

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**MİKROAKIŞKAN KANALDA HİDROJEL  
İÇİNDE TUTUKLANMIŞ ENZİM İLE MODEL  
BİR SAPONİNİN AGLİKONUNA DÖNÜŞÜMÜ**

**Cahit MÜDERRİSOĞLU**

**Tez Danışmanı : Doç. Dr. Sayıt SARGIN**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi : 20.09.2017**

**Bornova-İzmir**

**2017**



Cahit MÜDERRİSOĞLU tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan "Mikroakışkan kanalda hidrojel içinde tutuklanmış enzim ile model bir saponinin aglikonuna dönüşümü" başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 20.09.17 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

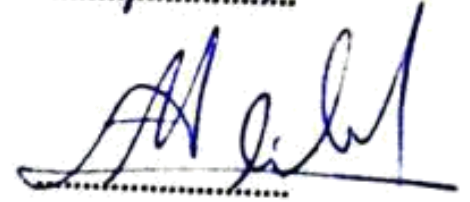
Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Sayıt SARGIN



Raportör Üye: Prof. Dr. Murat ELİBOL



Üye: Yrd. Doç. Dr. Ali Oğuz BÜYÜKKİLECI





EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum "**Mikroakışkan kanalda hidrojel içinde tutuklanmış enzim ile model bir saponinin aglikonuna dönüşümü**" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

20.. / 09 / 20..17

İmzası



Adı-Soyadı

Cahit Müderrisoğlu



**ÖZET****MİKROAKIŞKAN KANALDA HİDROJEL İÇERİSİNDE  
TUTUKLANMIŞ ENZİM İLE MODEL BİR SAPONİNİN  
AGLİKONUNA DÖNÜŞTÜRÜLMESİ**

MÜDERRİSOĞLU, Cahit

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sayit SARGIN

EYLÜL 2017, 65 sayfa

Bu tez kapsamında terapötik öneme sahip baicalin molekülünün, baicalin molekülü hidrolizi yoluyla üretimi için rutin olarak uygulanan kimyasal ve serbest enzim hidroliz işlemleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen verim değerleri ilk kez, bu çalışma kapsamında tasarlanan mikroakışkan sistemlerden elde edilen reaksiyon verimleriyle kıyaslanmıştır. Mikroakışkan ortamda gerçekleştirilen enzimatik hidroliz çalışmaları için farklı kanal uzunluğu, geometrisi ve mikro ölçekli-hacme sahip biri PDMS (Polidimetoksisilan)-cam (tek kanallı, 100 µL) ve diğer ikisi cam-silikon-cam (Tip-I ve Tip-II, 37 µL) olmak üzere, üç farklı mikroreaktör sistemi kullanılmıştır.

*Helix pomatia* kaynaklı beta-glukuronidaz (GUS) enzimi, sürekli akış prensibiyle çalışan farklı mikroakışkan sistemlerde, TEOS-PEO (tetraetoksi silan-poli-etilen oksit) türevli sol-gel materyali aracılığıyla immobilize edilmiştir. Silika jeller içerisinde immobilize edilen GUS enziminin hem serbest hem de immobilize formu için  $K_m$  ve  $V_{max}$  gibi kinetik sabitleri, bu enzimin sentetik substratı olan pNPG (para-nitrofenol-  $\beta$ -D- glukuronik asit) kullanılarak sırasıyla 1,57 mM, 56,82  $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{dk}^{-1}$  ve 0,40 mM, 11,88  $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{dk}^{-1}$  olarak belirlenmiştir.

Baicalin substratının 4 saatlik asidik ve bazik hidrolizlerinde yüksek yan ürün oluşumlarıyla elde edilen baicalin üretim verimleri sırasıyla %  $10 \pm 3$  ve %

0,10±0,02 olarak belirlenmiştir. Baicalin molekülü serbest GUS enzimi ile 4 saat kesikli inkübasyon işlemi sonunda baicaleine, yan ürün oluşumu görülmeden % 99±1 oranında dönüştürülmüştür. Üç farklı mikroreaktör sisteminin mikrokanalları içerisinde, 4 saatlik çalışma süresi sonunda, PDMS-cam, cam-silikon-cam Tip-I ve Tip-II mikroçiplerde elde edilen baicalein üretim verimleri sırasıyla % 62±2, % 50±1 ve % 10±2 olarak belirlenmiştir. Tasarlanan mikroakışkan sistemlerinin, kimyasal hidroliz yöntemlerine göre daha yüksek, serbest enzim hidroliz işlerine göre ise daha düşük baicalein dönüşümü sağladığı belirlenmiştir. Mikroreaktörlerden elde edilen baicalein dönüşüm verimlerinin, serbest enzim ile elde edilen verimin altında olduğu tespit edilse de, geliştirilen mikroreaktör sistemlerinin baicalein üretiminde, enzimin geri kazanımı ve sürekli işletim imkanı sunması yönüyle etkin işlem alternatifleri oluşturabileceği ortaya konmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Baicalin, baicalein, mikroreaktör, beta-glukuronidaz, sol-jel.

**ABSTRACT****CONVERSION OF A MODEL SAPONINE TO ITS AGLYCON IN  
A MICROFLUIDIC CHANNEL BY AN ENZYME ENTRAPPED IN  
HYDROGEL**

MÜDERRİSOĞLU, Cahit

MSc in Biengineering Department

Supervisor : Assoc. Prof. Sayit SARGIN

SEPTEMBER 2017, 65 pages

In this thesis, an effective and novel method for the production of baicalein was developed by hydrolysis of baicalin. Routine chemical and free enzyme hydrolysis procedures were performed for the production of baicalein and the yields obtained, were compared for the first time with the reaction efficiencies obtained from the microfluidic systems designed in this study. For enzymatic hydrolysis studies carried out in microfluidic platform, a total of three different microreactor systems with different channel length, geometry and volume - one with PDMS-glass (single channel, 100  $\mu\text{L}$ ) and the other two with glass-silicon-glass (Type-I and Type-II, 37  $\mu\text{L}$ ) - were used.

*Helix pomatia* derived beta-glucuronidase (GUS) enzyme was immobilized in different microfluidic systems operating on the principle of continuous flow by silica based sol-gel materials. Kinetic constants such as  $K_M$  and  $V_{MAX}$  for both free and encapsulated GUS enzyme in sol gel materials were measured using pNPG (para-nitrophenol- $\beta$ -D-glucuronic acid) and determined as 1,57 mM, 56,82  $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$  and 0,40 mM, 11,88  $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}$ , respectively.

Yields of baicalein production with 4h acidic and basic hydrolysis of baicalin resulted in 10 $\pm$ 3% and 0,10 $\pm$ 0,02%, respectively, together with high by-product formation. 99 $\pm$ 1% of baicalin molecule was converted to baicalein at the end of the 4 hour of incubation with free GUS enzyme without any by-product

formation. After 4 hours of process period, the production yields of baicalein in PDMS-glass, glass-silicon-glass Type-I and Type-II microchips were determined as  $62\pm 2\%$ ,  $50\pm 1\%$  and  $10\pm 2\%$ , respectively.

Although it has been found that the conversion efficiency of baicalein obtained from microreactors is lower than the yield obtained with free enzyme, it has been revealed that the developed microreactor systems can produce effective processing alternatives in the production of baicalein by providing the possibility of recovery and continuous operation of the enzyme.

**Keywords:** Baicalin, baicalein, microreactor, beta-glucuronidase, sol-gel.



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana her aşamada rehberlik eden değerli danışman hocam Doç. Dr. Sayıt SARGIN'a,

Söz konusu çalışmanın her adımında büyük emeği olan çok değerli ve sevgili hocam Doç. Dr. Özlem YEŞİL-ÇELİKTAŞ'a,

Bu çalışmasının tamamlanması yönünde önemli bir adım olan yüksek performans sıvı kromatografisi analizlerinde ölçümlerin doğru ve tekrarlanabilir şekilde yapılması ve veri analizi gibi konularda önemli katkıları olan değerli Yrd. Doç. İsmail HAKKI AKGÜN'e,

Deney tasarımları ve elde edilen sonuçların yorumlanmasında farklı bakış açılarıyla katkı sağlayan Ar. Gör. Şeref AKAY'a,

Laboratuvar ortamını paylaştığım ve dayanışma içerisinde olduğum tüm mesai arkadaşlarıma,

Yüksek lisansım süresince bursiyer araştırmacı olarak içerisinde yer aldığım, 113M050 numaralı "Mikroakışkan sistemlerde sol-jel teknolojisi odaklı enzimatik tepkimeler: deneysel çalışma ve model geliştirme" projesine mali destek sunan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK),

Son olarak, hayatımın her aşamasında gösterdikleri sonsuz sevgi, sabır ve destekleri için aileme saygı, sevgi ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
İÇİNDEKİLER .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ .....	4
2.1. Baicalin ve Baicalein Molekülü.....	4
2.2. Enzimlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması .....	6
2.3. İmmobilizasyon Yöntemleri .....	7
2.4. Silika Temelli Sol-jel Tekniği .....	9
2.5. Beta-Glukuronidaz Enzimi .....	12
2.5.1. Enzimin yapısı ve aktivitesi ile ilgili moleküler bilgiler .....	12
2.5.2. Beta-glukuronidaz enzimi için standart aktivite testleri .....	16
2.5.3. Beta-glukuronidaz enziminin yaşam bilimlerindeki uygulamaları .....	19
2.6. Mikroakışkan Sistemler .....	21
2.6.1. Mikroakışkan sistemler: temel kavramlar .....	21
2.6.2. Mikroakışkanlar ve yaşam bilimleri uygulamaları .....	21
2.7. Mikroreaktörler .....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	27
3.1. Beta-Glukuronidaz Enziminin Silica Jellere Yüklenmesi.....	27
3.2. Beta-Glukuronidaz Enziminin Karakterizasyonu .....	28
3.2.1. Enzim kinetiği çalışmaları .....	28
3.2.2. Enzim stabilitesi çalışmaları .....	31

**İÇİNDEKİLER (DEVAM)**

	<u>Sayfa</u>
3.3. Baicalin/Baicalein UPLC-PDA Analizi.....	32
3.3.1. Analiz metodu ve kalibrasyon denklemi.....	32
3.3.2. Örnek hazırlama işlemi .....	32
3.3.3. Dönüşüm veriminin hesaplanması.....	33
3.4. Baicalin hidrolizi .....	34
3.4.1. Asidik ve bazik hidroliz .....	34
3.4.2. Baicalin'in serbest enzim ile hidrolizi.....	34
3.4.3. Mikroçip hidrolizi .....	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1. Beta-Glukuronidaz Enziminin Karakterizasyonu .....	37
4.1.1. Enzim kinetiği çalışmaları.....	37
4.1.2. Uygun pNPG substrat derişiminin belirlenmesi.....	38
4.1.3. Enzim stabilitesi.....	40
4.2. Mikroreaktör Sisteminde pNPG için Enzimatik Kataliz .....	42
4.3. Baicalin Hidrolizi .....	44
4.3.1. Baicalin kimyasal hidroliz .....	44
4.3.2. Baicalin enzimatik hidroliz.....	45
4.3.3. Mikroçiplerde hidroliz .....	47
4.3.4. Farklı hidroliz yöntemlerinin karşılaştırılması .....	53
5. SONUÇ .....	54
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	56
ÖZGEÇMİŞ .....	62

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
APTES	(3-Aminopropil) trietoksisilan
BA3GN	Benziladenin N3-glukuronid
Beta-glukuronidaz	GUS
M6G	morfin-6-glukuronid
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDMS	Polidimetoksisilan
PEO	Polietilen oksit
pNP	para-nitrofenol
pNP <sup>-</sup>	para-nitrofenoksit
pNPG	para-nitrofenol- $\beta$ -D- glukuronik asit
TEOS	Tetraetoksi silan
TMOS	Tetrametoksi silan
U	Enzim ünitesi
U-HPLC	Ultra-yüksek performans sıvı kromatografisi
UV	Ultraviyole

## 1. GİRİŞ

Baicalin, *Scutellaria baicalensis* Georgi bitkisinin köklerinden elde edilen biyoaktif bir bileşendir. Hem baicalin saponini (7-glukuronik asit 5,6-dihidrosiflavon) hem de bu molekülün baicalein olarak isimlendirilen aglikon parçasının güçlü bir antioksidan ve serbest radikal temizleyici, anti-enflamatuvar, antiviral, antifungal ve antikanser aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Kitamura et al., 1998; Shieh et al., 2000; Kim et al., 2004; Chen et al., 2014). Ancak baicalin'in aglikonu olan baicalein molekülü yukarıda sözü edilen geniş spektrumdaki biyolojik aktivitelerde baicalin'e göre daha yüksek olduğu çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur.

*Scutellaria baicalensis* bitkisinin kökleri hem baicalin hem de bu molekülün aglikonu olan baicalein ihtiva etmektedir. Ancak farmasötik açıdan daha değerli nitelikte olan baicalein'in söz konusu bitkiden izole edilmesi, içeriğinin oldukça düşük olmasından dolayı (yaklaşık % 0,2-0,5) oldukça zordur. Bu nedenle söz konusu problemin çözümü için bitki kökünde yaklaşık % 6-10 aralığında bulunan baicalin'i enzimatik ya da kimyasal dönüşüm yoluyla baicalein'e dönüştürülmesi tercih edilmektedir (Jiang et al., 2007; Huang et al., 2011).

Bu noktada beta-glukuronidaz enzimi aracılığıyla gerçekleştirilen baicalein üretim yöntemi, derişik asit çözültisi kullanılarak gerçekleştirilen kimyasal üretim yöntemlerine göre çeşitli avantajlar sunmaktadır:

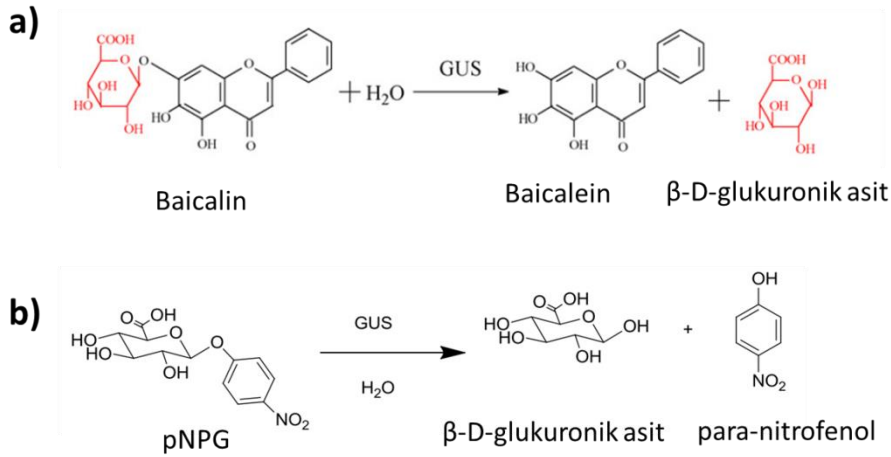
- (i) kullanılan beta-glukuronidaz katalizörünün % 100 seçicilikle (yan ürün oluşturmadan) baicalein oluşumunu sağlaması,
- (ii) enzimatik hidroliz işleminin ılımlı koşullarda gerçekleşmesi ve çevre için toksik nitelikteki kimyasalların kullanımını gerektirmemesi.

Mikroakışkan sistemler  $\mu\text{L}$  ya da nL mertebesindeki akışkanların, bir mikrokanal boyunca akışını sağlayan ve amaca göre kontrol edebilen sistemlerdir. Tepkime ölçeğinin mikrokanal yapıları içerisinde birkaç yüz nL ya da  $\mu\text{L}$  gibi oldukça küçük hacimlere düşürülmesi sayesinde, sistemde ısı ve kütle transferi etkinliği sağlanabilmekte ve dolayısıyla mikroreaktör sistemlerindeki reaksiyon

hızı ve enzimatik işlemlerdeki biyokatalizör aktivitesi gibi çıktılar ve de bunun neticesi olan işlem verim/verimliliği yükseltilebilmektedir.

Bu çalışma kapsamında baicalin molekülünün hidroliziyle baicalein üretimine yönelik literatürde tekniğin bilinen durumu içerisinde yer alan kesikli işletimle gerçekleştirilen kimyasal hidroliz (asidik ve bazık), serbest enzim hidrolizi ve immobilize enzim hidrolizi işlemlerine ilave ve etkin bir alternatif olarak ilk kez, mikroakışkan platformlarda sürekli işletim sistemiyle çalıştırılabilen, enzimatik hidroliz sistemlerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla üç farklı mikroreaktör tasarımında, biyokatalizör olarak *Helix pomatia* kaynaklı beta-glukuronidaz (GUS) kullanılarak baicalin'den baicalein'in enzimatik dönüşüm reaksiyonları çalışılmıştır (Şekil 1.1 a). Bu sistemlerdeki enzim/substrat oranı sabit tutularak akış hızı, mikrokanal uzunluğu ve mikroreaktör geometrisinin söz konusu biyokatalitik reaksiyon verimi üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Mikroçip sistemlerinin kanalları içerisinde enzimin etkin şekilde hapsedilmesi, sistemin sürekli akış prensibiyle çalıştırılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla biyomoleküllerle geçimliliği yüksek olan, çalışılan tepkimeye karşı inertlik içeren ve mikroakış ortamının gerektirdiği gözenekli



**Şekil 1.1** a) Çalışma kapsamında “hedef reaksiyon” olan GUS aracılıklı olarak baicalinin baicaleine dönüşüm reaksiyonu. b) “hedef reaksiyonu” taklit eden “model reaksiyon” olan ve deneysel çalışmalarda mikroçip dışındaki rutin enzim karakterizasyon işlemlerinde kullanılan GUS aracılıklı pNPG'nin pNP'ye hidroliz reaksiyonu.

doğası nedeniyle çeşitli avantajlar sunan silika esaslı monolitik sol-jel taşıyıcıları kullanılmıştır. Çalışmanın ilk bölümünde silika jel sistemlerine immobilize edilmiş GUS enziminin stabilite ve reaksiyon kinetiğine ait katalitik özellikleri, rutin ve yoğun tekrarlı işlemler içerdiğinden bu enzimin sentetik substratı olan ve asıl hidrolizi hedeflenen baicalin molekülünü taklit eden pNPG (para-nitrofenol- $\beta$ -D- glukuronik asit) substratıyla gerçekleştirilen “model reaksiyonlar” aracılığıyla belirlenmiştir (“Model reaksiyona” ilişkin detaylı bilgilere bölüm 2.5.2’de detaylı olarak yer verilmiştir) (Şekil 1.1 b). Buna ilave olarak pNPG substratı esas alınarak mikroreaktör sistemlerinde yüksek ürün verimine fırsat veren optimum akış hızı tayini yapılmış, mikroreaktörde belirlenen uygun reaksiyon koşulları, üç farklı mikroçip sistemindeki baicalin hidroliz reaksiyonları için kullanılmıştır.

Çalışmanın ikinci ve ana bölümünde ise, baicalin molekülünden baicalein üretimiyle ilişkili konvansiyonel kimyasal, enzimatik ve de yenilikçi mikroreaktör esaslı hidroliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Baicalinin kimyasal hidrolizi için asidik ve bazik hidroliz işlemleri uygulanmıştır. Bu reaksiyonlarda enzimatik reaksiyonlarla aynı başlangıç substrat derişimi kullanılmış böylelikle işlem verimlilikleri kıyaslanmıştır. Serbest enzim reaksiyonları ve üç farklı mikroreaktör içerisindeki immobilize enzim aracılığıyla gerçekleştirilen reaksiyonlarda işlem etkinliklerinin verim yönünden sağlıklı şekilde karşılaştırılması için ise sabit enzim/substrat oranından hareket edilerek tüm çalışmalar birbiriyle kıyaslanabilir şekilde standardize edilmiştir. Ayrıca farklı mikroreaktör ortamlarında gerçekleştirilen reaksiyonların verimi üzerinde kanal uzunluğu ve geometrisinin etkisi araştırılmıştır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Baicalin ve Baicalein Molekülü

Baicalin, *Scutellaria baicalensis* Georgi bitkisinin köklerinden elde edilen biyoaktif bir bileşendir. Hem baicalin saponini (7-glukuronik asit 5,6-dihidrosiflavon) hem de bu molekülün baicalein olarak isimlendirilen aglikon parçasının güçlü bir antioksidan ve serbest radikal temizleyici, anti-enflamatuvar, antiviral, antifungal ve antikanser aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Kitamura et al., 1998; Shieh et al., 2000; Kim et al., 2004; Chen et al., 2014). Ancak baicalin'in aglikonu olan baicalein molekülü yukarıda sözü edilen geniş spektrumdaki biyolojik aktivitelerde baicalin'e göre daha yüksek olduğu çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Geleneksel Çin tıbbında kullanılan bitkisel ilaçların önemli bir kısmında, anahtar bileşen olarak baicalin ve baicalein saponinleri de bulunmaktadır (Şekil 2.1 a-b-c). Son yıllarda baicalin ve baicalein moleküllerinin sözü edilen biyolojik aktivitelerine ilave olarak, kan-beyin bariyeri permeabilitesini değiştirebildiği, kalp ve karaciğer dokusu hasarlarında sağaltıcı, nörodejeneratif rahatsızlıklarda ise koruyucu bir etki gösterdiği ve bazı kök hücre tiplerinde farklılaşmayı etkilediği belirlenmiş ayrıca dikkat eksikliği ve hiperaktivite rahatsızlıklarında tedavi amaçlı kullanılabileceği rapor edilmiştir (Srinivas, 2010).



Şekil 2.1 a) *Scutellaria baicalensis* kökleri; b) baicalin tozu; c) baicalin ve baicalein moleküllerinin kimyasal yapıları (Chen et al., 2014).

Ancak baicalin'in aglikonu olan baicalein molekülü yukarıda sözü edilen geniş spektrumdaki biyolojik aktivitelerde baicalin'e göre daha üstündür. Bunun altında yatan nedenin de daha önce yapılan araştırmalar sonucunda raporlanan moleküler doku permeabilite değerlerindeki farklılıktan kaynaklandığı belirtilmektedir. Esasen baicalin ve baicalein için doku geçirgenliği ( $P_{app}$ ) değerleri sırasıyla  $P_{app} = 0,037 \times 10^{-6}$  cm/s ve  $P_{app} = 1,7 \times 10^{-5}$  cm/s olarak belirlenmiştir. Bu veriler aglikon baicalein'in baicalin'e göre yaklaşık 450 kat doku permeabilitesi üstünlüğü olduğunu açıkça belirtmektedir (Chen et al., 2014). Farklı araştırmalarda oral alımları sonrasında sıçanlarda net biyoyararlanım değerlerinin baicalin ve baicalein molekülleri için sırasıyla % 2,2 ve % 27,8 olduğunu belirlenmiştir (Zhou et al., 2010). Bu araştırmada baicalin'in midede ılımlı şekilde, incebağırsak ve kalınbağırsakta ise oldukça zayıf şekilde absorblandığı tespit edilirken, aglikon baicalein'in ise sindirim sistemi içerisinde baicalin'e göre oldukça üstün bir şekilde absorblanabildiği belirlenmiştir. Literatürde yer alan farklı çalışmalarda ise aglikon baicalein'in *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında çeşitli kanser hatlarının proliferasyonunu inhibe etmede baicalin'e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük gösterdiğini kanıtlanmıştır (Huang, et al., 2011). Literatürde yer alan bir çalışmada baicalein ve baicalin'in miyeloma hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmesi yönünden belirlenen IC50 değeri 28  $\mu$ M ve 200  $\mu$ M olarak rapor edilmiştir (Ma et al., 2005). Yine farklı bir çalışmada bu moleküllerin prostat kanseri proliferasyonu üzerindeki inhibiyonu esaslı IC50 değerleri ise baicalin ve baicalein için sırasıyla 29,8  $\mu$ M ve 60,8  $\mu$ M olarak belirlenmiştir (Chen et al., 2001). Bu verilerden de anlaşılacağı üzere antikanser aktivitesi yönünden de aglikon baicalein, baicalin'e göre üstün bir biyolojik aktivite göstermektedir.

