

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**RUSCUS BİTKİSİ SAPONİN MOLEKÜLÜNÜN
MİKROAKIŞKAN SİSTEMDE ENZİMATİK
HİDROLİZİ**

Rabia ÖNBAŞ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 25.01.2017

Bornova-İZMİR

2017

Rabia Önbaş tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “**Ruscus bitkisi saponin molekülünün mikroakışkan sistemde enzimatik hidrolizi**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 25.01.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

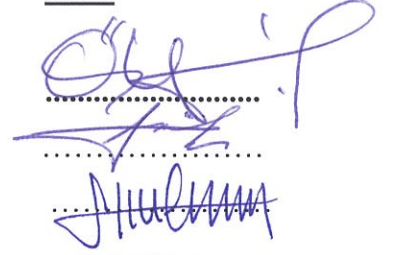
Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı :Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Raportör Üye: Doç. Dr. Sayit SARGIN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ahu ARSLAN YILDIZ

İmza





EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Ruscus bitkisi saponin molekülünün mikroakışkan sistemde enzimatik hidrolizi**” 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.

26/01/2017

Rabia Önbaş

R.Önbaş



ÖZET

RUSCUS BİTKİSİ SAPONİN MOLEKÜLÜNÜN MİKROAKIŞKAN SİSTEMDE ENZİMATİK HİDROLİZİ

ÖNBAŞ, Rabia

Yüksek Lisans Tezi, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Ocak 2017, 88 sayfa

Bu tez çalışmasında mikroakışkan sistemler için aljinat-silika hibrit monolit formülasyonun optimize edilerek; mikroakışkan sistem içerisinde, birçok ticari ilaçta etken maddesi olarak kullanılan aglikon moleküllerinin *Ruscus aculeatus* ekstresine ait saponin moleküllerinden hidrolizinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Enzim immobilizasyonunda kullanılan, difüzyon ve iç jelleşme yöntemleriyle elde edilen aljinat-silika boncuk ve monolitlerin karakterizasyonu amacıyla Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analizi, EDS/mapping, Brunauer–Emmett–Teller (BET) yüzey alanı ve Barrette–Joyner–Halenda (BJH) por hacmi, Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre (FTIR) analizleri yapılmıştır.

Serbest enzim, immobilize enzim ile ilgili kinetik çalışmalar ve karakterizasyon çalışmaları pnp (4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside) substratı ile gerçekleştirilmiştir. Beta-glukozidaz enziminin aljinat-silika hibrit boncuklara immobilizasyonu sonucu %73 nispi aktivite elde edilmiştir. Serbest enzim ve

immobilize enzim için V_{max} ve K_m değerleri ise sırasıyla; $0.016 \text{ mmol mg}^{-1}\text{dk}^{-1}$, 4.2 mM ve $0.012 \text{ mmol mg}^{-1}\text{dk}^{-1}$, 8.8 mM 'dir.

Aljinat-silka hibrit boncuk ve monolitlerin karakterizasyonunun ardından mikroakışkan sistemde hidroliz çalışmaları için iç jelleşme yöntemiyle elde edilen hibrit monolitlerin kullanılmasına karar verilmiş ve enzim miktarının optimizasyonunun ardından pNPG substratının dönüşümünün mikroreaktör içerisindeki davranışını anlamak için aljinat-silika hibrit jel türevli mikroreaktörde $1 \mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızında hidrolizi gerçekleştirilmiştir. İlk kalış süresi sonunda (100 dk), dönüşüm % 20, 24 saat sonra ise dengeye ulaşarak dönüşüm % 94 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, enzimatik hidroliz sırasında aljinat-silika hibrit jel türevli mikroreaktörün monolitik sistemde karşılaşılan bazı sorunların üstesinden geldiğini göstermektedir. *R. aculeatus* ekstresinin enzimatik hidrolizi aljinat-silika hibrit jel türevli mikroreaktör içerisinde $1 \mu\text{l}/\text{dk}$ akış hızında gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz sonucu ara ürüne ulaşılmıştır. Enzim miktarı $40 \mu\text{g}$ olan, aljinat-silika hibrit jel türevli mikroreaktörde 5 saat sonunda % 78.92 oranında ara ürün dönüşümü elde edilmiştir. Sonuçlar, mikroakışkan sistem parametrelerinin optimizasyonu ile aglikon formun elde edilebileceğini desteklemektedir.

Anahtar Sözcükler: *Ruscus aculeatus* saponin, enzimatik hidroliz, aljinat-silika, sol-jel, hibrit monolit, mikroreaktör

ABSTRACT**ENZYMATIC HYDROLYSIS OF *RUSCUS* SAPONIN IN
MICROFLUIDIC SYSTEM**

ONBAS, Rabia

Master of Science, Department of Biomedical Technologies

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ozlem YEŞİL ÇELIKTAS

January 2017, 88 pages

In this thesis, parameters of alginate-silica hybrid monolith were optimized for microfluidic system in order to hydrolyze *Ruscus aculeatus* extract saponin molecules and to obtain aglycones which are active compounds of some drugs.

