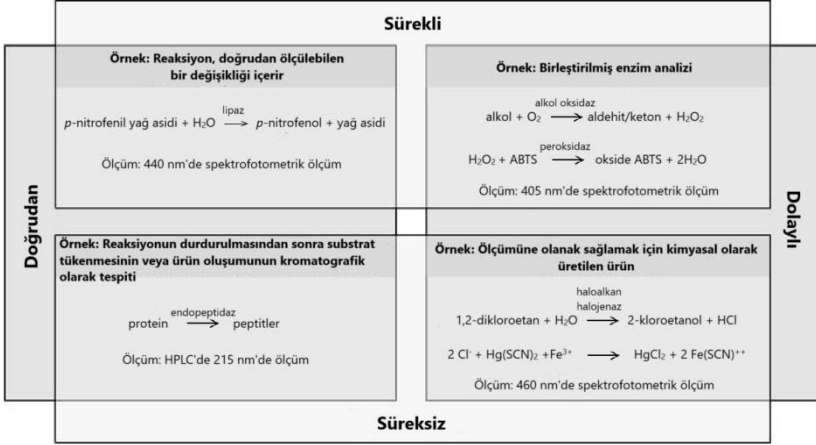
Yarışmalı olmayan inhibitörler allosterik bölgelere (aktif bölge hariç) bağlanır ve enzimin yapısını bozar (Şekil 5C). Şekildeki bu değişiklik enzim substrat kompleksinin oluşumuna izin vermez. Dahası, inhibitör enzim-substrat kompleksine bağlanarak da enzimi inhibe edebilir. Bu nedenle, substrat konsantrasyonunu artırmak inhibitörün enzimden ayrılmasına yardımcı olmaz (Oliveira ve Sauer, 2012).

Kısmi yarışmalı inhibitör durumunda (Şekil 5D), inhibitör serbest enzime bağlanmaz, yalnızca enzim-substrat kompleksine bağlanarak onu inaktive eder. Böylece ürün oluşumunu önler. İnhibitörün bağlanması substratın bağlanmasını etkiler ve bunun tersi de geçerlidir. Çok substratlı enzimlerde kısmi yarışmalı inhibisyon meydana gelebilir (Roskoski, 2007). İnhibitör, enzim üzerinde substrattan başka bir yere bağlanır (allosterik etki), bu da enzimin yapısında değişikliklere neden olur ve substratın aktif bölgeye olan afinitesini azaltır (Patadiya vd., 2021).

3. Enzim Aktivitesi Ölçüm Teknikleri

Reaksiyonun türüne bağlı olarak, başlangıç reaksiyon hızını ölçmek için çok farklı analitik yöntemler uygulanabilir. Sürekli analizler, enzimatik reaksiyonun gerçek zamanlı ölçümüne izin verir ve reaksiyonun ilerleme eğrilerinin doğrudan izlenebilmesi avantajına sahiptir. Buna karşılık, süreksiz analizler yalnızca belirli birkaç zaman aralığında reaksiyonun durdurulup substrat ya da ürünlerin ölçülmesi esasına dayanır, bu nedenle daha dikkatli tasarlanmalı ve değerlendirilmelidir. Reaksiyon süresi ile reaksiyon ilerlemesi arasındaki doğrusallık garanti edilmelidir. Ayrıca, sonuçları bozacak devam eden substrat dönüşümünü veya ürün oluşumunu tamamen önlemek için reaksiyonlar anında sonlandırılmalıdır. Çoğu zaman, reaksiyon, enzimi hızla etkisiz hale getirmek için sıcaklıkta ani bir artış veya pH'ta ani bir değişiklikle durdurulur (Tipton, 1992; Geueke ve Kohler, 2010).

Doğrudan analizler, reaksiyon karışımındaki değişikliklerin çeşitli yöntemlerle ölçülmesine olanak tanırken, dolaylı analizler, reaksiyonun nicelleştirilmesine olanak sağlamak için daha ileri bir işleme ihtiyaç duyar. Enzimatik reaksiyonun özgülüklerine bağlı olarak, sürekli ve süreksiz analizler doğrudan ve dolaylı analiz yöntemleriyle birleştirilebilir. Bu farklı analiz türlerini gösteren ve bazı örnekler sağlayan şema Şekil 6'da özetlenmiştir (Tipton, 1992; Geueke ve Kohler, 2010).