*Scutellaria baicalensis* bitkisinin kökleri hem baicalin hem de bu molekülün aglikonu olan baicalein ihtiva etmektedir. Ancak farmasötik açıdan daha değerli nitelikte olan baicalein'in söz konusu bitkiden izole edilmesi, içeriğinin oldukça düşük olmasından dolayı (yaklaşık % 0,2-0,5) oldukça zordur. Bu nedenle söz konusu problemin çözümü için araştırmacı ve üreticiler bitki kökünde yaklaşık % 6-10 aralığında bulunan baicalin'i enzimatik ya da kimyasal dönüşüm yoluyla baicaleine dönüştürmeyi tercih etmektedir (Jiang et al., 2007; Huang et al., 2011). Kimyasal dönüşüm yönteminde trihydroxyacetophenone bileşeninden başlanarak

kimyasal sentez yapılmakta ya da *Scutellaria baicalensis* bitkisinde baicalin'e göre yaklaşık 50 kat daha fazla bulunan baicalin'in asidik hidrolizi gerçekleştirilmektedir (Jiang et al., 2007). Bu yöntemlerle kıyaslandığında Bacalinin baicaleine beta-glukuronidaz enzimi aracılığıyla biyodönüşüm yöntemi, % 100 seçimlilik, yüksek etkinlik, ılımlı koşullarda gerçekleşme ve çevre dostu üretim karakteristiğiyle öne çıkmaktadır (Şekil 1.1 a) (Zhang et al., 2005; Zhang, Wu et al., 2009; Huang et al., 2011).

## 2.2. Enzimlerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Enzimler protein yapılı biyolojik katalizörlerdir. Yaşayan hücreler (hayvan, bitki ve mikroorganizma) tarafından üretilen enzimler biyokimyasal reaksiyonlarda hayati öneme sahiptirler. Hücredeki neredeyse her bir reaksiyon spesifik bir enzimin varlığına ihtiyaç duymaktadır. Enzimlerin yaşayan bir sistemdeki temel işlevi kimyasal bağların yapımı ya da yıkımıdır. Dolayısıyla diğer tüm katalizörler gibi enzimler de kendileri kalıcı kimyasal değişimler geçirmeksizin ilgili oldukları reaksiyonun hızını arttırlar (Sheldon and van Pelt, 2013).

Enzimlerin katalitik yetenekleri sahip oldukları belirli protein yapılarından kaynaklanmaktadır. Spesifik bir reaksiyon, aktif bölge olarak bilinen enzim yüzeyinin küçük bir bölümü tarafından katalizlenir. Belirli bir enzim için belirli bir reaksiyonu katalizlemek amacıyla bu bölgede bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler meydana gelir (Sheldon and van Pelt, 2013).

Enzimatik reaksiyonlar diğer reaksiyonlardan bazı yönleriyle ayrılırlar:

1-Bir enzim katalizörü, substratına oldukça spesifiktir ve dolayısıyla sadece bir veya birkaç kimyasal reaksiyonu katalizler.

2- Enzim katalizörlüğündeki reaksiyonların hızı genellikle biyolojik olmayan katalizörler tarafından yönetilen aynı reaksiyonun hızından çok daha fazladır. Ayrıca istenilen etkinin yaratılması için sadece küçük bir enzim miktarı yeterli olabilmektedir.

3- Enzimatik reaksiyonlar için reaksiyon koşulları oldukça ılımlıdır.

4- Enzimler görece olarak hassas ve kararlı olmayan moleküllerdir ve kullanımlarında bazı tedbirlerin alınmasını gerektirirler (optimum pH, sıcaklık v.b.) (Sheldon and van Pelt, 2013).

Biyoteknolojideki modern gelişmeler - özellikle rekombinant DNA teknolojisindeki ilerlemeler - bugünlerde çoğu enzimin fiyatını ticari olarak kabul edilebilir seviyelere düşürmüş ve böylelikle de endüstriyel işlemlerde, biyokatalizin geniş kapsamda uygulanabilmesini sağlamıştır (Sheldon, 2007). Ancak enzimler doğaları gereği çözümlü bileşenler olduklarından, enzimatik proselerde ürün kontaminasyonu, biyokatalizörü bir reaksiyon karışımından ayırma, zayıf stabilite ve sınırlı kullanım (enzim için) gibi birtakım problemlerle karşılaşmaktadır (Betancor and Luckarift, 2008). Özellikle bahsedilen son iki problem herhangi bir endüstriyel işlemin verimliliğini direkt olarak etkilemektedir. Bahsi geçen tüm bu problemler enzimlerin immobilizasyonu ihtiyacını doğurmaktadır. Çünkü immobilizasyon işlemi biyokatalizörün serbest enzime kıyasla stabilitesinin ve tekrar kullanılabilirliğinin sağlanması amacıyla gerçekleştirilen bir işlemdir (Brady and Jordaan, 2009).

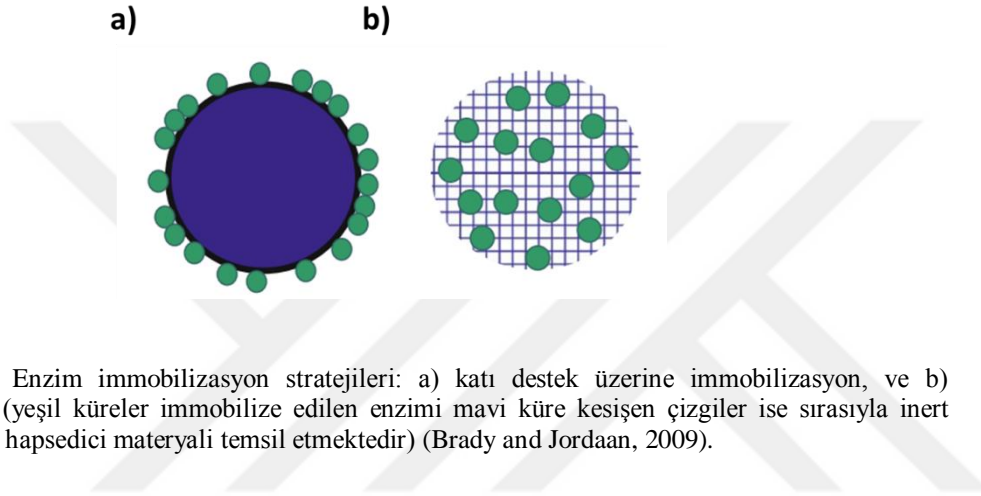
Enzimlerin immobilizasyon aracılığıyla alıkonması ya da geri kazanılması, sadece biyokatalizörün üründen ayrılmasına ve kimi durumda sürekli işleme fırsatı vermemekte aynı zamanda bir biyokatalizörün tekrar kullanılabilmesi için üretim döngüsü sayısında da önemli bir artışa fırsat sağlamaktadır (Sheldon 2007, Betancor and Luckarift, 2008; Brady and Jordaan, 2009; Sheldon and van Pelt, 2013).

### **2.3. İmmobilizasyon Yöntemleri**

Temel olarak enzim immobilizasyon metodları iki kategoriye ayrılabilir: bir desteğe bağlama (taşıyıcı) ve hapsetme (Şekil 2.2) (Sheldon and van Pelt, 2013).

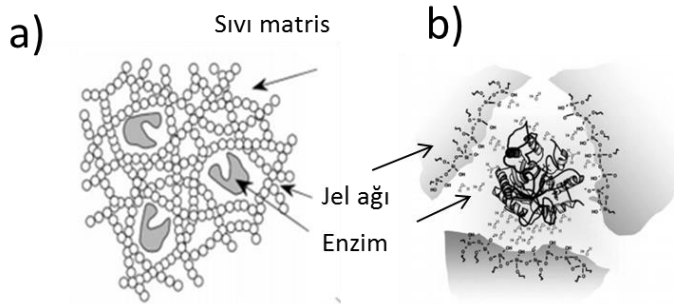
Bir desteğe (taşıyıcı) bağlama işlemi fiziksel (hidrofobik ve van der Waals etkileşimleri), iyonik ya da kovalent (kimyasal) olabilir. Ancak fiziksel bağlama, enzimi taşıyıcıya sabitlenmiş şekilde tutmada genellikle yetersizdir. İyonik

bağlama ise daha kuvvetlidir ve enzimin desteğe kovalent bağlaması genellikle enzimin destek yüzeyinden sızmasını (leaching) engellemektedir. Diğer yandan enzimi kovalent bağlama eğer enzim tersinmez şekilde deaktive olmuşsa desteğin ve enzimin kaybedilmesi gibi önemli bir dezavantaja sahiptir. Enzim immobilizasyonu için kullanılan tipik destekler sentetik rezin, biyopolimerler (polisakkaritler gibi) ya da inorganik katılardır (mezoporoz silika ve zeolit gibi) (Sheldon and van Pelt, 2013).



**Şekil 2.2** Enzim immobilizasyon stratejileri: a) katı destek üzerine immobilizasyon, ve b) hapsetme (yeşil küreler immobilize edilen enzimi mavi küre kesişen çizgiler ise sırasıyla inert taşıyıcı ve hapsedici materyali temsil etmektedir) (Brady and Jordaan, 2009).

Diğer bir alternatif immobilizasyon yöntemi olan hapsetme işlemi bir enzimin bir polimer ağının içerisine ilave edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu polimerik matrislere örnek olarak organik poliakrilamid ve inorganik silika sol-jeller verilebilir (Şekil 2.3) (Sheldon and van Pelt, 2013).

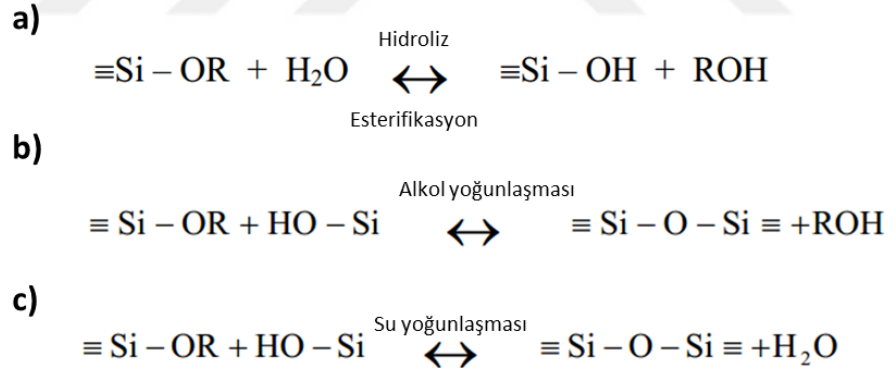


**Şekil 2.3** a) Enzim immobilize edilmiş bir silika sol-jel materyalin şematik görüntüsü, b) gözenekli sol-gel materyalinin bir gözeneği içerisinde hapsedilmiş enzimin görünümüne ait şematik çizim (Avnir et al., 2006).

## 2.4. Silika Temelli Sol-jel Tekniği

Sol genel anlamıyla bir sıvı içerisinde koloidal nanopartiküllerin (1-100 nm) kararlı dispersiyonunu, jel ise mikronaltı boyutlardaki gözeneklere sahip olan ve polimerik zincirlerle ara bağlantılar oluşturmuş katı bir molekül ağını ifade etmektedir. Sol-jel işleminde sıvı içerisinde dağılmış öncül silica nanopartikülleri bu çözeltinin ortam pH'mın asit ya da baz kullanılarak değiştirilmesiyle su molekülleriyle reaksiyon verdikten sonra polimerize olarak üç boyutlu gözenekli bir molekül ağı oluşturmaktadır. Sol-jel işlemi, kullanılan prekürsörün türüne bağlı olarak inorganik prekürsörler (kloridler, nitratlar, sülfidler v.b.) ve alkoksit prekürsörleriyle gerçekleştirilenler olmak üzere iki temel kategoriye ayrılabilir (Smirnova and Arlt, 2004; Cumana, 2013).

Alkoksit prekürsörler ılımlı koşullarda hidroliz edilip aynı zamanda polimerize edilebildiklerinden silika temelli jel sentezinde sıklıkla tercih edilmektedir. Günümüzde yoğun olarak kullanılan alkoksit prekürsörler tetrametoksi silan (TMOS) ve tetraetoksi silan'dır (TEOS) (Smirnova and Arlt, 2004; Cumana, 2013).

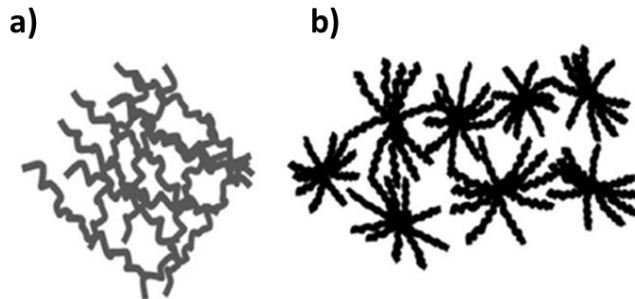


**Şekil 2.4** Silika öncülünün a) hidroliz, b) alkol yoğunlaşması ve c) su yoğunlaşması tepkimelerinin genel şeması (Smirnova and Arlt, 2004).

Silika temelli sol-jel materyalleri genel olarak üç tepkime adımıyla üretilebilmektedir. İlk adım olan hidroliz reaksiyonlarında, silika öncüllerinin (TEOS ve TMOS gibi) hidrolizi aracılığıyla jelleşme için gerekli işlevsel grupları taşıyan monomerler üretilir. Hidroliz reaksiyonu alkoksit grubunun (OR) hidroksil grubuyla yer değiştirmesiyle sonuçlanır (Şekil 2.4 a). İkinci adımda, öncedeki adımda üretilen monomerler yoğunlaşma tepkimelerine dahil olarak siloksan (Si-

O-Si) bağları ve oligomer yapıları oluşturur. Yoğunlaşmanın ilerlemesiyle birlikte monomerler oligomerlerle ya da oligomerler birbiriyle etkileşerek bir araya gelirler. Söz konusu yoğunlaşma tepkimeleri iki farklı mekanizma ile, ya iki -OH (su yoğunlaşması) ya da bir Si-OH ve bir -OH (alkol yoğunlaşması) grubu arasında olmakta ve tepkime ürünü olarak monomerleri bir araya getiren bağlayıcı bir oksijen ve tepkime mekanizmasına bağlı olarak sırasıyla bir su ya da alkol yan ürünü ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.4 b-c). Yoğunlaşma tepkimelerinin ilerlemesiyle üçüncü adım olan jelleşme olayı gerçekleşir (Smirnova and Arlt, 2004; Singh et al., 2014).

Hidroliz ve yoğunlaşma reaksiyonları ortam pH'nın asit ya da baz kullanılarak değiştirilmesiyle kontrol edilebilmektedir. Kullanılan asit ya da baz çözeltileri söz konusu reaksiyonlar için katalizör niteliğindedir ve üretilen gözenekli materyallerin fiziksel ve elektrokimyasal özelliklerini büyük ölçüde belirlemektedir. Silikon alkoksitler (TMOS, TEOS vb.) dikkate alındığında, asit katalizli reaksiyonlar zayıf şekilde çapraz bağlanmış doğrusal polimerlerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Şekil 2.5 a). Bu polimerler ilave dallar oluşturarak diğer polimer zincirleriyle karışırlar ve böylelikle jel yapılarını oluştururlar. Fakat baz katalizli reaksiyonlar, alkoksit silanların hızlı hidroliz ve yoğunlaşmalarına bağlı olarak, yoğun şekilde dallanmış kümeler oluştururlar (Şekil 2.5 b) (Smirnova and Arlt, 2004; Singh et al., 2014). Küme oluşumlarındaki bu farklılık oluşan metal oksitlerin reaksiyon ortamındaki çözünürlük farklarından kaynaklanmaktadır. Silikon oksidin çözünürlüğü alkali ortamlarda daha fazladır ve bu durum asidik ortamlara göre silika kümelerinin

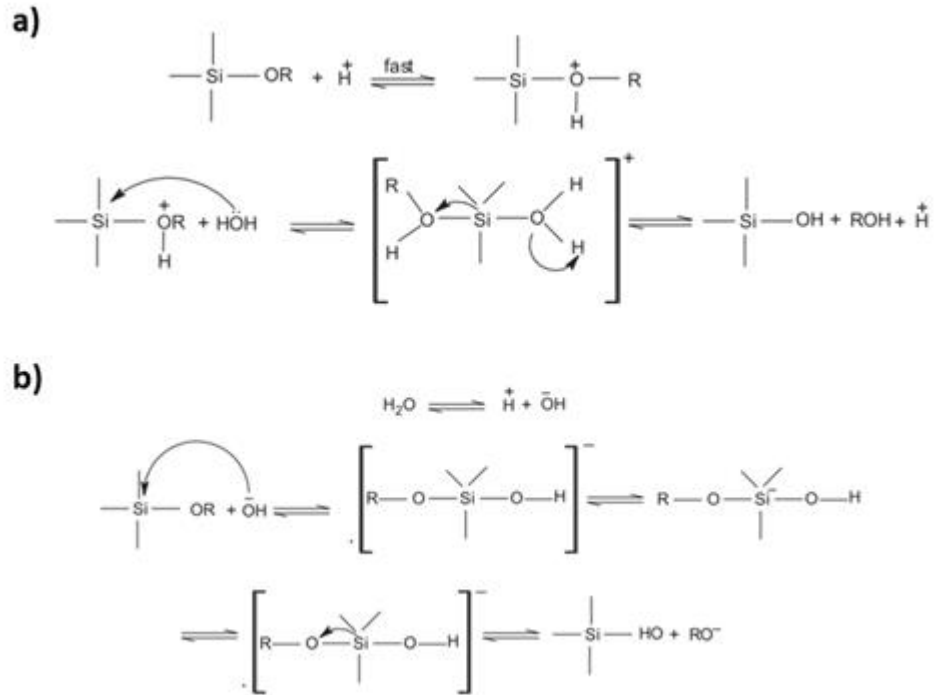


**Şekil 2.5 a)** asit katalizöründe zayıf şekilde çapraz bağ yapmış ve **b)** baz katalizöründe yüksek derecede dallanmış gözenekli silika ağı (Singh et al., 2014).

doğrusal uzantılar yapıp birbirine karışması yerine bu kümelerin büyümeden kendi aralarında bağlantı oluşturmalarına sebep olmaktadır (Smirnova and Arlt, 2004; Singh et al., 2014).

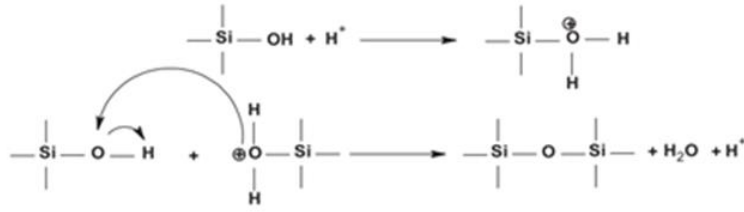
Silika ve silika ihtiva eden öncüllerin (TMOS, TEOS vb.) tümü için sıfır yük ya da izoelektronik nokta değeri pH 2-4 aralığındadır. Bu noktanın üzerinde silika partikülleri negatif yük taşırlar ve yoğunlaşma tepkimesi, OH<sup>-</sup> (alkali koşullar) iyonları tarafından katalizlenir. pH 2'nin altındaysa silika partikülleri pozitif yükler taşırlar ve H<sup>+</sup> iyonu bu durumda katalizör olarak (asidik koşullar) görev alır (Brandhuber et al., 2005).

Silikon alkoksitler varlığında bahsi edilen koşullarda, hem asit hem de baz katalizörlüğünde gerçekleşen tepkimeler için muhtemel reaksiyon mekanizmaları Şekil 2.6 ve Şekil 2.7'de verilmiştir (Singh et al., 2014).

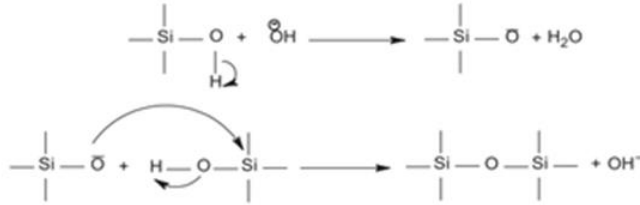


Şekil 2.6 a) Asit ve b) baz katalizli hidroliz tepkimesinin şematik gösterimi (Singh et al., 2014).

a)



b)

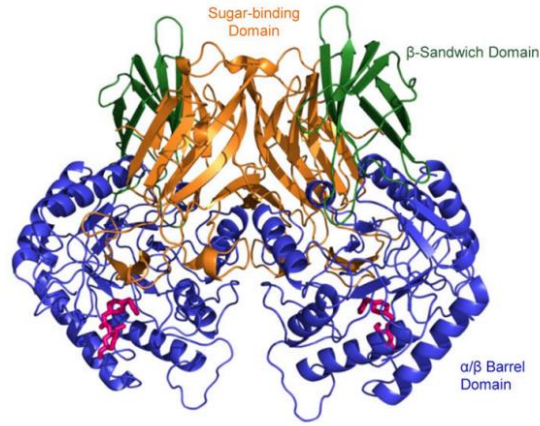


Şekil 2.7 a) Asit ya da b) baz katalizli yoğunlaşma tepkimelerinin gösterimi (Singh et al., 2014).

## 2.5. Beta-Glukuronidaz Enzimi

### 2.5.1. Enzimin yapısı ve aktivitesi ile ilgili moleküler bilgiler

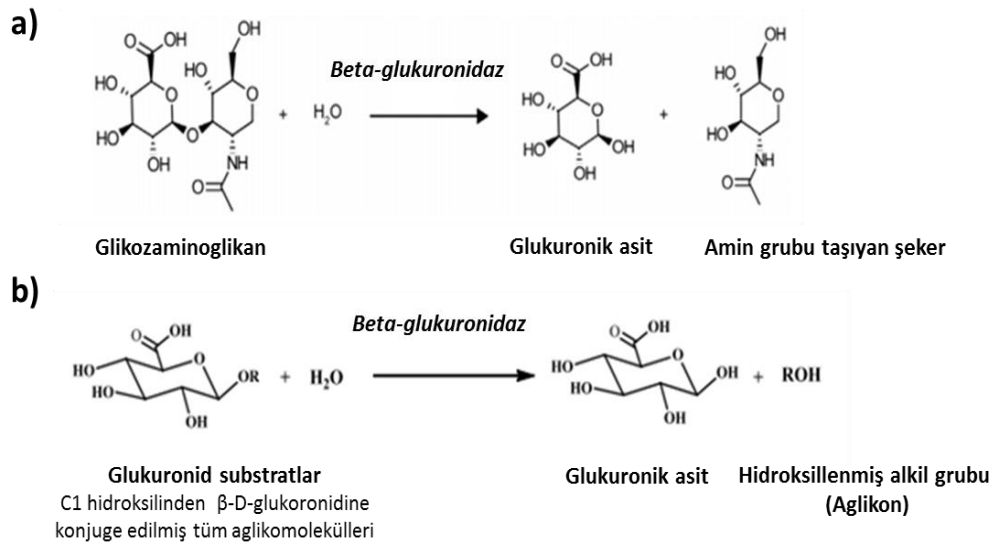
Beta glukuronidaz (GUS, EC 3.2.1.31)  $\beta$ -glukuronidlerin parçalanmasını katalizleyen bir tip 2 glikozit hidrolazdır (Şekil 2.8). Enzim glukuronid substratların karbonhidrat birimine yüksek ölçüde spesifiktir. Glukuronid substratlar sınıfına organizmada bulunan doğal glikoz amino glikan moleküllerinin yanı sıra molekül yapısındaki C1 hidroksilinden  $\beta$ -D-glukuronik asit birimine bağlı bulunan tüm sentetik aglikon moleküllerinin (örneğin ilaçlar ve vücuda alınan diğer tüm ksenobiyotikler) girdiği göz önüne alındığında GUS enziminin yaşam bilimlerinde birçok alanda kullanım potansiyeli taşıdığı görülmektedir (Şekil 2.9) (Siddharth, 2014).