Alginate-silica hybrid beads and monoliths were obtained based on diffusion gelation and internal gelation method, respectively. These hybrid beads and monoliths were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), EDS/mapping, Brunauer–Emmett–Teller (BET) surface area, Barrette–Joyner–Halenda (BJH) pore size, Fourier- Transformed Infrared Spectrometer (FTIR) analyzes.

Kinetic studies related with free and immobilized enzyme and their characterization studies were carried out using pNPG (4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside) substrate. As a result of immobilization of beta-glucosidase enzyme into alginate-silica hybrid beads a relative activity of 73% was achieved.

V_{max} and K_m values were determined as 0.016 mmol mg⁻¹dk⁻¹, 4.2 mM and 0.012 mmol mg⁻¹dk⁻¹, 8.8 mM, respectively.

After characterization studies of hybrid beads and monoliths, hybrid monoliths that synthesized via internal gelation technique were decided to use as a matrix. After optimize the enzyme amount (40 µg), hydrolytic conversion of pNPG were performed to understand behavior of bioreaction in microreactor. The yield in enzymatic microreactor was 20 % after first retention time, then reached the equilibrium at 24 h while the yield was 94 %. This indicated that the alginate-silica gel derived microreactor overcome the some drawbacks of monolithic systems. Enzymatic hydrolysis of *R. aculeatus* extract saponins in alginate-silica hybrid gel derived microreactor were carried out at a flow rate of 1 µl/min. Conversion yield was obtained as 78.92 % after 5 hours with 40 µg enzyme in alginate-silica derived monolithic microreactor for byproduct of *R. aculeatus* extract. This results showed that there is strong possibility for obtain aglycone form of saponins with further optimization of parameters in microfluidic system.

Keywords: *Ruscus aculeatus* saponins, enzymatic hydrolysis, Aalginate-silica, sol-gel, hybrid monolith, microreactor

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecinde danışmanlığımı yapan, çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ' a,

Tez çalışmam boyunca değerli bilgilerini paylaşan Doç. Dr. Sayit SARGIN'a,

Çalışmanın her adımda doğru ve sağlıklı ilerlemesi için emek veren, sonuçların analizlerinin gerçekleştirilmesinde katkıda bulunan Ar. Gör. Şeref AKAY'a,

Çalışmada HPLC analizlerinin gerçekleştirilmesi için emek veren Özgür TAĞ'a

Çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Öncül Akışkan Teknolojileri ve Uygulamaları Laboratuvarından çalışma arkadaşlarım Aslıhan KAZAN, İrem Cemre TÜRÜ, Ece Yıldız ÖZTÜRK, Ecem SAYGILI ve Esra İLHAN'a,

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen 15-FBE-012 numaralı Bilimsel Araştırma Projesi'ne ve 113M050 no'lu "Mikroakışkan sistemlerde sol-jel teknolojisi odaklı enzimatik tepkimeler: deneysel çalışma ve model geliştirme" projesi kapsamında maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na,

Ayrıca, desteğinden dolayı TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı'na,

Her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Saponinler ve Aglikonların Özellikleri	3
2.1.1 <i>Ruscus Aculeatus</i> 'un terapötik özellikleri	4
2.1.2 <i>Ruscus Aculeatus</i> 'un kimyasal ve enzimatik yöntemlerle hidrolizi ..	8
2.2 Enzim İmmobilizasyonu	10
2.2.1 Kullanılacak destek materyalin seçimi	12
2.2.2 Enzim immobilizasyon teknikleri	13
2.2.3 Destek materyaline bağlama yöntemi	14
2.3 Mikroakışkan Sistemler	27
2.3.1 Mikroakışkan sistemler ve temel terimler	27
2.3.2 Mikroakışkan sistemlerin üretim yöntemleri	29
2.3.3 Mikroakışkan sistemlerde enzimatik reaksiyon	31
3 MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1 Aljinat-Silika Hibrit Boncuk ve Monolitlerin Hazırlanması	34
3.1.1 Difüzyon jelleşme yöntemi ile aljinat-silika hibrit boncukların hazırlanması	34
3.1.2 İç jelleşme yöntemi ile aljinat-silika hibrit monolit formülasyonun hazırlanması	34
3.2 Aljinat-silika Hibrit Boncuk ve Monolitlerin Kurutulması	35
3.3 Aljinat-silika Hibrit Jellerin Karakterizasyonu	35
3.3.1 Por büyüklüğü, por hacmi ve yüzey alanı analizi (BET)	35
3.3.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	36
3.3.3 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi analizi	36
3.3.4 Aljinat-silika hibrit monolitlerin büzülme testi	37
3.4 Enzim Kinetiği Çalışmaları	37
3.4.1 Serbest enzim aktivitesinin belirlenmesi	37
3.4.2 Aljinat-silika hibrit boncuklarda immobilize enzim aktivitesinin belirlenmesi	38
3.4.3 Kinetik parametrelerin belirlenmesi (V_{max} , K_m)	40