Şekil 6. Analiz türleri ve klasik örnekler (Bergmann ve Sanik, 1957; Green, 1986; Manco vd., 1994; Verduyn vd., 1984; Geueke ve Kohler, 2010)

Enzim aktivitesi ölçüm tekniği olarak hangi yöntemin seçileceği substratların ve ürünlerin fizikokimyasal özellikleri dikkate alınarak belirlenir. Aynı zamanda ölçüm yöntemleri doğrudan veya dolaylı, sürekli veya süreksiz analizlerin kullanılıp kullanılamayacağını da belirler (Geueke ve Kohler, 2010). En yaygın olarak uygulanan prosedürler spektrofotometrik analizlerdir, çünkü bunlar enzimatik bir reaksiyonla ortaya çıkan absorbans değişikliklerini ölçmek için nispeten kolay, doğru ve güvenilirlerdir. Spektrofotometrik ölçüm, sürekli bir reaksiyonu takip etmek için çok uygundur, ancak diğer tüm analiz türlerinde de uygulanabilir. Çok sayıda numuneye hızla uygulanabilir (Cantor ve Schimmel, 1980; Harris ve Bashford, 1987; Chance, 1991). Bir enzim reaksiyonu fotometrik olarak gözlemlenemiyorsa, diğer optik yöntemler kullanılabilir. Alternatif, ancak daha az yaygın olarak kullanılan optik yöntemler, reaksiyon çözeltisinin floresansındaki, luminesansındaki veya bulanıklığındaki değişikliklerin ölçülmesidir. Florimetri, absorbans ölçümlerinden daha hassastır (yaklaşık yüz kat), ancak NADH ve bazı

yapay substrat analogları gibi yalnızca birkaç enzimatik substrat veya ürün, floresans yayar. Spektroflorimetrelerin kullanımı daha karmaşıktır ve daha fazla hata kaynağı vardır, bu nedenle florimetrik analizler için daha derin bir deneyime ihtiyaç vardır (Geueke ve Kohler, 2010; Bisswanger, 2014). Benzer durumlar, şekerler gibi asimetrik bileşiklerin gözlemlenmesi için önemli teknikler olan CD ve ORD ölçümleri için de geçerlidir (Adler vd, 1973; Cantor ve Schimmel, 1980; Chance, 1991). Nişasta gibi parçacıkların enzimatik bozunumu türbidimetri ile gözlemlenebilir (Bock, 1980), lüminometri ise ATP'ye bağlı reaksiyonlar için uygulanır (DeLuca ve McElroy, 1978; Campbell, 1989). Optik yöntemlerin yanı sıra, lipaz veya kolin esteraz tarafından asitlerin serbest bırakılması gibi özellikle pH değişimleriyle ilerleyen reaksiyonlar için pH tayinleri elektrokimyasal yöntemler de kullanılarak yapılabilmektedir. pH'daki değişiklik devam eden reaksiyonun doğrudan bir ölçüsü olarak, uygun pH göstergeleri veya bir pH elektrodu uygulanarak zayıf tamponlu bir sistemde sürekli olarak izlenebilir (Taylor, 1985). Sürekli ölçüm yöntemlerine bir diğer örnek oksidazlar, mono- ve dioksijenazlar gibi oksijen gerektiren enzimlerin reaksiyonlarının bir oksijen elektrodu kullanılarak sürekli olarak kolayca takip edilmesidir (Geueke ve Kohler, 2010).

Katalize edilmiş bir reaksiyon başlangıçta hızının türetildiği doğrusal bir ilişkiyi takip etmelidir. Daha sonraki ilerleme sırasında substratların tükenmesi nedeniyle reaksiyon yavaşlar ve sonunda durur. Bu nedenle, hızın belirlenmesi için sadece reaksiyon eğrisinin doğrusal kısmının alınması önemlidir, ancak tüm reaksiyon eğrisini gözlemlemek mümkün değilse, hızın hesaplanmasının reaksiyon eğrisinin doğrusal olmayan kısmını da içerdiği ve anormal sonuçlar elde edileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu, substrat veya ürünün dönüşümü için doğrudan bir sinyal bulunamayan tüm durumlar için geçerlidir. Hızı belirlemek için reaksiyon belirli bir süre sonra durdurulmalı ve oluşan ürün veya dönüştürülen substrat miktarı sonraki aşamada kimyasal bir gösterge reaksiyonuyla ya da HPLC, GC gibi kromatografik yöntemlerle veya elektroforetik yöntemler ve kapiler elektroforez (süreksiz analiz) gibi ayırma yöntemleri ile analiz edilmelidir. Sürekli bir reaksiyon eğrisi yerine bu yöntemler yalnızca tek bir nokta sağlar ve hız, reaksiyona başlamadan önce bu noktayı köre bağlayan bir çizginin eğiminden hesaplanmalıdır. Bu tür prosedürler, ölçümün gerçekten reaksiyon eğrisinin doğrusal kısmında gerçekleştiğine dair hiçbir garanti vermez ve bu nedenle doğrulamak için farklı reaksiyon sürelerinde kontrol ölçümleri yapılmalıdır. Bu prosedürler zahmetlidir ve özellikle kantitatif ölçümler için mümkünse sürekli analizler tercih edilirken, süreksiz analizler yalnızca enzim aktivitesinin varlığının tespit edilmesi gereken kalitatif belirlemeler için kullanışlıdır (Geueke ve Kohler, 2010; Bisswanger, 2014).