**Şekil 2.8** *Escherichia coli* (*E. Coli*) kaynaklı beta-glukuronidaz enziminin üç boyutlu moleküler yapısı (Roberts et al., 2013).

### 2.5.1.1. GUS substrat seçiciliği

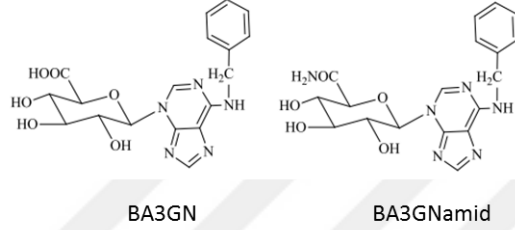
GUS, glukuronid substratların karbonhidrat birimi üzerindeki C6 karboksilik asit birimine karşı yüksek derecede seçici ve aktiftir. Ancak GUS enzimi galakturonid (glukuronidlerle kıyaslandığında ters oryantasyonda C4 hidroksil birimi taşıyan) glukozid (C6 hidroksi metil), galaktosid (C6 hidroksimetil ve ters oryantasyonda C4 hidroksil birimi içeren) ve (C2 hidroksili ters oryantasyonda olan) gibi substratlara karşı oldukça düşük bir aktiviteye sahiptir (Matsumura and Ellington, 2001).



**Şekil 2.9** a) GUS için metabolizmada glikozaminoglikan'dan amino şekerlerinin üretimiyle sonuçlanan doğal reaksiyon ve b) ksenobiyotik glukuronid substratlar için genel hidroliz reaksiyon şeması (Grisewood et al., 2013).

GUS enziminin glukuronid birimlerine karşı yüksek aktivite göstermesinin ardında yatan sebep bu moleküllerin C6 karboksil grubunun yüksek derecedeki negatif yükü nedeniyle enzimin pozitif yüklü birimleri arasında iyonik etkileşimler oluşturması olduğu düşünülmektedir (Wang and Touster, 1972).

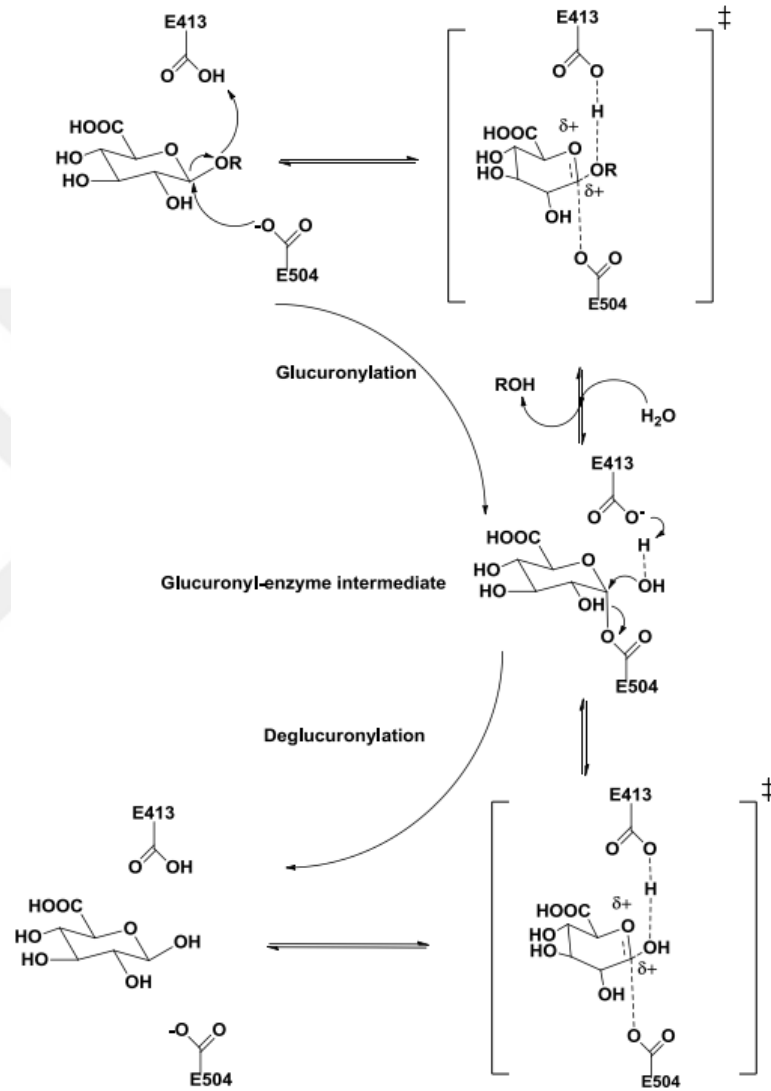
Enzimin C6 karboksil grubuna karşı sahip olduğu spesiflik, enzimi glukuronid türevlerine karşı enzimi daha spesifik hale getirmektedir. Şekil 2.10'da soldaki molekül benziladenin N3-glukuronid (BA3GN) GUS enzimi substratıken bu molekülün karboksil grubunun bir amid grubuyla değiştirilmesiyle elde edilen benziladenin N3-glukuronamid (BA3GNamid), GUS enzimi için artık bir substrat değildir (Okkels et al., 1997).



**Şekil 2.10** GUS'un substratı olan ve olmayan molekül yapısı benzer iki molekül: GUS'un substratı olan ve olmayan molekül yapısı benzer iki molekül. Sağdaki molekül BA3GN GUS için bir substrat iken soldaki bileşen BA3GNamid GUS için bir substrat değildir (Okkels et al., 1997).

### 2.5.1.2. GUS biyokataliz mekanizması

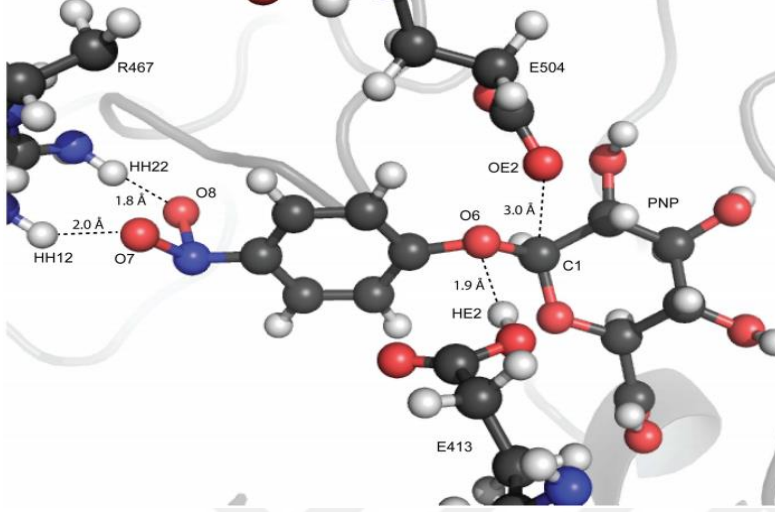
GUS enzimi kovalent bağlı glukuronil-enzim ara ürününün oluşumu ve hidrolizini içeren iki adımlı bir reaksiyon sırasıyla substratları üzerindeki katalitik hidroliz işlemini gerçekleştirir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 Beta-glukuronidazın moleküler çalışma mekanizması (Salleh, et al., 2006; Yang, et al., 2011).

*Escherichia coli* (*E. coli*)'ye ait GUS enzimi, E413 ve E504 olarak adlandırılan iki molekül bölgesi içerir. E 504 katalitik nükleofil, E413 ise asit ya da baz olarak görev alır. Glukuronidasyonun ilk aşamasında, E504 C1 anomerik karbonuyla etkileşir ve bu işlem E413'ün proton donörlüğü (asit davranışı) yardımıyla substratın aglikon parçasının salınımıyla sonuçlanır (Şekil 2.12). Bu

aşamada bir glikozil-enzim ara ürünü oluşur. İkinci aşamada deglukoronilasyon bir su molekülünün bir nükleofil olarak rol oynadığı ve enzim üzerindeki E413 biriminin proton akseptörlüğü (bazik davranış) ile enzim üzerine kovalent bağlı glukoronil biriminin uzaklaştırılmasıyla sonuçlanır. Bu işlem glukuronik asit



**Şekil 2.12** GUS enziminin aktif bölge geometrisi ve katalitik mrekzkerin pNPG substratıyla kurduğu moleküler kontak. Bir önceki bölümde açıklanan GUS biyokataliz mekanizmasının ilk adımında, pNPG ve enzim aktif bölgelerinin (E413, E504) temas anındaki üç boyutlu konfigürasyonu (Grisewood et al., 2013).

salımıyla sonuçlanarak enzimin başlangıçtaki orijinal haline dönmesini ve yeniden katalitik aktivite gösterebilmesini sağlar (Salleh et al., 2006; Yang et al., 2011).

### 2.5.2. Beta-glukuronidaz enzimi için standart aktivite testleri

GUS enzim aktivitesinin optik dedeksiyona dayalı metotlarla belirlenmesi, UPLC (üstün yüksek performans sıvı kromatografisi) gibi pahalı cihaz alt yapısı ve karmaşık analiz yöntemleri gerektirmediğinden, oldukça pratik ve pratik olduğu kadar güvenilir bir yöntem oluşturmaktadır. Bu yöntem özellikle rutin olarak gerçekleştirilen enzim aktivite ölçümlerinde güvenilirliğinden ödün vermeden sunduğu kolaylık nedeniyle tercih edilmektedir. Bu amaçla GUS enziminin aktivite tayinine yönelik bir kromofor ya da floroforun glukuronik asit birimine bağlı olduğu sentetik substratlar tasarlanmıştır. Sentetik substratın GUS enzimi tarafından hidroliziyle oluşan renk ya da floroforun bir UV ya da florofor spektrofotometresi yardımıyla kolaylıkla ölçülebilmektedir. GUS enzimi için

kromojenik substratlar olarak genellikle fenol temelli, suda çözünürlüğü ve ısı stabilitesi yüksek olan spesifik ve farklı renk aralığında karşımıza çıkan çeşitli substratlar geliştirilmiştir (Biggs, 1954; Bowers et al., 1980).

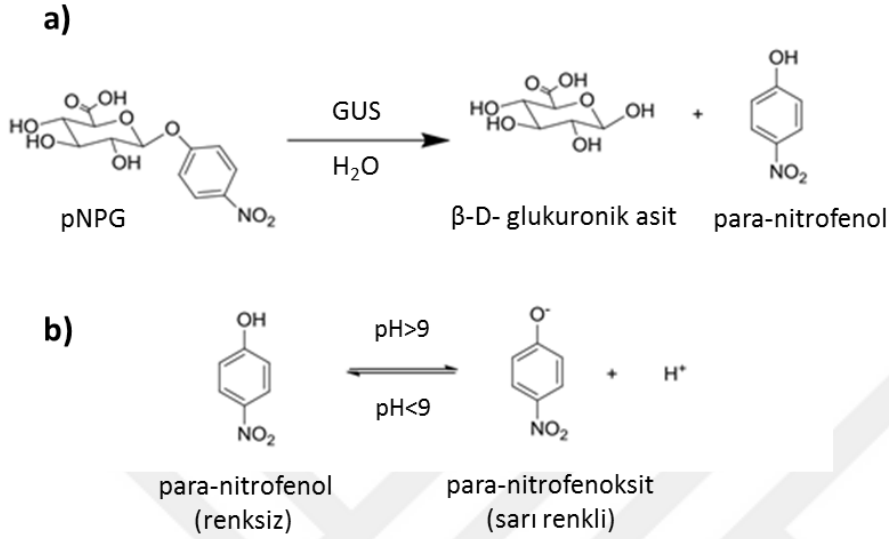
Bu amaçla yaygın şekilde kullanılan kromoforlardan birisi olan para-nitrofenol (pNP) 22 °C de 7.16'lık bir disosiasyon sabitine ( $pK_a$ ) sahiptir. Para-nitrofenol solüsyonu tek başına renksiz iken alkali bir ortam içerisine alındığında bu madde yoğun parlak sarı bir oluşturur. Bu kromofor madde kullanılarak farklı spesifikliklere sahip birçok hidrolitik enzim için UV spektrofotometre temelli aktivite ölçümüne yönelik sentetik substrat tasarlanmıştır (Çizelge 2.1) (Biggs, 1954; Bowers et al., 1980).

**Çizelge 2.1** Aşağıda belirtilen enzimlerle hidroliz edilmeleri sonrası para-nitrofenol açığa çıkaran çeşitli para-nitrofenol işaretli sentetik substratlar (Bowers et al., 1980).

Substrat (4-nitrofenol ile bağlı formda)	Spesifik Enzim ve EC no.
Acetate	Arylesterase, 3.1.1.2
<i>N</i> -Acetyl- $\beta$ -galactos- amide	$\beta$ - <i>N</i> -Acetylglucosaminidase, 3.2.1.53
$\alpha$ -L-Arabinofuranoside	$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase, 3.2.1.55
Butyrate	Cholinesterase, 3.1.1.8
<i>N</i> -Carbobenzoxy-L-tyro- sine	Chymotrypsin, 3.4.21.1
$\alpha$ -L-Fucoside	$\alpha$ -L-Fucosidase, 3.2.1.51
$\alpha$ -D-Galactoside	$\alpha$ -Galactosidase, 3.2.1.22
$\beta$ -D-Galactoside	$\beta$ -Galactosidase, 3.2.1.23
$\alpha$ -D-Glucoside	$\alpha$ -Glucosidase, 3.2.1.20
$\beta$ -D-Glucoside	$\beta$ -Glucosidase, 3.2.1.21
$\beta$ -D-Glucuronide	$\beta$ -Glucuronidase, 3.2.1.31
$\alpha$ -D-Mannoside	$\alpha$ -Mannosidase, 3.2.1.24
$\beta$ -D-Mannoside	$\beta$ -Mannosidase, 3.2.1.25
Laurate	Triacylglycerol lipase, 3.1.1.3
Palmitate	Triacylglycerol lipase, 3.1.1.3
Stearate	Triacylglycerol lipase, 3.1.1.3
Phosphate	Alkaline phosphatase, 3.1.3.1
Phosphate	Acid phosphatase, 3.1.3.2
Phosphocholine	Phospholipase C, 3.1.4.3

İlişkili olduğu pNP koromoforu taşıyan sentetik substratı varlığında belirli bir enzim tarafından üretilen para-nitrofenol (pNP) miktarı bir spektrofotometre yardımıyla 420 nm'de ölçülebilir. Ancak enzim aktivitesinin doğru ölçülebilmesi

için reaksiyon ortamında bulunan para-nitrofenol ürünü, tamamıyla deprotona (proton kaybederek) edilerek para-nitrofenoksit ( $\text{pNP}^-$ ) olarak ortamda bulunmalıdır (Şekil 2.13).



**Şekil 2.13** a) GUS enziminin sentetik substratı olan pNPG varlığında katalizlediği reaksiyon ve b) oluşan para-nitrofenol ürününün ortam pH'nın ( $\text{pH} > 9$ ) yükseltilmesiyle para-nitrofenokside yükseltgenerek renklenmesi reaksiyonu (Bowers et al., 1980).

pNP temelli sentetik substratlarla gerçekleştirilen reaksiyonlar genellikle NaOH,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  v.b. kuvvetli bazlarla durdurularak ortam pH'ı yaklaşık olarak  $\text{pH} > 9.2$  değerinin üzerine çekilir. Böylelikle Şekil 2.13 b'de görülen pNP ve  $\text{pNP}^-$  arasındaki denge reaksiyonu ürün yönünde ilerleyerek ortamdaki pNP molekülünün % 99'unun ölçümlenebilir UV aktif  $\text{pNP}^-$  iyonuna dönüşmesi sağlanır. Aksi durumda yani nötr ya da asidik pH değerlerinde kromojenik substratın sadece küçük bir bölümünün iyonlaşacağı ve absorpsiyon yaratacağı göz önüne alınırsa doğru aktivite ölçümleri için reaksiyon bitiminde ortamın alkali koşullara çekilmesinin önemi anlaşılabilir (Biggs 1954, Bowers, McComb et al. 1980).

### **2.5.3. Beta-glukuronidaz enziminin yaşam bilimlerindeki uygulamaları**

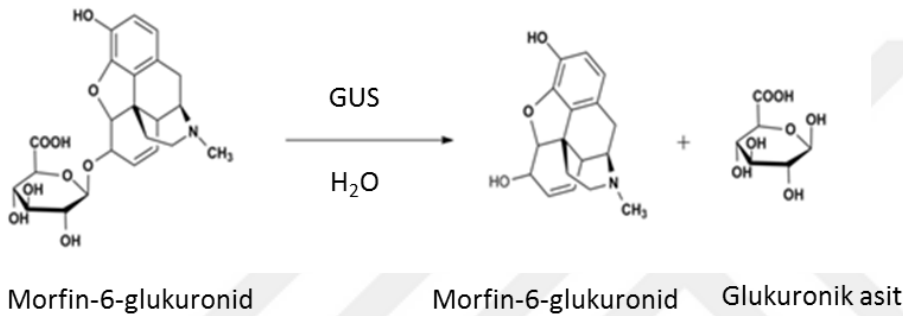
#### **2.5.3.1. Vücut sıvılarındaki ilaç ve ksenobiyotik moleküllerinin analizinde**

GUS *in vitro* ilaç metabolizması çalışmalarının yanı sıra uyuşturucu testi uygulamalarında ve doping araştırmalarında rutin şekilde kullanılan bir enzimdir (Cichna, 2003; Costa et al., 2010; Kamata et al., 2003; Martin et al., 2014; Trontelj, 2012). Beta glukuronidaz ilaç-glukuronid konjugatlarının hidrolitik parçalanmasında aktif şekilde yer aldığından dolayı hidrolaz olarak sınıflandırılan bir enzimdir. Glukuronid konjugat formu birçok organizma tarafından kullanılan ve glukuronidasyon olarak adlandırılan ortak bir metabolik bir işlemdir.

Glukuronidasyon yoğun olarak karaciğerde gerçekleşen ve toksinlerin ilaçların ve diğer ksenobiyotiklerin vücuttan atılmasını sağlayan bir enzimatik işlemdir. Sıklıkla bu işlem sonucunda, ksenobiyotik bileşenin sudaki çözünürlüğü yapıya ilave edilen glukuronik asit ile birlikte ciddi şekilde artar ve organizma böylelikle etkin bir şekilde salgı ya da boşaltım yoluyla bu maddeleri bünyesinden atabilir. Bu sebeple, bir hasta yasal ya da yasal olmayan, kontrole tabi bir bileşeni bünyesine aldığı anda morfin-6-glukuronid gibi glukuronid konjugatları kişinin idrarının yanı sıra kanında da bulunacaktır. Bu durum, ilaç kontrol laboratuvarlarına kontrole tabi olan bu bileşenlerin kan ya da idrardaki varlıklarının araştırılması için rutin tarama işlemleri uygulamalarına fırsat vermektedir (Cichna, 2003; Costa et al., 2010; Kamata et al., 2003; Martin et al., 2014; Trontelj, 2012).

Ancak ksenobiyotiklerdeki glukuronik asit eklentisi, ilgili maddelerin analizini daha karmaşık hale getirmekte, ve doğrudan analizini zorlaştırmaktadır. Dolayısıyla ilaç ya da metabolit bileşenin salınımıyla sonuçlanan konjugat parçalanması genellikle tercih edilen bir işlemdir. Bu konjugatların parçalanabileceği, birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar arasında en temel yöntemler kimyasal ve enzimatik işlemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Enzimatik yöntem genellikle karmaşık biyolojik örneklerin ya da özel olarak belirli bir konjugat için kimyasal yöntemin çoklu yan ürünlerin oluşumuna sebebiyet verdiği durumlarda tercih edilir. Glukuronid ilaç konjugatlarının beta

glukuronidaz enzimiyle parçalanması, genellikle lipofilik yapıda olup sulu ortamda çözünürlüğü zayıf olan ve böylelikle bazı seçici organik çözümlerin yardımıyla bulunduğu matristen kolayca ekstrakte edilebilen asit birimi uzaklaştırılmış yapıca sağlam ksenobiyotiklerin eldesini sağlamaktadır. Bu glukuronid birimi uzaklaştırılmış bileşenler kolaylıkla bir kütle spektroskopisiyle desteklenmiş (LCMS) sıvı kromatografisi analiziyle tespit edilebilmektedir. Şekil 2.14'te morfin-6-glukuronid (M6G) konjugatının parçalanma tepkimesi görülmektedir (Cichna, 2003; Costa et al., 2010; Kamata et al., 2003; Sigma, 2016; Martin et al., 2014; Trontelj, 2012).



Şekil 2.14 GUS aracılıklı morfin-6-glukuronid hidrolizi (Sigma, 2016).

Beta glukuronidase aracılıklı ya da kimyasal dekonjugasyon sonrası örnekler LC-MS analizine girmeden rutin olarak iyon değişim kromatografileri ya da ekstraksiyonla rutin olarak ön işleme tabi tutulmakta ve LC-MS analizleri bu işlemler sonrasında gerçekleştirilmedi.

### **2.5.3.2. Saponin ve flavonoid glukuronidlerin tedavi edici etkisinin yükseltilmesinde**

Beta-glukuronidaz enzimiyle muamele, çeşitli hastalıkları tedavi edici niteliğe sahip bitkisel kaynaklı glukuronid yapıları saponin ve flavonoid moleküllerinin biyoaktivite ve biyoyararlanımının artmasını sağlamaktadır. Söz konusu etki glukuronid yapıları saponin ve flavonoidlerdeki lipofilik molekül iskeletlerine bağlı glukuronik asit birimlerinin beta-glukuronidaz aracılığıyla seçici olarak koparılmasıyla sağlanmaktadır. Bu yolla Soyasaponin Bb ve Aa, glisirik asit gibi saponinlerin yanı sıra baicalin ve wongonosid gibi flavonoidlerin başta anti-kanser olmak üzere çoğu biyolojik aktivitelerinde ve

ilişkili biyoyararlanım değerlerinde iyileştirilme sağlanabilmektedir (Güçlü-Üstündağ and Mazza 2007; Chen et al., 2013; Yu et al., 2013).