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.4.4	İç jelleşme yöntemi ile sentezlenen aljinat-silika hibrit monolitlerdeki immobilize enzim aktivitesinin belirlenmesi	40
3.4.5	Enzim miktarının optimize edilmesi	40
3.4.6	Aljinat-silika hibrit monolitte 5 günlük enzim kararlılığının belirlenmesi	41
3.5	<i>Ruscus Aculeatus</i> Ekstresinin Kimyasal ve Enzimatik Hidrolizi.....	42
3.5.1	<i>Ruscus Aculeatus</i> ekstresinin asit hidrolizi	42
3.5.2	<i>Ruscus Aculeatus</i> ekstresinin bazik hidrolizi	42
3.5.3	<i>Ruscus Aculeatus</i> ekstresinin enzimatik hidrolizi	42
3.6	<i>Ruscus Aculeatus</i> Ekstresinin Mikroreaktörde Enzimatik Hidrolizi	43
3.6.1	<i>Ruscus Aculeatus</i> ekstresinin enzimatik hidrolizinde kullanılacak PDMS mikroreaktörlerin üretimi.....	43
3.6.2	Mikroreaktöre yükleme yapılması ve <i>Ruscus Aculeatus</i> ekstresinin mikroreaktörde hidrolizi	45
3.6.3	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi analizlerinin yapılması	46
4	BULGULAR VE TARTIŞMA	48
4.1	Aljinat-Silika Hibrit Boncuk ve Monolitlerin Hazırlanması, Karakterizasyonu	48
4.1.1	Por büyüklüğü, por hacmi ve yüzey alanı (BET) analizi sonuçları	51
4.1.2	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi sonuçları.....	53
4.1.3	FT-IR analizi sonuçları	56
4.1.4	Aljinat-silika hibrit monolitlerin büzülme testi sonuçları	57
4.2	Enzim Kinetiği Çalışmaları.....	58
4.2.1	Serbest enzim ve immobilize enzim aktivitelerinin belirlenmesi	58
4.2.2	Kinetik parametrelerin belirlenmesi (V_{max} , K_m)	59
4.2.3	İç jelleşme yöntemi ile aljinat-silika hibrit monolitlerde immobilize enzim aktivitesinin belirlenmesi ve aljinat-silika hibrit boncuklarla aktivitenin karşılaştırılması.....	63
4.2.4	Enzim miktarının optimize edilmesi	64
4.2.5	Aljinat-silika hibrit monolitte 5 günlük enzim kararlılığının belirlenmesi	65
4.3	<i>Ruscus Aculeatus</i> Ekstresinin Kimyasal ve Enzimatik Hidrolizi.....	68
4.4	<i>Ruscus Aculeatus</i> Ekstresinin Mikroreaktörde Enzimatik Hidrolizi	71
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	74
	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	75
	ÖZGEÇMİŞ	87