KAYNAKLAR

- Adler, A. J., Greenfield, N. J., Fasman, G. D. (1973). Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. *In Methods in enzymology*, 27, 675-735.
- Bachosz, K., Zdarta, J., Bilal, M., Meyer, A. S., Jesionowski, T. (2023). Enzymatic co-factor regeneration systems: A new perspective on efficiency assessment. *Science of The Total Environment*, 868, 161630.
- Bacon, F. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12(1), 88-118.
- Bergmann, J. G., Sanik, J. (1957). Determination of trace amounts of chlorine in naphtha. *Analytical Chemistry*, 29(2), 241-243.
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1-6), 41-55.
- Bock, R. (1974). Methoden der analytischen. *Chemie: eine Einführung. Trennungsmethoden Verlag Chemie*, 1: 232-2328.
- Campbell, A. K. (1989). Living light: biochemistry, applications. *Essays in biochemistry*, 24, 41-81.
- Cantor, C. R., Schimmel, P. R. (1980). *Biophysical chemistry: Part II: Techniques for the study of biological structure and function*. Macmillan.
- Chance, B. (1991). Optical method. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*, 20, 1-28.
- Chu, M. M., Robledo, D. A. (2022). An Investigation on the Effects of Varying Temperatures on Gelatin Denaturation in Response to Enzymatic Reactions from Fruit Extracts. *Journal of Industrial Biotechnology*, 3(1), 10-18.
- Deluca, M., McElroy, W. D. (1978). Purification and properties of firefly luciferase. *In Methods in enzymology*, 57, 3-15. Academic Press.
- Geueke, B., Kohler, H. P. (2010). Enzyme assays, substrate specificities, kinetic parameters: measurement of enzyme activities. *In Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.
- Green, J. D. (1986). Detection of femtomole quantities of proteases by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 152(1), 83-88.
- Harris, D. A., Bashford, C. L. (1987). Spectrophotometry and Spectrofluorimetry, IRL.
- Harris, T. K., Keshwani, M. M. (2009). Measurement of enzyme activity. *Methods in enzymology*, 463, 57-71.
- Juárez-Enríquez, E., Levario-Gómez, A., Ochoa-Reyes, E., Tirado-Gallegos, J. M., Baeza-Jiménez, R., Buenrostro-Figueroa, J. (2022). Significance of enzyme kinetics in food processing and production. *In Value-addition in food products and processing through enzyme technology*, 467-482. Academic Press.

- Kuddus, M. (2019). Introduction to food enzymes. In *Enzymes in food biotechnology*, 1-18. Academic Press.
- Lineweaver, H., Burk, D., 1934. Determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56, 658–666.
- Manco, G., D., I. Gennaro, S., D., E., Rosa, M., Rossi, M. (1994). Purification and characterization of a thermostable carboxylesterase from the thermoacidophilic eubacterium *Bacillus acidocaldarius*. *European journal of biochemistry*, 221(3), 965-972.
- Miyanaga, K.; Unno, H. 2.05—Reaction Kinetics and Stoichiometry. In *Comprehensive Biotechnology*, 2nd ed.; Moo-Young, M., Ed.; Academic Press: Burlington, 2011; pp 33– 46.
- Oliveira, A. P., Sauer, U. (2012). The importance of post-translational modifications in regulating *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *FEMS yeast research*, 12(2), 104-117.
- Patadiya, N., Panchal, N., Vaghela, V. (2021). A review on enzyme inhibitors. *The International Research Journal of Pharmacy*, 12(6), 60-66.
- Ramsay, R. R., Tipton, K. F. (2017). Assessment of enzyme inhibition: a review with examples from the development of monoamine oxidase and cholinesterase inhibitory drugs. *Molecules*, 22(7), 1192.
- Roskoski, R. (2007) Modulation of enzyme activity, In: S.J. Enna, D.B. Bylund (eds.) *xPharm: The comprehensive Pharmacology Reference*, 1-11, Elsevier Inc. (ISBN 978-0- 08-055232-3). doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60042-X].
- Scanlon, M. G., Henrich, A. W., Whitaker, J. R. (2018). Factors affecting enzyme activity in food processing. In *Proteins in Food Processing*, 337-365. Woodhead Publishing.
- Scopes, R.K. (2002). Enzyme Activity and Assays. In *Encyclopedia of Life Sciences*; Wiley: Hoboken, NJ, USA.
- Smejkal, G. B., Kakumanu, S. (2019). Enzymes and their turnover numbers. *Expert Review of Proteomics*, 16(7), 543-544.
- Taylor, F. (1985). Flow-through pH-stat method for lipase activity. *Analytical biochemistry*, 148(1), 149-153.
- Tipton, K. F. (1992). Principles of enzyme assay and kinetic studies. *Enzyme assays, a practical approach*. IRL, Oxford, 1-58.
- Verduyn, C., van Dijken, J. P., Scheffers, W. A. (1984). Colorimetric alcohol assays with alcohol oxidase. *Journal of Microbiological Methods*, 2(1), 15-25.
- Vitolo, M. (2020). Brief review on enzyme activity. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(2), 60-76.