## **2.6. Mikroakışkan Sistemler**

### **2.6.1. Mikroakışkan sistemler: temel kavramlar**

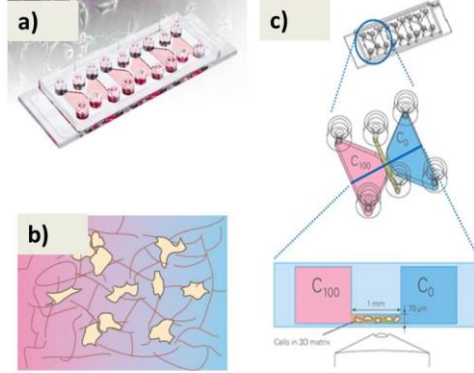
Mikroakışkan sistemler  $\mu\text{L}$  ya da  $\text{nL}$  mertebesindeki akışkanların bir mikrokanal boyunca akışını sağlayan ve amaca göre kontrol edebilen sistemlerdir. Bu sistemlerin  $\mu\text{L}$  ve  $\text{nL}$  miktarlarındaki akışkanları güvenilir ve kontrol edilebilir transfer edebilme kabiliyetleri, yaşam bilimleri alanında yer alan biyoteknolojik işlemlerin yüksek verim ve tekrarlanabilirlikle gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Asanomi et al., 2011; Miyazaki and Maeda, 2006). Mikrokanal sistemleri yüksek yüzey ve arayüzey alanı temini sayesinde ısı ve kütle transferinin büyük-ölçekli sistemlere göre çok daha etkin sağlanması ayrıca işlem için gerekli tepken ya da çözügen hacimlerinin ciddi ölçüde düşürülmesi mümkün kılınmakta ve bunun neticesinde biyoteknolojide yer alan rutin ilaç testleri, enzim aktivite testleri, biyodönüşüm reaksiyonları, biyosensör sistemleri, ekstraksiyon ve benzeri birçok işlemde mikroakışkan sistemler öne çıkmaktadır (Miyazaki and Maeda 2006; Asanomi, et al., 2011; Bolivar et al., 2011).

Mikroakışkan sistemler genel olarak sürekli işletim sistemiyle kullanılabilir. Mikrokanal içerisinde akışkan ve çözünen maddelerin hareketi şırınga pompaları ya da farklı ekipmanlar kullanılarak elektro ozmotik akış yardımıyla yüksek hassasiyetle ( $\text{nL}$  mertebelerinde dahi) sağlanabilmektedir (Asanomi et al., 2011).

### **2.6.2. Mikroakışkanlar ve yaşam bilimleri uygulamaları**

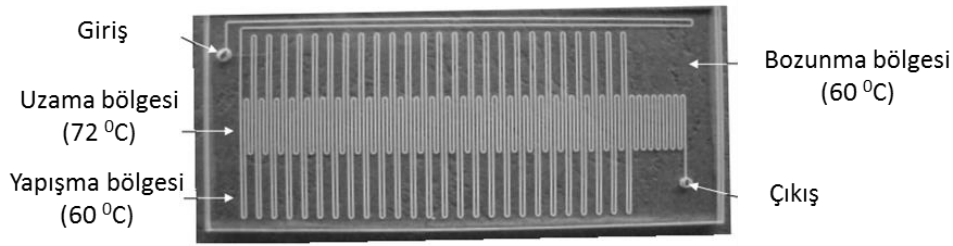
Hücre göçü, hücrelerin bir alandan diğerine kemoatraktan olarak isimlendirilen kimyasal bir sinyal etkisindeki hareketidir. Bu işlem yara iyileşmesi, hücre farklılaşması, embiyonik gelişim ve tümör hücre metastazı olaylarında birincil role sahiptir. Ibidi firmasının geliştirdiği mikroakışkan sistem sayesinde hücre kutuplanması, kemotaksisin moleküler yönleri ve hücre göçü gibi

biyolojik olayları, bu alanda kullanılan geleneksel deney sistemlerine göre daha hızlı ekonomik etkili bir şekilde araştırılabilmektedir (Şekil 2.15) (İbidi, 2016).



**Şekil 2.15** a) İbidi firması tarafından geliştirilen mikroakışkan temelli hücre göçü aparatı b) İmmobilize edilmiş hayvan hücrelerine ait şematik çizim c) Sistemin detaylarına ilişkin şematik çizimler (İbidi, 2016).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi DNA'yı üç farklı sıcaklık adımı içerisinde döngüler yaratarak replike etmek için bir moleküler biyoloji aracı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Günümüzde PCR cihazlarının minyatürize edilmesi için büyük bir çaba harcanmaktadır (Şekil 2.16). Tüm mikroakışkan prensipli PCR teknolojileri mikroakışkan ortamdaki daha küçük termal kapasite ve daha yüksek ısı transfer hızı ile üstün bir DNA amplifikasyon işlemi sunmaktadır (Sun et al., 2008).

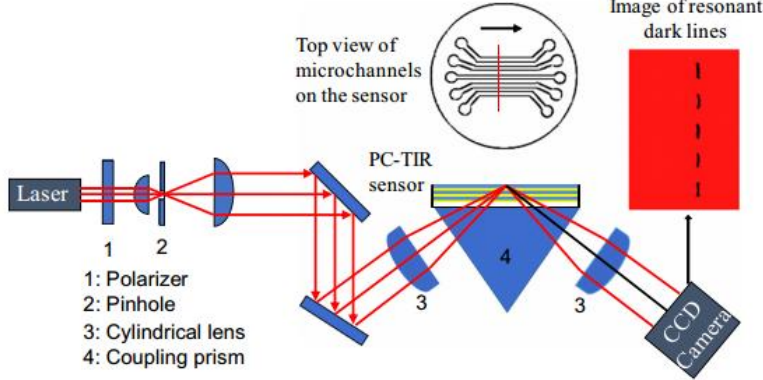


**Şekil 2.16** Bir giriş, bir çıkış, denatürasyon bölgesi, uzama bölgesi, ve annealing bölgesinden oluşan 26 amplifikasyon döngüsü sağlayan mikroçip tasarımı. Sürekli akış PCR mikroçipinin genel boyutları 3 cm x 7 cm'dir. Mikrokanal 200 µm genişlik 250 µm derinlik ve toplamda 41 µl'ye ve 26 PCR döngüsüne denk gelen 166,4 cm'lik toplam uzunluğa sahiptir (Sun et al., 2008).

Cetin et al. (2013) kitosan nanopartiküllerinin klinik ya da endüstriyel uygulamalara yönelik olarak üretimi için bir özel mikroakışkan sistem geliştirmiştir. Tasarlanan sistemle gerçekleştirdikleri kavram kanıtlama çalışmaları sonucunda, klasik üretim yöntemleriyle sentezlenen nanopartiküllerle



sayede ilgili araştırmacılar kalp krizi riski rahatsızlık görülmeden oldukça erken safhada belirlenmesi ve gerekli tedbirlerin alınabilmesi kapsamında gerçekleştirdikleri kavram kanıtlama çalışmasıyla bu alandaki araştırmalara yeni bir pencere açmışlardır (Zhang et al., 2014).



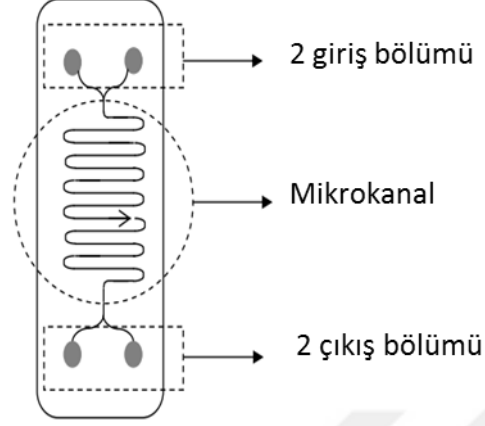
**Şekil 2.18** Zhang et al. (2014) tarafından geliştirilen mikroakış temelli sistemin parçalarının şematik çizimi.

## 2.7. Mikroreaktörler

Bir önceki bölümde bahsedilen uygulamalarına ilave olarak mikroakışkan sistemlerin yaşam bilimlerindeki bir diğeri geniş ve umut verici uygulama alanı mikroreaktörler olarak adlandırılan reaksiyon aparatlarıdır (Şekil 2.19).

Son yıllarda kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonların klasik olarak kesikli işletim moduyla çalışan erlen ya da karıştırmalı tanklarda gerçekleştirilmesi yerine sürekli akış mikroreaktör sistemlerin kullanılması üzerine bir yönelim oluşmuştur. Bu yönelimin ardında yer alan sebep olarak “işlem-yoğunlaştırılması” (process intensification) paradigması yatmaktadır (Bolivar et al., 2011). İşlem yoğunlaştırılması kavramı, Bolivar et al. (2011) tarafından “belirli işlem hedeflerini sağlayarak ya da verim ve seçicilik gibi anahtar kimyasal işlem performanslarında gelişme sunacak şekilde reaktör ölçeğinin ciddi ölçüde düşürülmesi” olarak tanımlanmıştır. Üretim ölçeğinin mikrokanaal yapıları içerisinde birkaç yüz nL ya da  $\mu\text{L}$  gibi oldukça küçük hacimlere düşürülmesi sayesinde sistemde ısı ve kütle transferi etkinliği arttırılabilmekte ve bu sayede mikroreaktör sistemlerinde reaksiyon hızı ve enzimatik proseslerdeki turnover

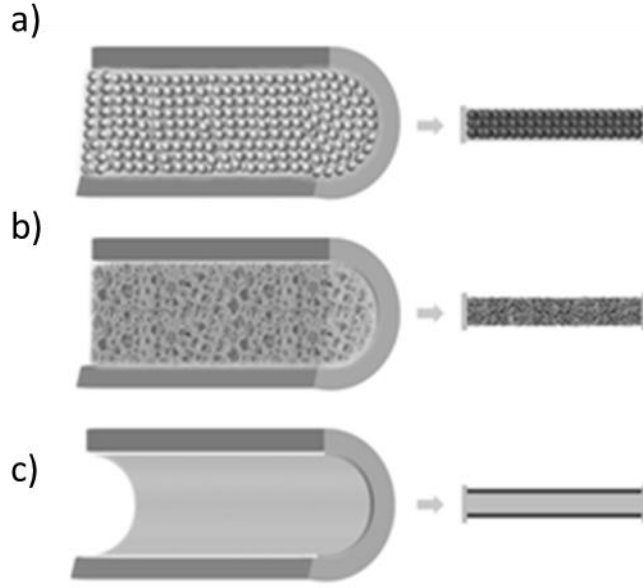
sayısı gibi çıktılar ve de bunun neticesi olan işlem verim ve verimliliği arttırılabilmektedir.



**Şekil 2.19** Bir mikroreaktöre ait şematik çizim (Fernandes, 2010).

Bir mikroreaktör içerisinde kataliz üç farklı yaklaşımla uygulanabilmektedir: a) cihaz içerisine rastlantısal olarak yerleşen ve polimerik ya da inorganik partikül yapısındaki katı-çözünmez bir destek üzerine/yüzeyine bağlanmış katalizörün bulunduğu dolgulu yatak, ii) reaktör içerisinde farklı monomerlerin (bünyesinde katalizörü de içeren) eş zamanlı polimerizasyonundan elde edilen ve düzenli ya da düzensiz mezo, mikro-gözenekli kanal ağlarından oluşan bir yapıyı içeren monolitik (tek materyal kütlesi) sistemler ve c) bir mikroreaktörün iç duvarları üzerinde hareketsizleştirilmiş katalizörün yer aldığı duvarı-kaplanmış sistemler (Şekil 2.20) (Munirathinam et al., 2015).

İşlem yoğunlaştırılması hedefini başarıyla sağlayan mikroreaktör sistemlerinde ilgili işlem için gerekli parametreler optimize edildikten sonra işlemin üretim kapasitesi, reaktör ölçeklerinin büyütülmesi yerine üretimde kullanılan mikroçip sayısının arttırılmasıyla gerçekleştirilen “paralelizasyon” işlemiyle sağlanır (Fernandes, 2010; Bolivar et al., 2011).



**Şekil 2.20** Bir mikroreaktörün sahip olduğu mikrokanalın boyuna kesitinin şematik gösterimi, a) katalizörü destek (immobilizasyon) materyali yüzeyinde taşıyan dolgulu yatak, b) katalizörün destek materyali bünyesinde tutuklandığı monolitik, ve c) katalizörle duvarı-kaplanmış mikroreaktörler (Munirathinam et al., 2015).

Bu tez kapsamında GUS enziminin sırasıyla sentetik ve doğal substratları olan pNPG ve baicalin hidroliziyle ilgili gerçekleştirilen tüm mikroçip denemelerinde monolitik mikroreaktör stratejisi kullanılmıştır. Kullanılan gözenekli silika sol-jel formülasyonu, GUS enzimini mikrokanal içerisinde hapseden, monolitik taşıyıcı materyal olarak işlev görmüştür.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Beta-Glukuronidaz Enziminin Silica Jellere Yüklenmesi

Çizelge 3.1’de verilen bileşenler 2,5 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak TEOS öncülünün su ile hidrolizi sağlanmıştır. Reaksiyon sırasında etanol açığa çıktığından dolayı, hidroliz işlemi ağzı açık bir cam vial içerisinde gerçekleştirilerek, kısmen de olsa etanolün uzaklaştırılması sağlanmıştır.

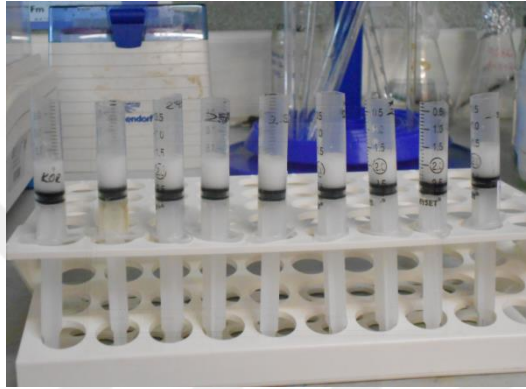
**Çizelge 3.1** TEOS sol çözeltisinin hazırlanması

TEOS	5,58 ml
Ultra saf su	1,9 ml
HCl (% 0,1 v/v)	1 ml
Toplam hacim	8,48 ml

TEOS sol çözeltisi hazırlandıktan sonra, ana enzim stoğundan Na-P (50 mM) tampon çözeltisi içerisinde seyreltilerek hazırlanan 50  $\mu$ L  $\beta$ -glukuronidaz (Sigma G7017, GUS) enzim çözeltisi (5000 ünite(U)/ml); bileşimi Çizelge 3.2’de verilen 200  $\mu$ l polietilen oksit (PEO) çözeltisi ile karıştırılarak enzim içeren PEO çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından 125  $\mu$ L TEOS sol çözeltisi kalıp olarak kullanılan ağız kısmı kesilmiş bir şırınga içerisine alınıp üzerine tampon solüsyon içeren enzim + PEO çözeltisi hızlı bir şekilde eklenerek 2-3 dakika boyunca vorteks cihazıyla karıştırılmıştır (Şekil 22). Karıştırma işlemi sırasında TEOS sol çözeltisi ve enzim + PEO çözeltisi arasındaki pH farkından dolayı hızlı bir şekilde gerçekleşen jelleşmenin tamamlanması için saf TEOS içeren yaşlandırma ortamında 24 saat boyunca +4  $^{\circ}$ C’de tutularak jel yapısının güçlenmesi sağlanmıştır.

**Çizelge 3.2** PEO çözeltisinin bileşimi.

Polietilen oksit (PEO, $M_A$ : 100.000)	0,8 g
APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilane)	60 $\mu$ L
Sodyum fosfat tamponu	10 ml

**Şekil 3.1** Gözenekli yapıya sahip GUS enzimiyle yüklü TEOS-PEO türevli silika monolitler.

### 3.2. Beta-Glukuronidaz Enziminin Karakterizasyonu

İmmobilize GUS enziminin serbest ve immobilize haldeki kinetik çalışmaları yapılmış ayrıca silika jellere yüklenen enzimin farklı işlem koşullarındaki stabilitesi araştırılmıştır.

#### 3.2.1. Enzim kinetiği çalışmaları

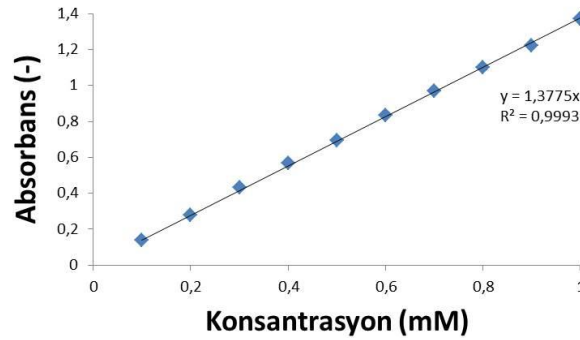
$\beta$ -Glukuronidaz (Sigma G7017, GUS) karakterizasyonu için gerçekleştirilen aktivite ve kinetik çalışmalarında reaksiyon ortamının absorbans verilerine karşılık gelen dönüşüm ürünü derişimlerinin belirlenmesi amacıyla para-nitrofenol (pNP) bileşeni enzimin tampon çözeltisinde çözülerek farklı derişimlerde pNP çözeltileri hazırlanmıştır (0,1 mM, 0,2 mM, 0,3 mM, 0,4 mM, 0,5 mM, 0,6 mM, 0,7 mM, 0,8 mM, 0,9 mM, 1,0 mM). Bu amaçla 1,39 mg pNP tartılıp 10 ml sodyum fosfat tamponu (50 mM, pH 4,5) içerisinde çözülmüştür.

Böylelikle 1 mM stok pNP çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti üzerinden gerekli seyreltmeler yapılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 pNP için kalibrasyon denkleminin belirlenmesi

PNP stok (µl)	Sodyum fosfat tamponu (µL)	PNP standart çözeltisi (mM)
50	450	0,1
100	400	0,2
150	350	0,3
200	300	0,4
250	250	0,5
300	200	0,6
350	150	0,7
400	100	0,8
450	50	0,9
500	—	1

Reaksiyon ortamının 420 nm'deki absorbansına karşılık gelen pNP konsantrasyonunun hesaplanması için Şekil 3.4'de verilen standart eğri ve kalibrasyon denklemi kullanılmıştır. Serbest ve immobilize enzim ve mikroçip sisteminde gerçekleştirilen tüm reaksiyon stabilite çalışmalarında oluşan pNP miktarının belirlenmesi için bu kalibrasyon denkleminin faydalanılmıştır.



Şekil 3.4 pNP için oluşturulan standart eğrisi.

500 µL toplam hacimde hazırlanan farklı konsantrasyondaki pNP çözeltileri üzerine, absorbans okumaları öncesinde, 4500 µL 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1:9 v/v) çözeltisi eklenmiştir. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ilavesinin ardından çözeltilere ait absorbans verileri UV-spektrofotometrede (Amersham Biosciences Ultraspec 1100 pro) 420 nm'de ölçülmüş ve pNP derişimlerine karşılık gelen absorbans verileri için standart eğri oluşturulmuştur.

### 3.2.1.1. Serbest enzim kinetiği

Sıvı formda olan yüksek derişimli (197.000 ünite/ml)  $\beta$ -glukuronidaz (Sigma Aldrich, G7017) ticari enzim solüsyonu, serbest ve immobilize enzim için aktivite ve kinetik çalışmalarında stok solüsyon olarak kullanılmıştır. Konsantre enzim solüsyonu 50 mM sodyum fosfat tamponuyla (pH 4,5) seyreltilerek 500 ünite/ml çalışma derişiminde enzim çözeltisi hazırlanmış ve serbest enzimle ilgili tüm aktivite çalışmalarında bu çözeltiden 500  $\mu$ L (250 ünite enzim) çekilerek reaksiyon ortamına aktarılmıştır. Serbest enzimin  $K_M$  ve  $V_{MAX}$  gibi kinetik parametrelerinin belirlenmesi amacıyla sabit enzim derişimi için farklı substrat konsantrasyonlarına karşılık gelen reaksiyon hızları belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda enzimin sentetik substratı olan 4-nitrofenil  $\beta$ -D-glukuronid (pNPG), sodyum fosfat tamponu içerisinde çözülerek reaksiyon ortamına 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1,0 mM, 2,0 mM, 6,0 mM, 10 mM, 20 mM, ve 40 mM gibi farklı konsantrasyonları sağlayacak şekilde eklenmiştir. Serbest enzimin kinetiğine ilişkin tüm reaksiyonlar pH 4,5 ve 37 °C sıcaklıkta (1000  $\mu$ L reaksiyon hacminde) 30 dk süreyle gerçekleştirilmiştir. Tüm reaksiyonlar 30 dk sonunda reaksiyon karışımı üzerine 9000  $\mu$ L  $Na_2CO_3$  (1:9 v/v) eklenmesiyle sonlandırılmıştır.  $Na_2CO_3$  eklenmesinin ardından reaksiyon ortamlarındaki ürün derişimine karşılık gelen absorbans verileri UV-spektrofotometrede köre karşı 420 nm için okunmuştur. Ölçülen absorbans verilerine karşılık gelen pNP derişimlerinin eldesi için pNP standart eğrisi kullanılmıştır. pNP derişimlerinden enzim aktivitesinin hesaplanması içinse aşağıda yer alan formül kullanılmıştır:

$$Unite/ml = \frac{\mu mol\ PNP \times dilüsyon\ faktörü}{enzim\ hacmi \times reaksiyon\ süresi}$$

$\beta$ -Glukuronidaz aktivitesi ünite/ml olarak belirlenmiştir. Ünite/ml ise pH 4,5 ve 37 °C'da herhangi bir substrat derişiminde 1 ml enzimin dakikada dönüştürdüğü  $\mu$ mol cinsinden substrat miktarı olarak tanımlanmıştır. Enzim için çalışılan substrat derişim aralığına karşılık gelen başlangıç reaksiyon hızları (enzim aktivitesi) grafiği çizilerek Michaelis-Menten grafiği elde edilmiştir.  $K_M$  ve  $V_{MAX}$  değerleri hiperbolik Michaelis-Menten grafiğinden doğru olarak elde edilemediğinden Lineweaver-Burk grafiği çizilerek belirlenmiştir.

### 3.2.1.2. İmmobilize enzim kinetiği

İçerisine  $\beta$ -glukuronidaz enzimi (250 ünite) immobilize edilmiş, monolitik silika jeller 24 saatlik yaşlandırma ortamından alınarak 15 ml'lik falkon tüplerine aktarılmıştır. Falkon tüplerindeki jeller metal bir çubuk yardımıyla parçalanmıştır. Parçalama işlemi TEOS-PEO türevli jellerde immobilize edilen enzimlerin aktivite tayini öncesinde substrat kütle aktarım kısıtlarının azaltılması için uygulanmıştır. Bu sayede enzimdeki aktivite düşüşlerinin temel olarak substrat difüzyon kısıtları yerine yalnızca immobilizasyon işleminden kaynaklandığından emin olunmuştur. Sabit miktarda enzim içeren jeller parçalandıktan sonra üzerine 1000  $\mu$ L hacimde 0.1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,8 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 30 mM pNPG substratı eklenmiştir. İmmobilize enzimin kinetiğine ilişkin tüm reaksiyonlar pH 4,5 ve 37 °C sıcaklıkta (1000  $\mu$ L reaksiyon hacminde) 30 dk süreyle gerçekleştirilmiştir. Parçalanmış jel yapıları, reaksiyon ortamında meydana getirdiği heterojen yapı sebebiyle filtrelendikten sonra reaksiyon ortamına ait absorbans değerleri UV-spektrofotometre ile 420 nm'de köre karşı okunmuştur. Enzim aktiviteleri ünite/ml olarak hesaplanıp Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek immobilize enzimin  $K_m$  ve  $V_{max}$  değerleri belirlenmiştir.

### 3.2.2. Enzim stabilitesi çalışmaları

İmmobilize enzim stabilitelerinin belirlenmesi için herbiri şırınga içerisinde sentezlenen 250 ünite GUS yüklü TEOS-PEO türevli silika monolitler, depolama ortamlarını temsil eden +4 °C sıcaklıktaki Na-P tamponu içerisinde 32 gün ve reaksiyon ortamını temsil eden +37 °C'daki Na-P tamponu içerisinde 3 gün süreyle inkübe edilmişlerdir. Her inkübasyon günü sonunda örneklenen monolitler parçalanıp kütle transfer kısıtları kaldırıldıktan sonra üzerlerine 1 ml, 1 mM pNPG çözeltisi ilave edilerek tüm reaksiyonlar pH 4,5 ve 37 °C sıcaklıkta (1000  $\mu$ L reaksiyon hacminde), 112 rpm çalkalama hızında, 30 dk inkübasyon süresiyle yapılmıştır.

### 3.3. Baicalin/Baicalein UPLC-PDA Analizi

#### 3.3.1. Analiz metodu ve kalibrasyon denklemi

Baicalin ve bu maddenin dönüşüm ürünü olan baicalein'in (aglikon) reaksiyon ortamlarındaki miktar tayinlerinin belirlenmesi için foto-diyot-dizi detektörüyle (PDA) ölçüm yapan ultra yüksek performans sıvı kromatografi (UPLC) sistemi kullanılmıştır. UPLC-PDA analizi PDA dedektör, oto-örnekleyici, kuaternal pompa ve kolon fırınıyla donatılmış Thermo Surveyor Plus UPLC cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kromatografi kolonu olarak ThermoFisher Scientific'den temin edilen Hypersil GOLD C18 kolon (100 mm x 4,6 mm x 5 µm) kullanılmıştır. Mobil faz her ikisi de % 0,1 oranında trifloroasetik asit içeren ultra saf su ve asetonitril çözümlerinin gradientinden oluşturulmuştur. % 15 asetonitril değerine ayarlanmış ve bu değer analizin ilk 2 dakikası süresince sabit tutulmuştur. Sonrasında çözümler gradienti % 60 değerine 8 dk içerisinde ayarlanarak takip eden 1 dk içerisinde tekrar % 15 asetonitril değerine düşürülmüştür. Mobil faz 4 dk boyunca bu değerde (başlangıç gradienti) tutularak kolonun dengeye gelmesi sağlanmıştır. Analizlerde kullanılan dedeksiyon dalga boyu, akış hızı, örnek enjeksiyon hacmi ve kolon sıcaklığı sırasıyla 318 nm, 1 ml/dk, 20 µL ve 30 °C derece değerine ayarlanmıştır. Toplanan örneklerin baicalein derişimi, bu maddenin standart solüsyonlarının (54 - 1,125 ppm arasında 6 nokta ile) UPLC-PDA sistemindeki analizi sonucunda elde edilen pik alanı-derişim verileri üzerinden oluşturulan kalibrasyon denklemi yardımıyla hesaplanmıştır. Tüm verim tahminleri oluşan aglikon miktarı üzerinden bu kalibrasyon denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Çalışma boyunca gerçekleştirilen tüm deneysel analizlerde iki tekrarlı ölçümler yapılmış ve hata değerleri, "ortalamanın standart hatası" (SEM değeri) olarak grafikler üzerinde ifade edilmiştir.

#### 3.3.2. Örnek hazırlama işlemi

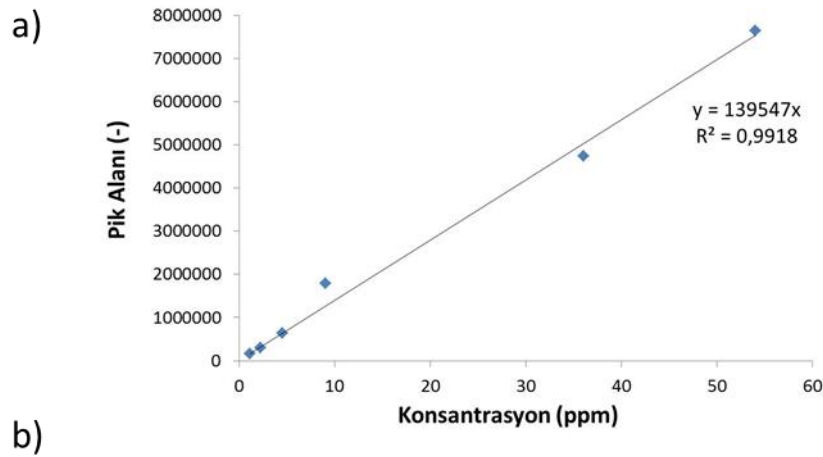
Serbest enzimle gerçekleştirilen baicalin dönüşümlerinde reaksiyon ortamı metanolle (1:5, v/v) seyreltilerek reaksiyon durdurulmuştur. Ardından ortamdaki serbest enzimin çöktürülmesi için 10.000 rpm'de santrifüj yapıp süpernant kısım

alınarak UPLC-PDA sistemine enjekte edilmiştir (Jiang et al., 2007). Analize kadarki süreçte tüm standartlar ve reaksiyon örnekleri -20 °C’da saklanmıştır.

Mikroreaktörden alınan örnekler, 100 °C’de 2 dk tutularak olası enzim sızmalarıyla reaksiyonun devam etmemesi için termal yönden işleme tabi tutulmuştur (Sakurama et al., 2014). Termal muamele sonrası mikroçipten alınan örnekler dönüşüm oranlarının belirlenmesi için UPLC-PDA sistemine enjekte edilmiştir.

### 3.3.3. Dönüşüm veriminin hesaplanması

Baicalein dönüşümüne yönelik gerçekleştirilen tüm asidik, bazik, enzimatik ve mikroreaktör hidrolizi işlemlerinde reaksiyon veriminin belirlenmesinde Şekil 3.5’de verilen kalibrasyon denklemi kullanılmıştır. Toplanan tüm örneklerde, UPLC-PDA sistemiyle belirlenen baicalein sinyali pik alanına karşılık gelen ürün konsantrasyonları, oluşturulan kalibrasyon denklemi aracılığıyla hesaplanmıştır. Baicalein dönüşümüne yönelik tüm denemelerde dönüşüm verimi reaksiyon sitokiyometrisi dikkate alınarak Şekil 3.5 b’deki denklem aracılığıyla hesaplanmıştır.



$$\text{Dönüşüm oranı (\%)} : \frac{\text{üretilen baicalein (mol)}}{\text{baicalin (mol)}} \times 100$$

**Şekil 3.5** (a) Baicalein (aglikon) üzerinden kurulan standart eğrisi. Tüm denemeler iki tekrarlı yapılmıştır. Hata çubukları grafikteki veri noktaları tarafından gizlenmiştir. (b) dönüşüm verimi hesabında kullanılan formül.

### 3.4. Baicalin hidrolizi

#### 3.4.1. Asidik ve bazik hidroliz

Baicalin'in asit katalizi amacıyla 2 mg baicalin, 10 ml metanol içerisinde çözüldükten sonra 10 ml % 10 HCl (suda) içeren ortamda 4 saat süresince hidrolize bırakılmıştır. Reaksiyon sonunda örnekler soğutulduktan sonra % 5 NaOH (suda) ile nötralize edilmiş örneklerin etilasetat ile partisyonu yapılarak reaksiyon ürünlerinin organik faza aktarılması sağlanmıştır. Elde edilen etil asetat partiyonları rotary evaporatörde uçurulmasıyla elde edilen kuru madde uygun oranda metanol ile çözümlenip UPLC-PDA sistemine enjekte edilmiştir.

Bazik hidroliz işlemi için 2 mg baicalin 4 ml metanol ve 40 ml % 5 NaOH (suda) içeren ortamda çözümlenerek kaynama sıcaklığında 4 saat hidrolize bırakılmıştır. Reaksiyon sonrasında örnekler soğutulduktan sonra % 5 HCl (suda) ile nötralize edilmiş ve etil asetat ile partisyonu yapılarak reaksiyon ürünlerinin organik faza geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen etil asetat partiyonları rotary evaporatörde uçurulmasıyla elde edilen kuru madde uygun oranda metanol ile çözümlenip UPLC-PDA sistemine enjekte edilmiştir.

#### 3.4.2. Baicalin'in serbest enzim ile hidrolizi

##### 3.4.2.1. Tampon ortamının DMF ile modifiye edilmesi

Sentetik substratın katalizinde kullanılan Na-P tamponu baicalin biyokatalizi için modifiye edilmiştir. 50 mM Na-P tamponuna sodyum sülfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) % 0,1 (v/w) ve dimetil sülfoksit (DMF) % 5 (v/v) oranında ilave edilmiş değişen tampon ortamı asitliği dönüşüm için optimum olan pH 4,5 değerine (1 M HCl ya da 1 M NaOH kullanılarak) getirilmiştir. İlave edilen  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  antioksidan olarak reaksiyon ortamında baicalin'in bozunmasının önlenmesi için, DMF ise hem baicalin'in hem de özellikle reaksiyon ürünü olarak açığa çıkan yoğun hidrofobik karakterli baicalin'in (aglikon) sulu tampondaki çözünürlüğünün artırılması amacıyla kullanılmıştır (Cayman, 2016; Li et al., 2009; Song et al., 2014). Modifiye tampon içerisinde hazırlanan 60 ppm baicalin, serbest enzimle hidroliz çalışmaları ve mikroçipteki tüm biyokataliz denemelerinde başlangıç substrat derişimi olarak kullanılmıştır.

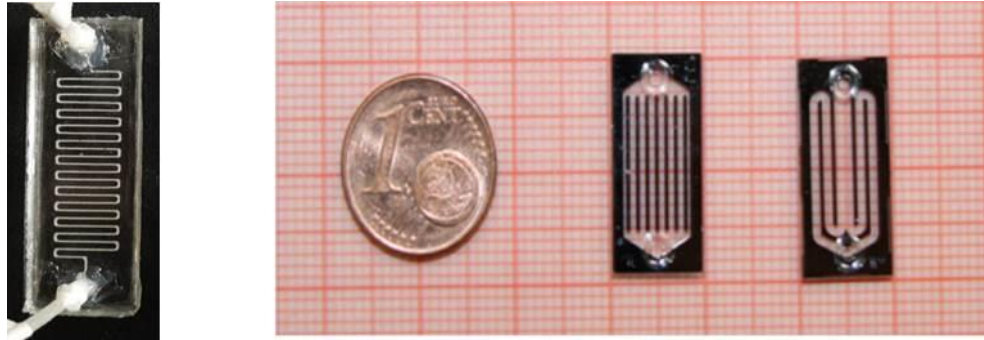
### 3.4.2.2. Serbest enzimatik hidroliz

Baicalin'in serbest enzim hidrolizi için modifiye tampon ortamı içerisinde 60 ppm baicalin substratı, 250 ünite serbest GUS enzimi ile 37 °C'da, 112 rpm çalkalama hızındaki su banyosu içerisinde inkübe edilmiştir. Reaksiyon, 24 h süresince belirli aralıklarla örnek alınarak UPLC-PDA sistemiyle takip edilmiştir. Dönüşüm verimi oluşan aglikona ait oluşturulan kalibrasyon denklemi üzerinden belirlenmiştir.

### 3.4.3. Mikroçip hidrolizi

#### 3.4.3.1. Mikroreaktörlere silika jel yüklenmesi

İçerisinde toplamda 250 ünite GUS enzimi içerecek şekilde hacimsel ölçüğü yüklemeye yapılacak mikroreaktör tipine göre ayarlanan silika TEOS-PEO jel materyali bir şırınga yardımıyla hızla manuel olarak üç farklı mikroreaktöre yüklenmiş ve jelleşmenin 1-2 dk içerisinde bu sistemlerin mikrokanalları içerisinde gerçekleşmesi sağlanmıştır (Şekil 3.6). Tüm mikroçip sistemleri mikrokanalları içerisindeki toplam 250 ünite enzim içeren jel materyali +4 °C'da 24 h yaşlandırıldıktan sonra kataliz için kullanılmıştır.



**Şekil 3.6** Biyokataliz işlemlerinde kullanılan üç farklı mikroreaktör tasarımı: PDMS mikroreaktör (500 µm x 500 µm x 400 mm, 100 µL), cam-silikon-cam Tip-I (sekiz kanallı: 0,6 x 0,4 x 12 mm, 37,5 µL) ve cam-silikon-cam Tip-II (iki kanallı: 0,9 x 0,4 x 36 mm, 37,5 µL) mikroreaktör sistemleri.

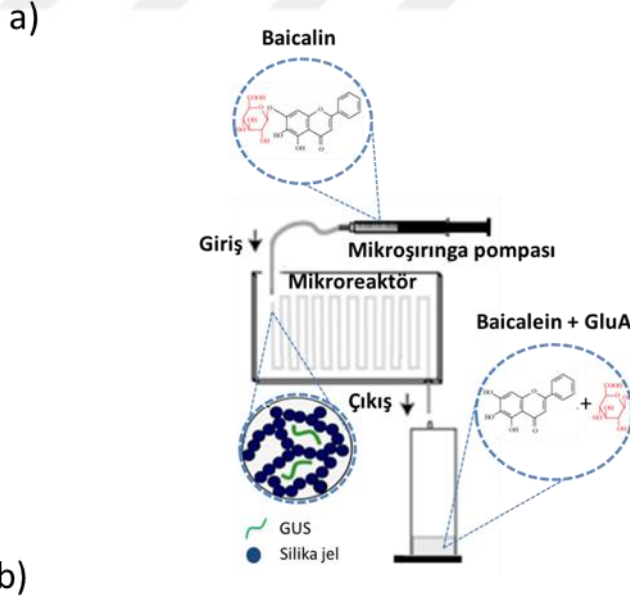
#### 3.4.3.2. Mikroçip sisteminin çalıştırılması

Kanalları yüklenmiş pNPG mikroreaktörler silikon bağlantı elemanları yardımıyla bir mikropompaya bağlanarak, 1mM pNPG solüsyonu farklı akış hızları (1 µL/min, 3,33 µL/min, 5 µL/min, 10 µL/min) ile mikrokanal içerisine

gönderilerek reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Dönüşüm oranlarının belirlenmesi için mikroçip sistemlerinden çalışma süreleri boyunca belirli aralıklarla çıkış akımları toplanmıştır. Toplanan çıkış akımlarının 100 µL alınarak üzerine 900 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenmesinin ardından UV spektrofotometre analizi yapılmış ve pNP kalibrasyon denklemi kullanılarak oluşan pNP mol miktarı belirlenmiştir. Mikroçiplerde pNPG dönüşüm oranı ise aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır:

$$\text{Dönüşüm oranı (\%)} = \frac{\text{Oluşan PNP (mol)}}{\text{Başlangıç pNP-GlcA(mol)}}$$

Baicalin biyokatalizi için bir önceki bölümde açıklandığı gibi modifiye Na-P tamponu içerisinde hazırlanan 60 ppm baicalin çözeltisi şırınga pompası yardımıyla mikrokanalları yüklenmiş üç farklı mikrosistem içerisine 1µL/min akış hızında beslenmiştir. Belirli zaman aralıklarıyla örnek alınmış ve toplanan örnekler offline olarak UPLC-PDA sistemi ile analiz edilmiştir. Analizlenen örneklerdeki nispi dönüşüm oranları reaksiyon sitokiyometrisi dikkate alınarak, aşağıdaki formül aracılığıyla hesaplanmıştır:



$$\text{Dönüşüm oranı (\%)} : \frac{\text{üretilen baicalein (mol)}}{\text{baicalin (mol)}} \times 100$$

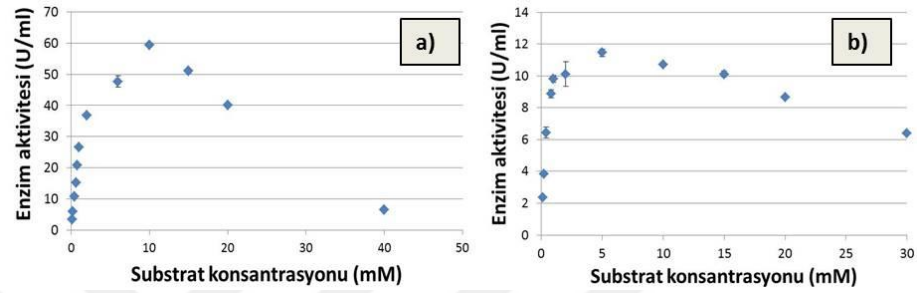
**Şekil 3.7** a) Beta-glukuronidaz aracılıklı baicalin hidroliziyle baicalein üretimi için geliştirilen özgün mikroakışkan sistem düzeneğinin şematik çizimi b) yüzde baicalein dönüşüm hesabında kullanılan denklem.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Beta-Glukuronidaz Enziminin Karakterizasyonu

#### 4.1.1. Enzim kinetiği çalışmaları

Hem serbest hem de immobilize enzimin kinetik çalışmalarında sırasıyla reaksiyon solüsyonlarına ve silika monolitlere eşit miktarda 250 ünite GUS enzimin eklenerek sonuçlar karşılaştırılmış böylelikle immobilizasyon işleminin



Şekil 4.1 Serbest ve silika jel içerisinde immobilize edilmiş GUS enzimi için Michaelis-Menten grafiği.

enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Serbest ve immobilize enzimlerle gerçekleştirilen kinetik çalışmalar sonucunda elde edilen Michaelis-Menten grafikleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Michaelis-Menten eğrisi hiperbolik bir eğri olduğundan immobilizasyon işleminin enzim üzerindeki etkisini gösteren  $K_M$  ve  $V_{MAX}$  değerlerinin tespiti için güvenilir sonuçlar vermemektedir. Bu sebeple Lineweaver-Burk lineerleştirme denklemi kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiştir. Serbest ve immobilize enzim için  $K_M$  ve  $V_{MAX}$  değerleri, ilgili Lineweaver-Burk grafikleri üzerindeki veri setinin regresyon analizi aracılığıyla belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Kinetik çalışmalarda serbest enzimin gösterdiği maksimum aktivite % 100 olarak kabul edilerek referans nokta olarak alınmış ve immobilize enzimin maksimum aktivitesi bu noktaya göre nispi olarak ifade edilmiştir. İmmobilizasyon işlemi sonrasında nispi enzim aktivitesi % 21 olarak tespit edilmiştir (Sheldon and van, Pelt 2013).

Çizelge 4.1 Serbest ve immobilize enzim için  $K_M$  ve  $V_{MAX}$  değerleri.

Enzim Formu	$K_M$ (mM)	$V_{MAX}$ ( $\mu\text{mol} / \text{ml dk}$ )	Nispi aktivite (%)
Serbest $\beta$ -glukuronidaz (250 U)	1,57	56,82	100
İmmobilize $\beta$ -glukuronidaz (250 U)	0,40	11,88	21

Enzim aktivitesinde gözlenen düşümenin sebeplerinden biri olarak, silika jellere yüklenen enzimlerin bir kısmında immobilizasyon nedeniyle aktif bölgenin bloke olması düşünülebilir. Bunun yanı sıra, jel matrisindeki elektrostatik ve sterik etkiler enzim fonksiyonunu etkileyebilen kısıtlardandır.

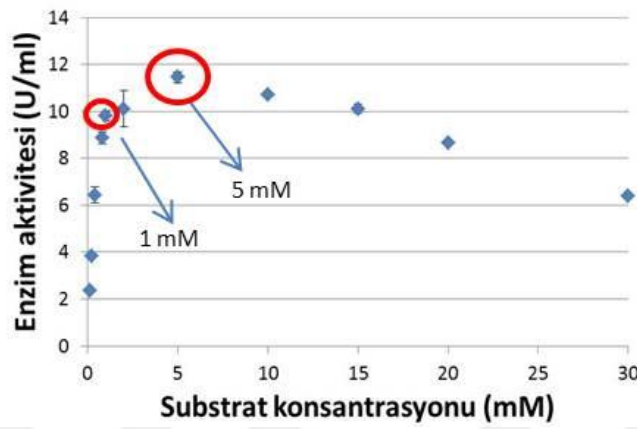
Enzim için immobilizasyon işlemi sonrasında  $K_M$  değerinin artması beklenen bir durumdur ancak bu çalışmada immobilizasyon sonrası  $K_M$  değeri düşmüştür (Çizelge 4.1). Serbest enzim kinetiğiyle kıyaslandığında daha düşük  $K_M$  değeri, enkapsüle edilmiş koşullarda enzimin daha yüksek substrat afinitesine sahip olduğunu göstermektedir. Beklenenin aksi yönde gerçekleşen bu durum literatürdeki çeşitli çalışmalarda da benzer şekilde rapor edilmiştir. Lai et al (2010) iki farklı silika/polipeptit türevli jel matrisi içerisinde immobilize ettiği papain enzimi için  $K_M$  değerlerinin serbest haldeki papain enzimi için belirledikleri değerin yarısı olduğunu rapor etmiştir. Literatürde benzer durumun görüldüğü diğer çalışmalarda da, jel materyalinin mikroyapı ve kimyasal özelliğinin substratın kütle transfer yeteneğini, substratın enzime erişimini, substrat ile enzim arasındaki afiniteyi etkileyebildiği böylelikle  $K_M$  ve  $V_{MAX}$  değerlerini beklenenin aksi yönde değiştirebileceklerini ifade edilmektedir (Bhatia et al., 2000; Chen et al., 2009; Miller et al., 2006; Lai, et al., 2010).

#### 4.1.2. Uygun pNPG substrat derişiminin belirlenmesi

Silika jellere yüklenen beta-glukuronidaz enziminin depolama ve reaksiyon sıcaklıklarındaki stabilitesinin ayrıca mikroçip ortamında değişen substrat akış hızlarında dönüşüm oranlarının belirlenmesi çalışmalarında kullanılacak sabit pNPG derişiminin belirlenmesi amacıyla immobilize enzimin kinetik grafiğinden faydalanılmıştır.

Michaelis–Menten kinetiğine göre,  $K_M$  değeri, enzimi max reaksiyon hızının yarısına ulaştırın substrat derişimidir. Bu kinetik sabit, enzimin doğal ya da sentetik substratını etkin kullanıp kullanmadığını belirlemektedir. Uygulama açısından  $K_M$  bir enzimatik assay'de kullanılabilir uygun substrat derişimi aralığını ifade etmektedir. Tepkime ilerledikçe substrat, enzim tarafından parçalanmakta ve  $[S]$  azalmaktadır. Bu düşüş eğer başlangıç substrat derişimi

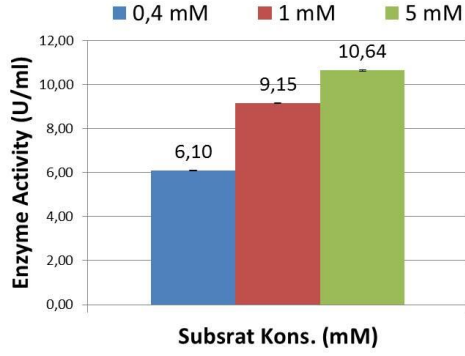
doğru seçilmezse assay'ın lineerliğini bozabilir. Tepkime başlangıcında  $[S]$  eğer  $[S] \ll K_M$  seçilirse enzim aktivitesi tepkime süresince azalan  $[S]$  nedeniyle sürekli olarak düşecektir. Dolayısıyla assay için söz konusu çalışılacak enzimin kinetik grafiğine bakılarak  $K_M$  değerinin belirlenmesi ve assay için  $[S] \gg K_M$  koşulunun temin edilmesi assay süresince enzimin, maksimum aktivite yani  $V_{MAX}$  değerinde tutulması açısından büyük önem arz etmektedir. Literatürde enzimatik assay'lerde substrat kısıtı yaşanmaması için substrat derişiminin 2-3  $K_M$  değerinde olması gerektiği belirtilmektedir (Biosciences, 2016).



Şekil 4.2 Silika jellere immobilize edilen GUS enziminin Michaelis-Menten grafiği.

Tüm bu bilgiler ışığında TEOS-PEO matrisi içerisinde immobilize edilen 250 U GUS enzime ait kinetik grafiğe bakıldığında enzimin 5 mM ( $V_{MAX}$ ) derişiminde substratına doydugu ve bu derişimin üzerinde substrat inhibisyonun gerçekleştiği açıkça görülmektedir. Bu koşullarda immobilize enzim için  $K_M$  değerine karşılık gelen substrat derişiminin 0,4 mM olduğu görülmektedir (Şekil 4.2).

Mikroçip dışındaki enzim stabilitesi ve mikroçip ortamındaki pNPG katalizlerinde substrat kısıtı oluşturmaktan kullanılabilir aday substrat derişimi olarak 0,4 mM ( $K_M$ ), 1 mM ( $2,5 K_M$ ) ve 5 mM ( $V_{MAX}$ ) olmak üzere 3 farklı derişim belirlenmiş ve bu değerlerde silika disk monolitler içerisindeki GUS aktivitesi belirlenmiştir (Şekil 4.3).



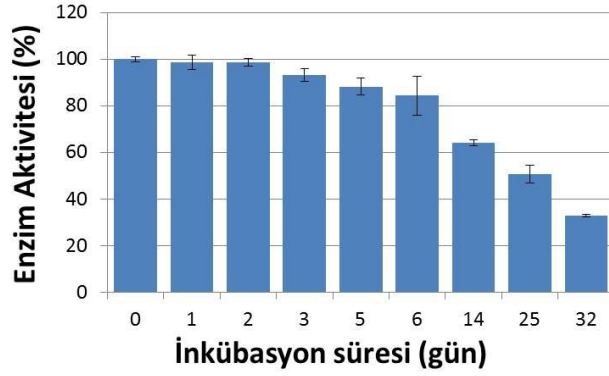
Şekil 4.3 Uygun pNPG substrat derişiminin belirlenmesi.

Grafikteki verilerden görüldüğü üzere 1 mM ( $2,5 K_M$ ) ve 5 mM ( $V_{MAX}$ ) pNPG derişimlerinde enzimin çalışma hızının birbirine oldukça yakın olduğu görülmüştür. Dolayısıyla 1 mM değerinin assay süresince silika jel içerisindeki enzim aktivitesinde kısıt yaratmadığı tespit edilmiştir. Bu veriler 1 mM değerinin mikroçip denemeleri için benzer şekilde substrat kısıtı yaratmayacak bir seviye olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla pNPG ile gerçekleştirilen immobilize enzimin stabilite testleri ve uygun akış hızının belirlenmesi için tasarlanan mikroçip katalizi denemelerinde 1 mM ( $2,5 K_M$ ) pNPG substrat değeri kullanılmıştır.

### 4.1.3. Enzim stabilitesi

#### 4.1.3.1. Depolama koşullarında (+4 °C) enzim stabilitesi

Depolama sıcaklığında katalitik çiplerin aktivitelerini koruyabilmesi, bu çiplerin sürekli kataliz dışında depolanarak saklanabilmesi ve ihtiyaç durumunda kullanılabilmesi, bir kez kullanımları sonrasında yıkanıp reaksiyon içeriği temizlenerek stabil kaldıkları koşullarda saklanabilmesini mümkün kılabilir. Bu nedenle silika monolitlerin depolama koşullarındaki stabilitesi araştırılmıştır. Depolama koşulu olarak şırınga monolitleri +4 °C'da Na-P tamponu içerisinde saklanmıştır ve ilgili günlerdeki aktivite değerleri 1 mM pNPG'e karşı ölçülmüştür. Çiplerin depolanabilmesi ve tekrar kullanımı uzun bir periyodu kapsayacağından +4 °C'daki stabilite çalışmaları 32 gün boyunca sürdürülmüştür.



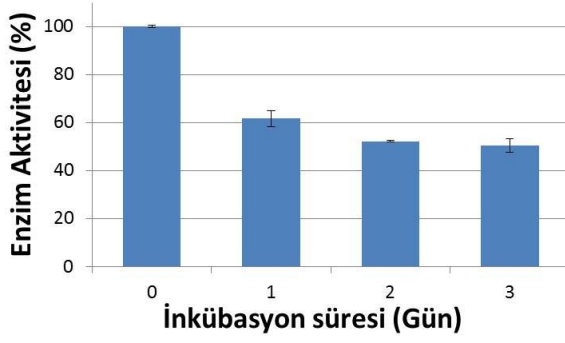
**Şekil 4.4** Silika jellerde immobilize edilmiş GUS + 4°C derecedeki stabilitesi.

Silika disk monolitlerdeki enzim +4 °C’da tampon içerisinde stabil olduğu tespit edilmiştir. Üretimi sonrasında depolanan monolitlerdeki enzim 2 gün süresince aktivitesini neredeyse % 100 oranında korumaktadır. Ayrıca 6 günde nispi enzim aktivitesi % 83’e, 8. günde ise % 76’ya düşmektedir. 14 günde ise % 64’lük nispi aktiviteyle depolama sürecinde immobilize enzim aktivitesinin önemli bir bölümünü korumaktadır (Şekil 4.4).

Bu durum immobilize enzimin depolama koşullarında aktivitesini koruması sayesinde katalitik mikroçiplerin üretilip ihtiyaç duyuluncaya kadar saklanması veya kullanımları sonrası kanaldaki bir önceki reaksiyon ortamının temizlenerek söz konusu çiplerin depolanması ve tekrar kullanılabilmesinin de önünü açmaktadır.

#### **4.1.3.2. Reaksiyon koşullarında (+37 °C) enzim stabilitesi**

Şırınga içerisinde sentezlenen GUS enzim yüklü silika monolitlerinin +37 °C’daki stabilitesi Şekil 4.5’de görülmektedir. İlk günün sonunda jel içerisindeki enzim yaklaşık % 40’lık ciddi bir aktivite düşüşü yaşamaktadır. Sonraki iki günde ise enzimin daha stabil olduğu görülmüştür.



Şekil 4.5 Silika jellere yüklenmiş GUS enziminin +37 °C'daki stabilitesi.

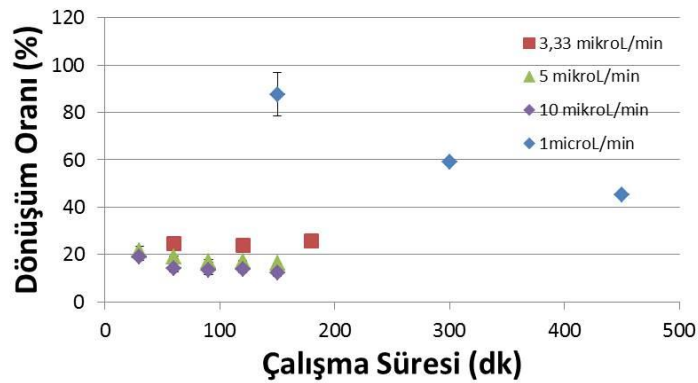
Bu bilgiler ışığında söz konusu silika jel formülasyonu ile yüklenmiş bir mikroçip sisteminde 24 saate yaklaşan çalışma sürelerinde kanal içerisindeki enzim aktivitesi kaybına bağlı olarak dönüşüm veriminde düşüş görüleceği öngörülebilir.

#### 4.2. Mikroreaktör Sisteminde pNPG için Enzimatik Kataliz

Farklı akış hızlarıyla (1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 3,33  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) model substrat olan pNPG beslemesi yapılan PDMS mikroçip sistemlerinde birbirinden oldukça farklı dönüşüm verimleri belirlenmiştir. Besleme hızının artmasına bağlı olarak mikroçip sistemlerinden elde edilen dönüşüm verimlerinde düşüş yaşandığı görülmüştür (Şekil 4.6). Bu durum substrat akımı için akış hızının artırılması durumunda besleme akımının mikrokanal içerisinde kalış süresi azalması ve dolayısıyla kanal içerisindeki porlarda yer alan enzimle temas şansının düşmesinden kaynaklanmaktadır. 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 3,33  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  akış hızında yapılan beslemeler için, substrat akımının mikrokanal içerisindeki kalış süresi sırasıyla 100 dk, 30 dk, 20 dk ve 10 dk olarak hesaplanmıştır. Bu akış hızlarına karşılık gelen ortalama dönüşüm oranları ise sırasıyla % 63, % 25, % 18 ve % 15 olarak belirlenmiştir. Bu değerler farklı akış hızlarında ölçümlenen örneklerden elde edilen verimlerin kendi içerisinde ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Tüm farklı sabit akış hızı denemesinde mikroçip sisteminin çalışma süresine bağlı olarak dönüşüm verimlerinin azaldığı tespit edilmiştir. Sabit hızla substrat beslemesi yapılmasına karşın mikroçip sistemlerindeki sentetik substrata ait

dönüşüm verimlerinin azalması, zamana bağlı olarak mikrokanal içerisindeki enzim aktivitesi kaybından kaynaklanmaktadır. Aktivite kaybının muhtemel sebeplerinden biri olarak ise mikrokanal içerisindeki sürekli akışa bağlı olarak silika jel materyalinin geniş gözeneklerinde yer alan enzimin jel materyalinden sızarak mikrokanal sistemini terk etmesi olayı düşünülmektedir. Enzim aktivitesi düşüşüne muhtemel bir başka sebep olarak mikrokanal içerisindeki enzimin reaksiyon sıcaklığına bağlı olarak denatürasyonu gösterilebilir. Özellikle en yüksek dönüşüm oranlarının elde edildiği 1  $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızıyla mikroçip sisteminden çalışma süresine bağlı olarak elde edilen dönüşüm verimindeki düşüş (% 84 den % 42'ye) için, şırınga içerisinde sentezlenen GUS yüklü silika jel monolitlerinin reaksiyon koşullarında 24 h'lik inkübasyonu sonunda % 40 oranında aktivite kaybı görüldüğü göz önüne alınarak (Şekil 4.5) sıcaklığa bağlı enzim denatürasyonunun, çalışma süresinin 8. saatinde görülen dönüşüm verimi düşüşünde rol oynadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.6 PDMS Mikroçip sistemi içerisinde farklı akış hızlarında pNPG katalizi.

Yüksek akış hızlarında (3,33  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) yapılan denemelerde birbirine yakın olan düşük dönüşüm verimlerinin görüldüğü ve bu verim değerlerinin birbirine olan yakınlığının söz konusu akış hızlarındaki kalış sürelerinin birbirine yakın olmasıyla yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

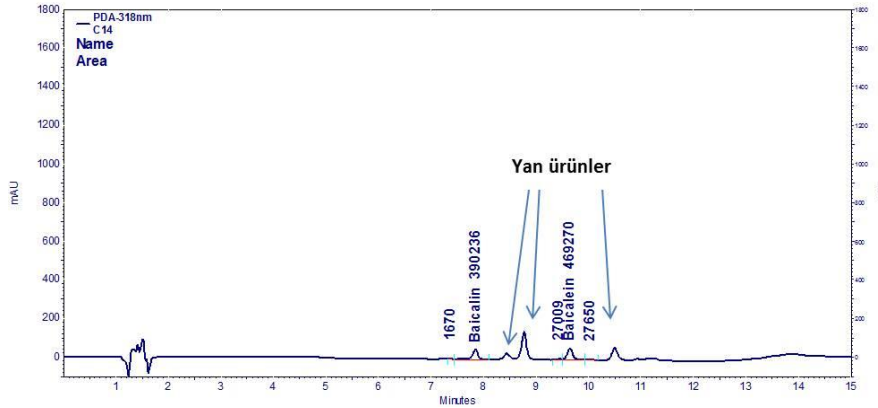
Sonuç olarak, model substrat pNPG ile PDMS mikroçiplerde elde edilen tüm bu verilerden hareketle yüksek verimle dönüşümü hedeflenen, ağırlıklı olarak yüksek ticari ve farmakolojik öneme sahip baicalin katalizi denemelerinde optimum akış hızının, en yüksek dönüşüm veriminin elde edildiği 1  $\mu\text{L}/\text{dk}$  olduğu belirlenmiştir.

### 4.3. Baicalin Hidrolizi

#### 4.3.1. Baicalin kimyasal hidroliz

##### 4.3.1.1. Asidik hidroliz

Baicalin'in 4 saatlik kaynama sıcaklığında reflux işlemine bırakılmasıyla gerçekleştirilen asidik hidroliz işlemi sonunda örneklenen reaksiyon ortamının UPLC-PDA sistemiyle analizi sonucu elde edilen reaksiyon ortam bileşimi Şekil 4.7'de görülmektedir. Reaksiyon sonunda ortamdaki baicalin ve baicalein sinyallerinin yaklaşık olarak birbirine yakın oranlarda olduğu görülmüştür. Bu durum reaksiyonun tamamlanmadığını göstermektedir. Buna ilave olarak bu maddelerin dışında yoğun şekilde yan ürün oluşumu gözlenmiştir. Bu durumun literatürde yer alan asidik hidroliz verileriyle uyum göstermektedir (Jiang, Zhang et al. 2007). Reaksiyon sonunda baicalin dönüşümünün baicalein oluşumu yönünde yaklaşık % 10 verimle gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca başlangıç maddesinin tamamen dönüştürülemediği ve dönüşen maddenin de büyük ölçüde hedeflenmeyen yan ürünler oluşturduğu tespit edilmiştir.

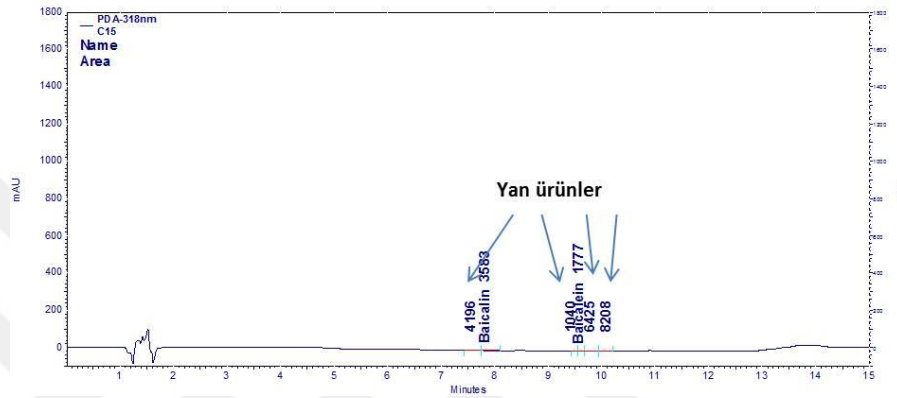


Şekil 4.7 Baicalin'in asit hidrolizi sonunda örneklenen reaksiyon ortamı kompozisyonunu gösteren kromatogram.

##### 4.3.1.2. Bazik hidroliz

Baicalin'in 4 saatlik kaynama sıcaklığında reflux'a bırakılmasıyla gerçekleştirilen bazik hidroliz işlemi sonunda örneklenen reaksiyon ortamının UPLC-PDA sistemiyle analizi sonucu elde edilen reaksiyon ortamı kompozisyonu Şekil 4.8'de görülmektedir. Baicalin'in kalibrasyon denklemi yardımıyla analizlenen pik alanları üzerinden işlem verimi belirlendiğinde dönüşümün baicalein oluşumu yönünden % 1'in altında olduğu tespit edilmiştir. Benzer

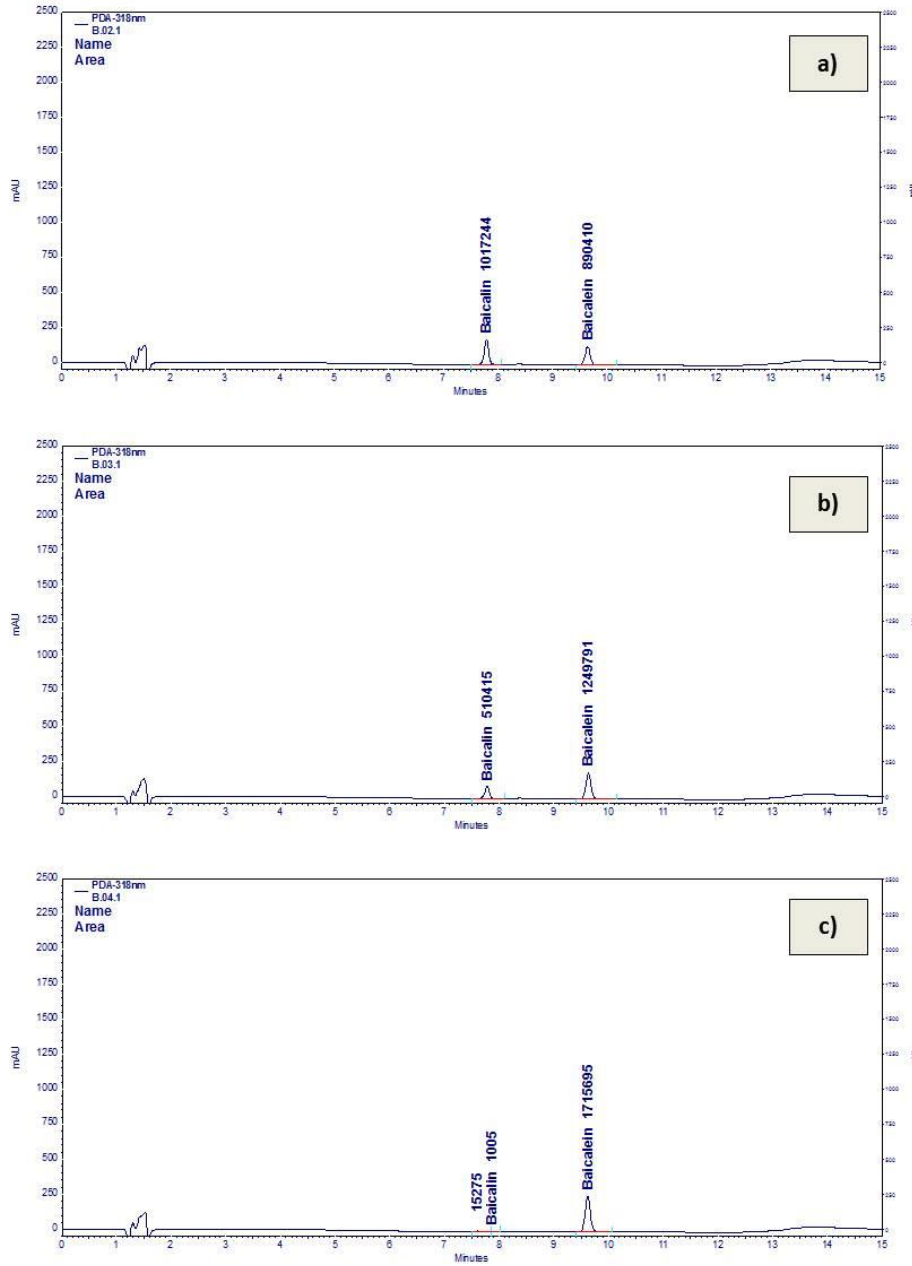
şekilde yoğun şekilde yan ürün oluşumu görülmüştür. Bazik hidroliz sonucunda baicalin moleküllerinin baicalein'e dönüştürülemediği görülmüştür (Şekil 4.8). Paylaşılan sonuçlar, literatürdeki bilgilerle uyumlu bir şekilde, asidik hidrolizin bazik hidrolize kıyasla kendi içinde daha başarılı sonuç verdiğini gösterse de, her iki kimyasal hidroliz yönteminin de yoğun bir yan ürün oluşumuna dolayısıyla baicalein üretimine yönelik düşük işlem verimlerine sebep olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.8 Baicalin'in bazik hidrolizi sonunda örneklenen reaksiyon ortamı kompozisyonunu gösteren kromatogram.

### 4.3.2. Baicalin enzimatik hidroliz

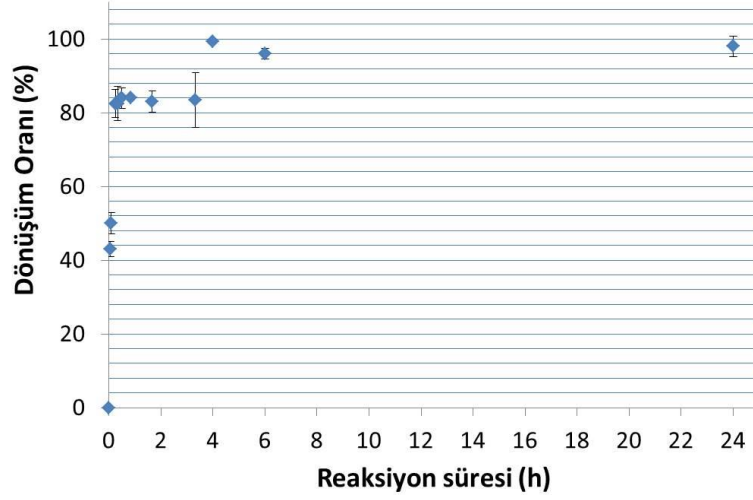
Şekil 4.9'da yer alan ve serbest enzim reaksiyonunun ilk 20 dakikasını içeren kromatogramlar incelendiğinde enzimatik reaksiyon sonucu reaksiyon ortamında inkübasyon süresine bağlı olarak kısa süre içerisinde başlangıç maddesi baicalin sinyalinin azalarak dönüşüm ürünü olan baicalein (aglikon) sinyalinin arttığını göstermektedir. Bu iki madde dışında herhangi bir madde sinyaline rastlanmaması dönüşümün GUS enzimi tarafından % 100 seçicilikle gerçekleştirildiğini ve yan ürün oluşumuna rastlanmadığını göstermektedir.



**Şekil 4.9** Serbest GUS hidrolizinde farklı inkübasyon sürelerinde analizlenen reaksiyon ortamı kompozisyonları: a) 3 b) 15 c) 20 dk inkübasyon sonrası ortam kompozisyonlarını gösteren kromatogramlar.

Reaksiyona ait 24 h süresince toplanan örnekler incelendiğinde reaksiyonun 4 h serbest enzim inkübasyonu ile tamamlandığı (% 99 dönüşüm) görülmektedir (Şekil 4.10). Reaksiyonun, 20 dk sonrasında % 80 dönüşüm veriminde belirli bir süre sabit kalması beklenmeyen bir durum olarak göze çarpmıştır. Ancak bu durumun, reaksiyonun 20. dakikasının ardından ortamda derişimi azalan substratla GUS enziminin çarpışma sıklığının azalmasıyla reaksiyon hızındaki düşüşten kaynaklandığı düşünülmektedir. İlave olarak reaksiyonun 20. dakikasından

itibaren ortam kromatogramlarında başlangıç maddesi sinyalinin tükendiği düşünülebilir. Ancak başlangıç maddesinin reaksiyonun tamamlandığı ilk 4 saat içerisinde esasen ortamda olduğu ve raporun örnek hazırlama bölümünde belirtilen metanol seyreltmesi sebebiyle UPLC-PDA dedektör sistemi tarafından görüntülenememesi nedeniyle kromatogramlar üzerinde sinyal oluşumu görülmemiştir. Reaksiyon ortamda bulunan ve dedekte edilemeyen başlangıç maddesi dönüşümüyle ilerleyerek 4. saat sonunda % 100 dönüşümle tamamlanmıştır.



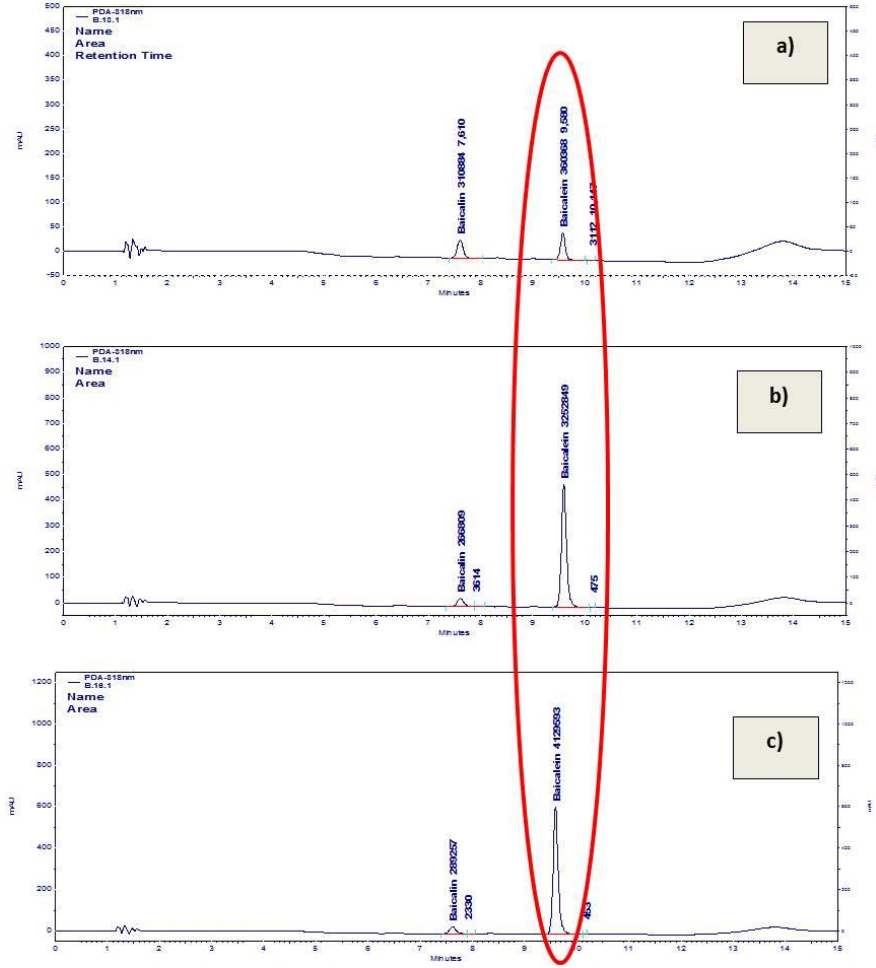
Şekil 4.10 Baicalin'in serbest enzim hidrolizine ait inkübasyon süresine bağlı dönüşüm verimi grafiği (Tüm denemeler iki tekrarlı yapılmıştır).

### 4.3.3. Mikroçiplerde hidroliz

#### 4.3.3.1. PDMS mikroreaktörlerde baicalin katalizi

Kanalı 250 U GUS enzimi taşıyan silika jel materyaliyle yüklenmiş PDMS mikroreaktörlere 1  $\mu$ l/dk akış hızında 60 ppm baicalin beslemesi yapılarak çalışılmıştır. 1  $\mu$ l/dk sabit akış hızında besleme akımının mikrokanal içerisinde 100 dk kalarak çıkış yapmaktadır.

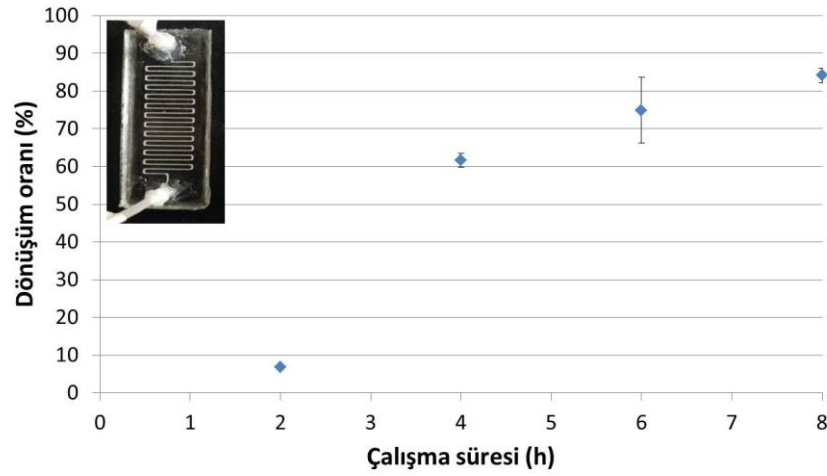
Bu koşullar altında çalıştırılan mikroçip sisteminden zamana bağlı olarak toplanan çıkış akımı kompozisyonları incelendiğinde, mikroçip sistemi sabit akış hızında (dolayısıyla besleme akımı için sabit kalış süresinde) çalıştırılmasına rahmen, çalışma süresine bağlı olarak çıkış akımındaki dönüşüm ürünü derişimlerinde kararlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11** PDMS mikroreaktöre yüklü TEOS-PEO jel ile 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ 'de gerçekleştirilen katalizde a) 2 h b) 4 h c) 8 h sonrasında örneklenen çıkış akımlarına ait kompozisyonlar.

Çalışma süresine bağlı olarak mikroçip sisteminden baicalein üretimi yönünde elde edilen dinamik dönüşüm verimleri Şekil 4.12'de görülmektedir. Şekil üzerinde görüldüğü gibi mikroçip sisteminin çalışma süresinin başlangıcındaki 2. saatte dönüşüm verimi % 7 iken 8. saate doğru baicalein dönüşüm verimi ciddi bir artış eğilimiyle % 84 gibi yüksek bir değere ulaşmıştır.

Dönüşüm oranının, çalışma süresinin ilk saatlerinde, beklenmedik bir şekilde düşük olması ve sonrasında artış göstermesinin sebebi olarak iki ihtimal üzerinde durulmuştur: Bunlardan ilki literatürde de bilgisine ulaşılan PDMS mikroçip yapı materyalinin küçük lipofilik molekülleri absorblayabilmesi nedeniyle dönüşüm ürünü olan yüksek lipofiliteli baicalein aglikon molekülünün sistemde birikmesi ve zamana bağlı olarak artan derişimlerle mikrosistemden çıkması durumudur (Tang et al., 2008; Toepke and Beebe, 2006).



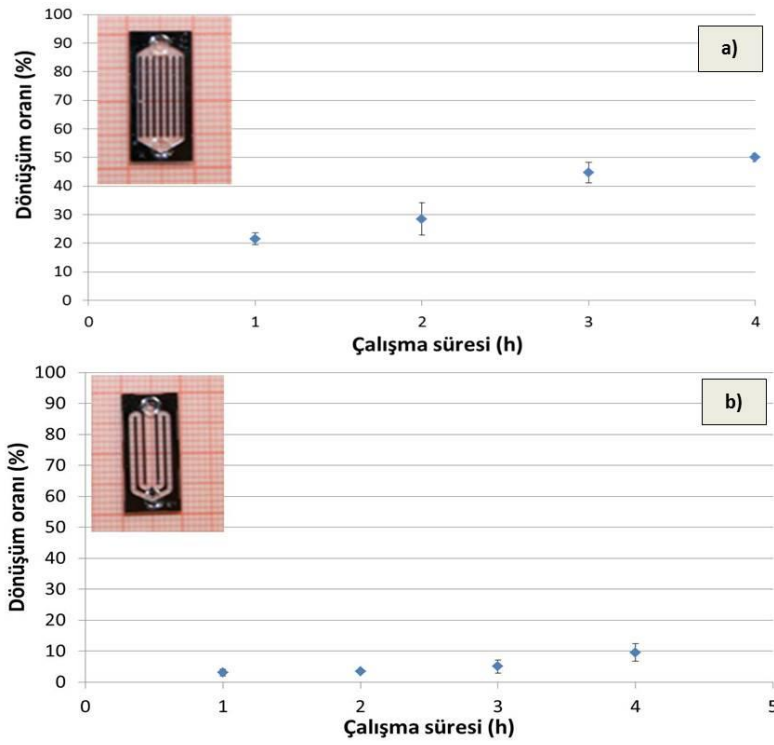
**Şekil 4.12** PDMS mikroçiplerde çalışma süresine bağlı olarak baicalein üretim işlemi verimleri. Tüm denemeler iki tekrarlı yapılmıştır.

İkinci ihtimal olarak ise PDMS mikrokanalların içerisini dolduran silika jel materyali içerisinde difüzyon ve kütle transfer kısıtlarından doğan madde birikimidir. Söz konusu iki sebepten birinde yaşanan problem nedeniyle PDMS mikroçiplerde çalışma süresinin ilk birkaç saati içerisinde çıkış akımında düşük bir baicalein miktarı tespit edilmiştir. Sonrasında zamana bağlı olarak mikrokanal sisteminin doygunluğa ulaşması sürecinde baicalein dönüşüm oranları kararlı bir artışın ardından dengeye ulaşmıştır. Sistem 8. saat sonlarına doğru doygunluğa ulaşmasının ardından, asıl işlem verimi olan % 84'lük işlem veriminin ancak elde edilebildiği düşünülmektedir.

#### **4.3.3.2. Cam mikroreaktörlerde baicalin katalizi**

PDMS mikroreaktörlerde sabit işletim koşulları altında, çalışma süresinin ilerlemesine bağlı olarak görülen bu beklenmeyen deneysel sonucun çip materyali kaynaklı absorpsiyonla ilişkisinin araştırılması ve ayrıca baicalein üretim veriminin artırılması amacıyla söz konusu reaksiyon Tip I ve Tip II cam-silikon-cam mikroreaktörlerde, PDMS mikroreaktörle birebir aynı koşullar altında çalışılmıştır (Şekil 4.13). Böylelikle hem mikroreaktör malzemesinin molekül absorpsiyonu üzerindeki etkisi hem de üç farklı mikrokanal geometrisinin baicalein üretim işlemi üzerindeki karşılaştırmalı etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

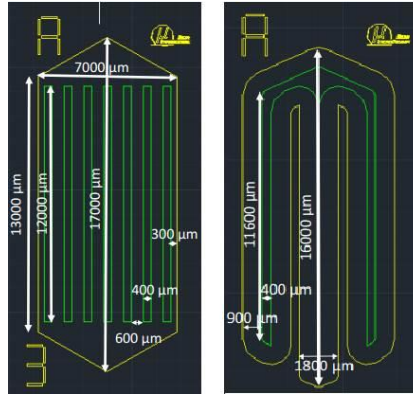
Her ikisi de 37,5  $\mu\text{L}$ 'lik reaksiyon hacmine sahip olan kanal geometrileri farklı Tip-I (paralel sekiz kanal) ve Tip-II (labirent iki kanal) cam mikroyerleştirici kanallarına 250 U GUS enzimi içeren silika jel materyali yüklenmiş ve sistemlere 1 $\mu\text{L}/\text{dk}$  akış hızıyla 60 ppm baicalin beslemesi yapılmıştır. Tip-I mikroyerleştiricilerde çalışma süresinin ilerlemesine bağlı olarak dönüşüm oranlarında (% 20-50), 4 saat sonunda denge durumuna ulaşan sürekli bir artış gözlenmiştir. Benzer durum Tip-II cam mikroyerleştiricilerde de gözlenmiş ancak Tip-II mikroyerleştiricilerde baicalin dönüşüm verimi Tip-I'dekine göre daha düşük oranda (% 3-10) gerçekleşmiştir.



**Şekil 4.13** Tip-I (a) ve Tip-II (b) cam mikroyerleştiricilerde çalışma süresine bağlı olarak elde edilen baicalin üretim işlemi verimleri.

İki mikrosistemin toplamda eşit reaksiyon hacmine sahip olup aynı koşullar altında çalıştırılmasına rağmen dönüşüm verimlerinde gözlenen bu farklılık kanal geometrilerindeki farklılıklardan kaynaklanmıştır. Aynı mikroyerleştirici sistemleriyle, benzer bir silika jel materyali (EGMS-PEO jel) kullanarak farklı model bir reaksiyonu çalıştıran Cumana et al. (2014) bu çalışmadakine benzer bir durumla karşılaşmışlardır. Tip-I ve Tip-II cam mikroyerleştiricilere Glikoz-6-fosfat dehidrogenazın (G6PDH) EGMS-PEO türevli silika jel formülasyonu

yüklendiği bu çalışmada, glikoz-6-fosfatın 6-fosfoglukonata dönüşüm reaksiyonu çalışılmıştır (Cumana et al., 2014). Araştırmacılar Tip-I mikroreaktörlerle aynı koşullar altında % 60'a varan dönüşümler gözlemlerken, Tip-II reaktörlerde max % 10'a ulaşan bir dönüşüm oranı elde etmişlerdir. Araştırmacılar çip performanslarındaki farklılığı iki farklı çip geometrisinden kaynaklanan besleme akımındaki çizgisel hız farklılığına dayandırmışlardır. Kanalları boş olan Tip-I ve Tip-II mikroçip sistemleriyle gerçekleştirdikleri çizgisel hız ölçümlerinde Tip-II mikroçip sistemlerinde ölçülen çizgisel hızın görece yüksek verimin elde edildiği Tip-I mikroçip sistemlerine göre 2 kat yüksek olduğu sonucuna varmışlardır. Literatürdeki bu çalışma söz konusu mikroçip sistemleri için elde edilen sonuçların aynı mikroreaktör sistemlerinin kullanıldığı bu çalışmadaki baicalein üretimi işlemiyle elde edilen sonuçlarla sıkı bir uyum gösterdiği görülmüştür. Bu durumun sebebini anlamak için her iki mikroçip sisteminin şematik çizimine bakmak yeterlidir (Şekil 4.14). Her iki mikroçip sisteminde hacimsel debinin dağıldığı kanalların toplam kesit alanları dikkate alındığında 8 kanallı Tip-I reaktörlerde akışın gerçekleştiği kesit alanının 2 kanallı Tip-II reaktörlerdekinin yaklaşık olarak 2,5 katı olduğu görülmektedir. Bu nedenle sabit hacimsel debiyle (bu çalışmada 1  $\mu\text{L}/\text{dk}$ ) çalıştırılan sistemlerde Tip-II reaktörlerdeki akış hızı Tip-I reaktörlerdekinin yaklaşık 2,5 katı olmakta ve substrat beslemesi mikrosistem içerisinde enzim ile daha kısa temas kurmaktadır.

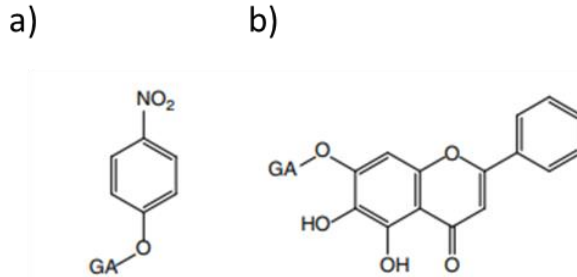


**Şekil 4.14** Tip-I (sol) ve Tip-II (sağ) cam-silikon-cam mikroreaktörlerin şematik çizimleri.

### 4.3.3.3. Mikroreaktörlerdeki pNPG ve baicalin dönüşüm dinamiklerinin karşılaştırılması

Sentetik substrat pNPG ve baicalin molekülleri, PDMS mikroreaktörlerde besleme derişimindeki farklılığın dışında (sırasıyla 1 mM ve 0,135 mM) tamamen aynı koşullarda hidroliz edilmiştir. Ancak 1 µL/dk akış hızında PDMS mikroreaktörlerde 8 saatlik çalışma süresi boyunca gerçekleşen dönüşüm takip edildiğinde dönüşüm verimlerinin her iki madde için farklı olduğu anlaşılmaktadır. 1 mM pNPG ile gerçekleşen reaksiyon % 84 gibi yüksek bir dönüşüm oranından % 47 değerine sistemin çalışma süresinin 8. saatin sonunda gelirken, 0,135 mM (60 ppm) baicalin ile gerçekleşen reaksiyonda dönüşüm verimi % 7 değerinden 8. saat sonunda % 84 değerine ulaşmıştır. PDMS mikroreaktörlerde 8 saatlik çalışma süresi sonundaki ortalama dönüşüm verimleri pNPG ve baicalin için sırasıyla % 63 ve % 56 olarak belirlenmiştir. PDMS mikroreaktörlerdeki dönüşüm veriminin pNPG ve baicalin için mikroçip sisteminin zamana bağlı çalışmasıyla zıt yöndeki değişimin, silika jellerde iki maddenin boyutları farkına dayalı transfer eğilimlerinin farklanması aynı zamanda enzimin söz konusu iki substrata karşı sahip olduğu farklı afiniteden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Paralel 8 kanallı Tip I ve labirent iki kanallı Tip II cam mikroreaktörlerde, S-şekilli tek kanala sahip PDMS mikroreaktörlerdeki gibi sabit koşullar altında çalışma süresinin ilerlemesine bağlı olarak baicalin dönüşüm verimlerinde artış durumu gözlenmiştir (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). PDMS mikroreaktörlerin yanı sıra cam mikroreaktörlerde de bu artış eğiliminin görülmesi söz konusu artış durumunun PDMS materyalinin baicalin ürünü absorblamasıyla ilişkili olmadığını

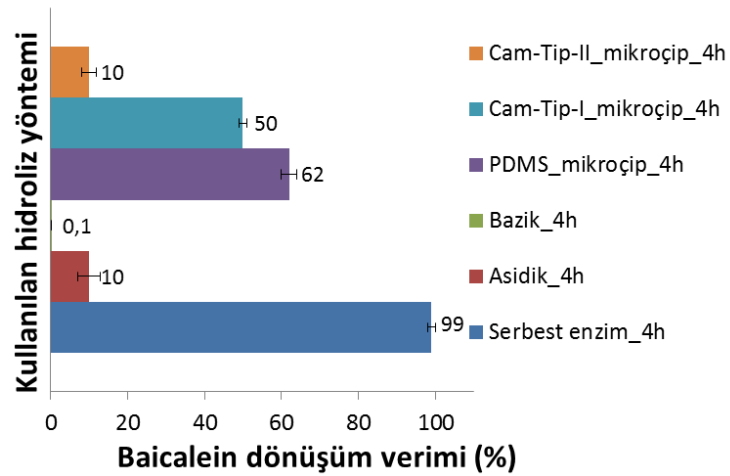


**Şekil 4.15** a) Sentetik substrat pNPG ve b) baicalin moleküllerinin yapıları. Molekül yapıları üzerindeki GA sembolü, aglikon yapılarına bağlı olan hidroliz işlemiyle koparılmak istenen glukuronik asit birimini ifade etmektedir.

göstermiştir. Bu nedenle tüm mikroçip sistemlerinde işlem veriminin zamana bağlı artışından, ikinci ihtimal olarak gözönüne alınan silika jel içerisindeki baicalin ve baicalein moleküllerinin sentetik substrata kıyasla daha büyük olan molekül boyutları nedeniyle maruz kaldıkları difüzyon ve kütle transferi kısıtlarının sorumlu olduğu (Şekil 4.15) düşünülmektedir.

#### 4.3.4. Farklı hidroliz yöntemlerinin karşılaştırılması

Baicalin substratının 4 saatlik asidik ve bazik hidrolizlerinde yüksek yan ürün oluşumlarıyla beraber elde edilen baicalein üretim verimleri sırasıyla %  $10 \pm 3$  ve %  $0,10 \pm 0,02$  olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16). 60 ppm baicalin makroölçekte 250 U serbest GUS enzimi ile 4 saat kesikli inkübasyon işlemi sonunda baicaleine, yan ürün oluşumu görülmeden %  $99 \pm 1$  oranında dönüştürülmüştür. Üç farklı mikroreaktörün mikrokanalları içerisinde 250 U enzim / 60 ppm substrat oranı sabit tutularak, 1  $\mu\text{L}/\text{dk}$  sürekli besleme hızıyla 4 saatlik çalışma süresi sonunda, PDMS-cam, cam-silikon-cam Tip-I ve Tip-II mikroçiplerde elde edilen baicalein üretim verimleri sırasıyla %  $62 \pm 2$ , %  $50 \pm 1$  ve %  $10 \pm 2$  olarak belirlenmiştir. Aynı katalizör/substrat oranı kullanılarak gerçekleştirilen 4 saatlik işlem süresi sonunda, enzim immobilize edilmiş mikroreaktörlerden elde edilen baicalein dönüşüm verimlerinin, serbest enzim ile elde edilen verimin altında olduğu tespit edilse de, geliştirilen mikroreaktör sistemlerinin baicalein üretiminde, enzimin geri kazanımı ve sürekli işletim imkanı sunması yönüyle etkin işlem alternatifleri oluşturabileceği ortaya konmuştur.



Şekil 4.16 Farklı hidroliz yöntemlerinin baicalein üretimi yönünden etkinliklerinin karşılaştırılması.

## 5. SONUÇ

Bu tez kapsamında terapötik öneme sahip baicalein molekülünün, baicalin molekülü hidrolizi yoluyla üretimi için etkin ve yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Baicalin'den baicalein üretimi için tekniğin bilinen durumu içerisinde, klasik anlamda makroölçekte (ml mertebesindeki hacimlerde) kimyasal (asidik, bazik) ve enzimatik hidroliz işlemleri rapor edilmiştir. Ancak literatürde söz konusu işlemle ilgili, yüksek ısı ve kütle transfer olaylarının etkinliği sayesinde reaksiyon verimlerinin yükseltilebildiği yenilikçi mikroakışkan sistemleriyle gerçekleştirilen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Baicalin'in asidik ve bazik hidrolizleri, baicalein üretiminin yanı sıra seçici olmayan hidroliz koşulları nedeniyle ciddi oranda yan ürün oluşumuyla gerçekleşmiştir. Baicalinin asidik hidrolizi (%  $10 \pm 3$ ) bazik hidrolizine göre (%  $0,10 \pm 0,02$ ) anlamlı ölçüde yüksek verimle gerçekleşse de kimyasal işlem verimi enzimatik dönüşümlerdekine yaklaşmamıştır. 60 ppm baicalin, makroölçekte 250 U serbest GUS enzimi ile 4 saat kesikli inkübasyon işlemi sonunda baicaleine, yan ürün oluşumu görülmeden %  $99 \pm 1$  oranında dönüştürülmüştür. Aynı katalizör/substrat oranı kullanılarak gerçekleştirilen 4 saatlik işlem süresi sonunda, enzim immobilize edilmiş PDMS-cam (%  $62 \pm 2$ ), ve cam-silikon-cam Tip-I-II (sırasıyla %  $50 \pm 1$  ve %  $10 \pm 2$ ) mikroreaktörlerden elde edilen baicalein dönüşüm verimlerinin, serbest enzim ile elde edilen verimin altında olduğu rapor edilmiştir. Ancak kimyasal hidroliz yöntemlerine kıyasla yüksek dönüşüm verimi sunması, ve sürekli akış moduyla işletilip enzimin tekrar kullanılmasına fırsat vermesi gibi avantajları nedeniyle daha ekonomik bir baicalein prosesi için PDMS ve Tip-I cam mikroreaktörlerin önemli bir potansiyel taşıdığı düşünülebilir. PDMS ve Tip-I cam mikroreaktörlerden elde edilen baicalein dönüşüm oranı, aynı zamanda literatürde yer alan immobilize GUS materyallerinin kullanıldığı pek çok baicalein üretim işlemiyle (% 50-70 arasında dönüşüm verimlerinin elde edildiği) rekabet etmektedir (Jiang et al., 2007; Song et al., 2014; Zhang et al., 2009).

Cam mikroreaktörlerdeki baicalin dönüşüm oranlarının PDMS mikroreaktördekine oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu durumun PDMS mikroreaktörlerin reaksiyon hacminin (100  $\mu$ L) ve mikrokanal uzunluğunun cam

mikroreaktörlerinkine (37,5  $\mu$ L) göre daha yüksek olması nedeniyle gerçekleştiği görülmüştür. 1  $\mu$ l/dk akış hızlarında mikroçiplere besleme yapıldığında PDMS mikroreaktörlerde substratın kanal içerisinde kalışı dolayısıyla enzimle olan etkileşim süresi 100 dk iken, cam mikroreaktörlerde ise bu süre 37,5 dk olarak karşımıza çıkmaktadır. Kalış sürelerindeki farklılık nedeniyle en yüksek dönüşüm verimleri PDMS mikroreaktörlerde elde edilmiştir.

Toplamda eşit reaksiyon hacmine sahip olup aynı koşullar altında çalıştırılan Tip-I ve Tip-II mikroreaktörlerde baicalein üretim verimlerinde gözlenen anlamlı farklılık, kanal geometrilerindeki farklılıklardan kaynaklanmıştır. Her iki mikroçip sisteminde hacimsel debinin dağıldığı kanalların toplam kesit alanları dikkate alındığında, 8 kanallı Tip-I reaktörlerde akışın gerçekleştiği kesit alanının 2 kanallı Tip-II reaktörlerdekinin yaklaşık olarak 2,5 katı olduğu görülmektedir. Bu nedenle sabit hacimsel debiyle (bu çalışmada 1  $\mu$ L/dk) çalıştırılan sistemlerde Tip-II reaktörlerdeki akış hızı Tip-I reaktörlerdekinin yaklaşık 2,5 katı olmakta ve substrat beslemesi mikrosistem içerisinde enzim ile daha kısa temas kurmaktadır. Bu sebep nedeniyle Tip-I mikroreaktörlerde Tip-II reaktörlere göre 4 kat daha yüksek dönüşüm verimi elde edilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında baicalein üretimine yönelik klasik yöntemler olarak bilinen düşük verimli asit/baz ya da yüksek verimli fakat maliyetli serbest enzim hidrolizlerine alternatif, etkin bir yöntem olarak sürekli işletim sistemiyle enzim geri kazanımı sağlayan mikroreaktör sistemleri geliştirilmiştir.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- Asanomi, Y., Yamaguchi, H., Miyazaki M. and Maeda H.**, 2011, Enzyme-immobilized microfluidic process reactors, *Molecules*, 16 (7): 6041-6059 pp.
- Avnir, D., Coradin T., Lev O. and Livage J.**, 2006, Recent bio-applications of sol-gel materials, *Journal of Materials Chemistry*, 16 (11): 1013-1030 pp.
- Betancor, L. and Luckarift H.R.**, 2008, Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis, *Trends in biotechnology*, 26 (10): 566-572 pp.
- Bhatia, R.B., Brinker C.J., Gupta A.K. and Singh A.K.**, 2000, Aqueous sol-gel process for protein encapsulation, *Chemistry of Materials*, 12 (8): 2434-2441 pp.
- Biggs, A.**, 1954, A spectrophotometric determination of the dissociation constants of p-nitrophenol and papaverine, *Transactions of the Faraday Society*, 50: 800-802 pp.
- Biosciences, A.** “ $\beta$ -Glucuronidase A Assay, DyNA Quant™ Application Note”, [https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc80623675\\_20110830181743.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc80623675_20110830181743.pdf) (Erişim tarihi: 20 Haziran 2016).
- Bolivar, J.M., Wiesbauer J. and Nidetzky B.**, 2011, Biotransformations in microstructured reactors: more than flowing with the stream, *Trends in biotechnology* 29 (7): 333-342 pp.
- Bowers, G.N., McComb R.B., Christensen R. and Schaffer R.**, 1980, High-purity 4-nitrophenol: purification, characterization, and specifications for use as a spectrophotometric reference material, *Clinical chemistry* 26 (6): 724-729 pp.
- Brady, D. and Jordaan J.**, 2009, Advances in enzyme immobilisation, *Biotechnology letters*, 31 (11): 1639 pp.
- Brandhuber, D., Torma V., Raab C., Peterlik H., Kulak A. and Hüsing N.**, 2005, Glycol-modified silanes in the synthesis of mesoscopically organized silica monoliths with hierarchical porosity, *Chemistry of materials*, 17 (16): 4262-4271 pp.
- Cayman, C.** “Product Information: Baicalein”, <https://www.caymanchem.com/pdfs/70610.pdf> (Erişim tarihi: 20 Haziran 2016).
- Cetin, B., Asik M.D. and Taze S.**, 2013, Design and fabrication of a microfluidic device for synthesis of chitosan nanoparticles, *Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine* 4 (3): 031004 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)**

- Chen, H., Gao Y., Wu J., Chen Y., Chen B., Hu J. and Zhou J.**, 2014, Exploring therapeutic potentials of baicalin and its aglycone baicalein for hematological malignancies, *Cancer letters*, 354 (1): 5-11 pp.
- Chen, L., Wei B., Zhang X. and Li C.**, 2013, Bifunctional Graphene/ $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Hybrid Aerogels with Double Nanocrystalline Networks for Enzyme Immobilization, *Small*, 9( 13): 2331-2340 pp.
- Chen, Q., Schönherr H. and Vancso G.J.**, 2009, Block-Copolymer Vesicles as Nanoreactors for Enzymatic Reactions, *Small*, 5 (12): 1436-1445 pp.
- Chen, S., Ruan Q., Bedner E., Deptala A., Wang X., Hsieh T., Traganos F. and Darzynkiewicz Z.**, 2001, Effects of the flavonoid baicalin and its metabolite baicalein on androgen receptor expression, cell cycle progression and apoptosis of prostate cancer cell lines, *Cell proliferation*, 34 (5): 293-304 pp.
- Cichna, M.**, 2003, Applicability of Enzyme Columns Prepared by Co-Immobilising  $\beta$ -Glucuronidase and Arylsulfatase by the Sol-Gel Method for Deconjugation of Glucuronides and Sulfates in Urine, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 26 (1-3): 1159-1164 pp.
- Costa, S., Barroso M., Castañera A. and Dias M.**, 2010, Design of experiments, a powerful tool for method development in forensic toxicology: application to the optimization of urinary morphine 3-glucuronide acid hydrolysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (7): 2533-2542 pp.
- Cumana S.**, 2013, Application of Silica-Based Porous Materials in Microreactors and Chromatographic Separations, PhD Thesis, Technischen Universität Hamburg-Harburg, Hamburg.
- Cumana, S., Ardao I., Zeng A.-P. and Smirnova I.**, 2014, Glucose-6-phosphate dehydrogenase encapsulated in silica-based hydrogels for operation in a microreactor, *Engineering in Life Sciences* 14 (2): 170-179 pp.
- Fernandes, P.**, 2010, Miniaturization in biocatalysis, *International journal of molecular sciences* 11 (3): 858-879 pp.
- Grisewood, M.J., Gifford N.P., Pantazes R.J., Li Y., Cirino P.C., Janik M.J. and Maranas C.D.**, 2013, OptZyme: computational enzyme redesign using transition state analogues, *PLoS one*, 8 (10): e75358 pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Güçlü-Üstündağ, Ö. and Mazza G.**, 2007, Saponins: properties, applications and processing, *Critical reviews in food science and nutrition*, 47 (3): 231-258 pp.
- Huang, H.-Z., Feng B., Song X.-B. and Ma B.-P.**, 2011, Purification and characterization of glycyrrhizin- $\beta$ -d-glucuronidase and baicalin- $\beta$ -d-glucuronidase from a commercial enzyme preparation, *Biocatalysis and Biotransformation*, 29 (5): 179-185 pp.
- Ibidi, I.** "Ibidi catalogue: cell in focus" [http://www.lri.se/pdf/Produktkatalog\\_IBIDI.pdf](http://www.lri.se/pdf/Produktkatalog_IBIDI.pdf) (Erişim tarihi: 20 Mart 2016).
- Jiang, Z., Zhang Y., Li J., Jiang W., Yang D. and Wu H.**, 2007, Encapsulation of  $\beta$ -Glucuronidase in Biomimetic Alginate Capsules for Bioconversion of Baicalin to Baicalein, *Industrial & Engineering Chemistry Research* 46 (7): 1883-1890 pp.
- Kamata, T., Nishikawa M., Katagi M. and Tsuchihashi H.**, 2003, Optimized glucuronide hydrolysis for the detection of psilocin in human urine samples, *Journal of Chromatography B*, 796 (2): 421-427 pp.
- Kim, H.P., Son K.H., Chang H.W. and Kang S.S.**, 2004, Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms, *Journal of pharmacological sciences*, 96 (3): 229-245 pp.
- Kitamura, K., Honda M., Yoshizaki H., Yamamoto S., Nakane H., Fukushima M., Ono K. and Tokunaga T.**, 1998, Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vitro, *Antiviral research*, 37 (2): 131-140 pp.
- Lai, J.-K., Chuang T.-H., Jan, J.-S. and Wang S.S.-S.**, 2010, Efficient and stable enzyme immobilization in a block copolypeptide vesicle-templated biomimetic silica support, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 80 (1): 51-58 pp.
- Li, J., Jiang Z., Wu H., Long L., Jiang Y. and Zhang L.**, 2009, Improving the recycling and storage stability of enzyme by encapsulation in mesoporous CaCO<sub>3</sub>-alginate composite gel, *Composites Science and Technology*, 69 (3): 539-544 pp.
- Ma, Z., Otsuyama K.-i., Liu S., Abroun S., Ishikawa H., Tsuyama N., Obata M., Li F.-J., Zheng X. and Maki Y.**, 2005, Baicalein, a component of *Scutellaria radix* from Huang-Lian-Jie-Du-Tang (HLJDT), leads to suppression of proliferation and induction of apoptosis in human myeloma cells, *Blood*, 105 (8): 3312-3318 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)**

- Martin, R., Schürenkamp J., Pfeiffer H., Lehr M. and Köhler H.,** 2014, Synthesis, hydrolysis and stability of psilocin glucuronide, *Forensic Science International*, 237: 1-6 pp.
- Matsumura, I. and Ellington A.D.,** 2001, In vitro evolution of beta-glucuronidase into a beta-galactosidase proceeds through non-specific intermediates, *Journal of molecular biology*, 305 (2): 331-339 pp.
- Miller, S.A., Hong E.D. and Wright D.,** 2006, Rapid and efficient enzyme encapsulation in a dendrimer silica nanocomposite, *Macromolecular bioscience* 6 (10): 839-845 pp.
- Miyazaki, M. and Maeda H.,** 2006, Microchannel enzyme reactors and their applications for processing, *Trends in Biotechnology*, 24 (10): 463-470 pp.
- Munirathinam, R., Huskens J. and Verboom W.,** 2015, Supported Catalysis in Continuous-Flow Microreactors, *Advanced synthesis & catalysis*, 357 (6): 1093-1123 pp.
- Okkels, F., Ward J. and Joersbo M.,** 1997, Synthesis of cytokinin glucuronides for the selection of transgenic plant cells, *Phytochemistry* 46 (5): 801-804 pp.
- Roberts, A.B., Wallace B.D., Venkatesh M.K., Mani S. and Redinbo M.R.,** 2013, Molecular insights into microbial  $\beta$ -glucuronidase inhibition to abrogate CPT-11 toxicity, *Molecular pharmacology*, 84 (2): 208-217 pp.
- Sakurama, H., Kishino S., Uchibori Y., Yonejima Y., Ashida H., Kita K., Takahashi S. and Ogawa J.,** 2014,  $\beta$ -Glucuronidase from *Lactobacillus brevis* useful for baicalin hydrolysis belongs to glycoside hydrolase family 30, *Applied microbiology and biotechnology*, 98 (9): 4021-4032 pp.
- Salleh, H.M., Müllegger J., Reid S.P., Chan W.Y., Hwang J., Warren R.A.J. and Withers S.G.,** 2006, Cloning and characterization of *Thermotoga maritima*  $\beta$ -glucuronidase, *Carbohydrate research* 341 (1): 49-59 pp.
- Sheldon, R.A. and van Pelt S.,** 2013, Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how, *Chemical Society Reviews*, 42 (15): 6223-6235 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)**

- Sheldon, R.A.**, 2007, Enzyme immobilization: the quest for optimum performance, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349 (8-9): 1289-1307 pp.
- Shieh, D.-e., Liu L.-T. and Lin C.-C.**, 2000, Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin, *Anticancer Research* 20: 2861-2865 pp.
- Siddharth, T.**, 2014, Evaluation of wild type and mutants of  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) against natural and synthetic substrates, M.Sc. Thesis, University of Saskatchewan, Saskatchewan.
- Sigma A.** “ *$\beta$ -Glucuronidase from bovine liver*”  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g0501?lang=en&region=TR> (Erişim tarihi: 20 Şubat 2016).
- Singh, L.P., Bhattacharyya S.K., Kumar R., Mishra G., Sharma U., Singh G. and Ahalawat S.**, 2014, Sol-Gel processing of silica nanoparticles and their applications, *Advances in colloid and interface science*, 214: 17-37 pp.
- Smirnova, I. and Arlt W.**, 2004, Synthesis of silica aerogels and their application as drug delivery system, *Supercritical Fluids as Solvents and Reaction Media*, Elsevier, ISBN: 0-444-51574-7.
- Song, X., Jiang Z., Li L. and Wu H.**, 2014, Immobilization of  $\beta$ -glucuronidase in lysozyme-induced biosilica particles to improve its stability, *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 8 (3): 353-361 pp.
- Srinivas, N.**, 2010, Baicalin, an emerging multi-therapeutic agent: pharmacodynamics, pharmacokinetics, and considerations from drug development perspectives, *Xenobiotica* 40 (5): 357-367 pp.
- Sun, Y., Satyanarayan M., Nguyen N.T. and Kwok Y.C.**, 2008, Continuous flow polymerase chain reaction using a hybrid PMMA-PC microchip with improved heat tolerance, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 130 (2): 836-841 pp.
- Tang, S.K., Stan C.A. and Whitesides G.M.**, 2008, Dynamically reconfigurable liquid-core liquid-cladding lens in a microfluidic channel, *Lab on a Chip*, 8 (3): 395-401 pp.
- Toepke, M.W. and Beebe D.J.**, 2006, PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications, *Lab on a Chip*, 6 (12): 1484-1486 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)**

- Trontelj, J.**, 2012, Quantification of glucuronide metabolites in biological matrices by LC-MS/MS. Tandem Mass Spectrometry-Applications and Principles, InTech, ISBN: 978-953-51-0141-3.
- Wang, C.-C. and Touster O.**, 1972, Studies of Catalysis by  $\beta$ -Glucuronidase The effect of structure on the rate of hydrolyses of substituted phenyl- $\beta$ -d-glucopyranosiduronic acids, *Journal of Biological Chemistry*, 247 (9): 2650-2656 pp.
- Yang, Y.-h., Aloysius H., Inoyama D., Chen Y. and Hu L.-q.**, 2011, Enzyme-mediated hydrolytic activation of prodrugs, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1 (3): 143-159 pp.
- Yu, C., Zhang Z., Zhang H., Zhen Z., Calway T., Wang Y., Yuan C.-S. and Wang C.-Z.**, 2013, Pretreatment of baicalin and wogonoside with glycoside hydrolase: A promising approach to enhance anticancer potential, *Oncology reports*, 30 (5): 2411-2418 pp.
- Zhang, B., Morales A.W., Peterson R., Tang L. and Ye J.Y.**, 2014, Label-free detection of cardiac troponin I with a photonic crystal biosensor, *Biosensors and Bioelectronics*, 58: 107-113 pp.
- Zhang, C., Zhang Y., Chen J. and Liang X.**, 2005, Purification and characterization of baicalin- $\beta$ -d-glucuronidase hydrolyzing baicalin to baicalein from fresh roots of *Scutellaria viscidula* Bge, *Process Biochemistry*, 40 (5): 1911-1915 pp.
- Zhang, Y., Wu H., Li L., Li J., Jiang Z., Jiang Y. and Chen Y.**, 2009, Enzymatic conversion of Baicalin into Baicalein by  $\beta$ -glucuronidase encapsulated in biomimetic core-shell structured hybrid capsules, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57 (1): 130-135 pp.
- Zhou, X., Liu D., Liu H., Yang Q., Yao K., Wang X., Wang L. and Yang X.**, 2010, Effect of low molecular weight chitosans on drug permeation through mouse skin: 1. Transdermal delivery of baicalin, *Journal of pharmaceutical science*, 99 (7): 2991-2998 pp.

## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında doğan Cahit MÜDERRİSOĞLU ilk ve orta öğretimini İzmir'de tamamlamıştır. 2008 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik bölümünde lisans eğitime başlayarak 2013 yılında bu bölümden mezun olmuştur. 2014 yılında Ege Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başlamış, 2016 yılında araştırma faaliyetlerinde bulunmak üzere 6 aylık bir süreç için ziyaretçi öğrenci olarak Belçika'daki Ghent Üniversitesinde bulunmuştur.

### Makaleler

1. Aslihan Kazan, Marcel Heymuth, Dilan Karabulut, Seref Akay, Ece Yildiz-Ozturk, Rabia Onbas, **Cahit Muderrisoglu**, Sayit Sargin, Rene Heils, Irina Smirnova, Ozlem Yesil-Celiktas (2017) Formulation of organic and inorganic hydrogel matrices for immobilization of  $\beta$  glucosidase in microfluidic platform. Engineering in Life Sciences (**Yayınlandı**) (**Doi: 10.1002/elsc.201600218**).
2. Ece Yildiz-Ozturk, Mesut Yucel, **Cahit Muderrisoglu**, Sayit Sargin, Ozlem Yesil Celiktas (2017) Modelling coupled dynamics of diffusive-convective mass transfer in a microfluidic device and determination of hydrodynamic dispersion coefficient. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers (**Yayınlandı**) (**Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.08.033>**).
3. **Cahit Muderrisoglu**, Seref Akay, Sayit Sargin, Ozlem Yesil-Celiktas (2017) Development of a microenzyme reactor enabling continuous hydrolyses of glucoronides via green and sustainable biocatalyses. Biotechnology Progress (**Gönderilme aşamasında**).
4. **Cahit Muderrisoglu**, Mariia Saveleva, Bogdan Parakhoskiy, Vsevolod Atkin, Andre Skirtach (2017) Composite organic-inorganic coatings of titanium implants with alkaline phosphatase as active component (**Hazırlık aşamasında**).
5. **Cahit Muderrisoglu**, Özlem Yeşil Çeliktas, Development of a novel process for sustainable conversion of baicalin to baicalein: continuous baicalein

production via immobilised beta-gluconidase in different microfluidic systems **(Hazrlık aşamasında).**

### **Kitap-Bölümleri**

1. **Cahit Müderrisoğlu**, Esra İlhan (2016) , “Mikroakışkan Teknolojilerin Temelleri ve Uygulamaları (Fundamentals and application of micro-fluidics) (Edited by Ozlem Yesil-Celiktas)” kitabında Bölüm 8 – Tanı amaçlı mikro-sistemler (Diagnostic microsystems)”, Ege Üniversitesi Yayınevi, İzmir, 2016, **ISBN 987-605-338-195-2.**

### **Sözlü ve Poster Sunumları**

1. **Cahit Muderrisoglu**, Mariia Saveleva, Bogdan Parakhoskiy, Vsevolod Atkin, Andre Skirtach. Composite organic-inorganic coatings of titanium implants with alkaline phosphatase as active component. Nanomaterials in Biomedical Sciences. Flander Training network Life Sciences (f-Tales), **Ghent, Belçika**, 19-20 Eylül 2017 **(Poster Sunumu).**

2. **Cahit Muderrisoglu**, Mariia Saveleva, Bogdan Parakhoskiy, Vsevolod Atkin, Andre Skirtach. Usage of biomineralized functional materials for bone reconstruction on titanium implants. **1st Nano Bio Materials And Raman Characterization Workshop & Raman4Clinics, Ghent, Belçika**, 13-15 Eylül 2017 **(Poster Sunumu).**

3. Seref Akay, Aslihan Kazan, **Cahit Muderrisoglu**, Rabia Onbas, Ecem Saygili, Ozlem Yesil Celiktas. Immobilisation of  $\beta$ -glucuronidase in silica-polymer based monolithic carriers, **Basel Life Science Week, Basel, İsviçre**, 20-22 Eylül, 2016 **(Poster Sunumu).**

4. Ece Yildiz-Ozturk, **Cahit Muderrisoglu**, Mesut Yücel, Ozlem Yesil-Celiktas. Experimentally determination of diffusion coefficient in a microfluidic system for

modelling beta glucoronidase related reactions, **Lab-on-a-chip & Microfluidics Conference, Madrid, İspanya, 15-16 Mart, 2016 (Poster Sunumu).**

5. Ece YILDIZ-OZTURK, Mesut YUCEL, **Cahit MUDERRISOGLU**, Ozlem YESIL-CELIKTAS. Mathematical modelling of biocatalysis studies in microfluidic systems, **Lab on-a-chip & Microfluidics Conference, Madrid, İspanya, 15-16 Mart, 2016 (Poster Sunumu).**

6. Ece Yildiz-Ozturk, **Cahit Muderrisoglu**, Ismail Hakkı Akgun, Ozlem Yesil-Celiktas and Sait Sargin. Development of a technique for determination of biomolecular diffusion coefficients in microfluidic systems. **VII. Bioengineering Congress, 19-21 Kasım, İzmir, Türkiye, 2015 (Sözlü Sunum).**

7. Ece Yildiz Ozturk, **Cahit Muderrisoglu**, Mesut Yucel, Sait Sargin and Ozlem Yesil Celiktas. Mathematical modelling of diffusion in regular and non-regular shaped microfluidic chips, **VII. Bioengineering Congress, 19-21 Kasım, İzmir, Türkiye, 2015 (Poster Sunumu).**

8. **Cahit Muderrisoglu**, Rabia Onbas, Barbaros Cetin, Sait Sargin, Ozlem Yesil-Celiktas. Design, fabrication and testing of PDMS microchips for enzymatic hydrolyses of saponins, **VII. Bioengineering Congress, 19-21 Ekim, İzmir, Türkiye, 2015 (Poster Sunumu).**

9. **Cahit Muderrisoglu**, Rabia Onbas, Ece Yildiz-Ozturk, Aslihan Kazan, Seref Akay, Sayit Sargin, Ozlem Yesil-Celiktas.  $\beta$ -glucuronidase Immobilized Porous Silica Sol-Gel Matrix for Health Applications. **21st International Biomedical Science and Technology Symposium, 22-24 Kasım, Antalya, Türkiye, 2015 (Poster Sunumu).**

10. **Cahit MUDERRISOGLU**, Aslihan KAZAN, Seref AKAY, Sayit SARGIN, Ozlem YESIL CELIKTAS. Fabrication of  $\beta$ -glucuronidase doped sol-gel monoliths suitable for bioconversion via flow-through strategy inside enzymatic microchannel reaction platform, **Royal Society of Chemistry Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health**, 8 Eylül, İzmir, Türkiye, 2015 (Poster Sunumu).

11. **Cahit MUDERRISOGLU**, Dilan KARABULUT, Sait SARGIN, Ismail HAKKI AKGUN, Sevket KARACANCI, Ozlem YESIL CELIKTAS. Lovastatin production using *Coniothyrium fuckelii* ATCC 74227 under solid-state fermentation conditions, **Royal Society of Chemistry Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health**, 8 Eylül, İzmir, Türkiye, 2015 (Poster Sunumu).

12. **Cahit Muderrisoglu**, Aslihan Kazan, Seref Akay, Sayit Sargin, Ozlem Yesil Celiktas. Immobilisation and characterisation of  $\beta$ -glucuronidase in silica sol-gel matrix. **2nd Novel Fluidic Technologies and Applications Workshop**, p.41, 9-10 Nisan, İzmir, Türkiye, 2015 (Sözlü Sunum).