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1 Aglikon iskeletleri: (A) Steroidal spirostane, (B) steroidal furostane ve (C) triterpenoid saponinler. R = Şeker yapısı (Sparg et al, 2004).....	4
2. 2 Ruscogenin yapısı (RUS) (Huang et al., 2008)	6
2. 3 R.aculeatus aglikonları	7
2. 4 Enzimatik hidroliz öncesi R. colchicus saponin molekülü.....	9
2. 5 Enzimatik hidroliz sonrası R. colchicus saponin molekülü.....	9
2. 6 Sol-jel prosesinin şematik gösterimi ve jel matriks içerisine enkapsülasyon (Sakai-Kato and Ishikura, 2009).....	19
2. 7 Silisik asitin kondensasyon reaksiyonu ile silikanın oluşumu (Nassif and Livage, 2011).....	21
2. 8 Aljinatın yapısal karakteristiği: (a) aljinat monomerleri, (b) zincir yapısı, (c) blok dağılımı (Draget and Taylor, 2011).....	22
2. 9 İki değerlikli iyonların aljinata bağlanması – egg box modeli (a) İki değerlikli iyonların bağlanması (b) Zincirlerin lateral birleşmesi (Morch, 2008).	23
2. 10 İmmobilizasyon yöntemi ile örneklendirilmiş difüzyon yöntemi (a) ve CaCO ₃ /GDL tekniği ile örneklendirilmiş iç jelleşme yöntemi (b) arasındaki temel farklılıklar (Draget et al., 2005).....	24
3. 1 Aljinat-silika hibrit boncuklara β glikozidaz enziminin immobilizasyonu (Desmet et al. (2015)'ten modifiye ve adapte edilmiştir)	39
3. 2 Mikroreaktör üretiminde kullanılan kalıp.....	44
3. 3 100 µl hacme sahip PDMS mikroreaktör	44
4. 1 Süperkritik CO ₂ ile kurutma sonrası aljinat-silika hibrit boncuklar	49
4. 2 Süperkritik CO ₂ kurutma sonrası aljinat-silika hibrit monolit	50
4. 3 Difüzyon jelleşme yöntemi ile hazırlanmış boncukların SEM görüntüleri a) Aljinat/SiO ₂ /PDADMAC, inkübasyon süresi 3 saat (büyütme: 25000x), b) Aljinat/SiO ₂ /PDADMAC, inkübasyon süresi 12 saat, (büyütme: 25000x) c) Aljinat/SiO ₂ /PDADMAC, inkübasyon süresi 24 saat	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4. 4 Difüzyon jelleşme yöntemi ile hazırlanmış aljinat/ SiO ₂ /PDADMAC boncukların SEM görüntüleri (a) büyütme:10000x (b) büyütme:40000x (Desmet et al., 2014).....	53
4. 5 Hibrit monolitlerin SEM görüntüleri (a,b,c,d) ve EDS/mapping görüntüleri (a,c) a) Aljinat (% 3 w/w) /CaCO ₃ /SiO ₂ (büyütme: 2500x) b) Aljinat (%3w/w)/CaCO ₃ /SiO ₂ (büyütme:5000x) c) Aljinat (%3 w/w)/ CaCO ₃ /SiO ₂ /PDADMAC (büyütme:2500x) d)Aljinat(%3w/w)/CaCO ₃ /SiO ₂ /PDADMAC ,(büyütme:50000x).....	54
4. 6 Hibrit monolitlerin SEM görüntüleri (a,b,c,d) ve EDS/mapping görüntüleri (a,c) a) Aljinat (% 2 w/w) /CaCO ₃ /SiO ₂ (büyütme: 2500x) b) Aljinat (%2 w/w)/CaCO ₃ /SiO ₂ (büyütme:5000x) c) Aljinat (%3 w/w)/ CaCO ₃ /SiO ₂ /PDADMAC (büyütme:2500x)d)Aljinat(%3w/w)/CaCO ₃ /SiO ₂ /PDADMAC,(büyütme:50000x).....	54
4. 7 Öncül maddesi silisik asit tetrakis(2-hiroksietil) ester olan silika jelin SEM görüntüsü (Meyer et al., 2002).....	55
4. 8 Aljinat-silika hibrit boncuklara ait FT-IR spektrumu (Aljinat-silika hibrit boncuk=kırmızı, silika=mavi, Ca-aljinat=siyah)	56
4. 9 D3 ve D4 kodlu monolitlere ait FT-IR spektrumu (D3=siyah, D4=mavi, Ca-aljinat + GDL=kırmızı, silika=pembe)	56
4. 10 Aljinat-silika hibrit monolitlerin büzülme grafiği.....	58
4. 11 Serbest enzim aktivitesini hesaplamasında kullanılan standart eğri ve denklemi.....	59
4. 12 İmmobilize enzim aktivitesini hesaplamasında kullanılan standart eğri ve denklemi.....	59
4. 13 Serbest enzim için elde edilen Michaelis-Menten eğrisi	60
4. 14 Serbest enzim için Lineweaver-burk grafiği.....	60
4. 15 İmmobilize enzime ait Michaelis-Menten grafiği.....	61
4. 16 İmmobilize enzime ait Lineweaver-burk grafiği	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4. 17 Farklı enzim miktarının % dönüşüme ve aktiviteye etkisi	64
4. 18 D4 kodlu aljinat -silika hibrit monolitte 4 günlük enzim kararlılığı.....	65
4. 19 İnorganik silika jellerin yaşlandırma günlerine göre enzim aktivitesindeki değişmeler (Karabulut, 2015)	66
4. 20 % dönüşümün hesaplandığı kalibrasyon eğrisi.....	67
4. 21 pNPG substratının aljinat-silika hibrit mikroreaktördeki % dönüşüm grafiği	67
4. 22 Ruscogenine ait standart kromatogram	68
4. 23 <i>Ruscus aculeatus</i> ekstresine ait başlangıç kromatogramı	68
4. 24 <i>Ruscus aculeatus</i> ekstresine ait asidik hidroliz (4 saat) kromatogramı	69
4. 25 <i>Ruscus aculeatus</i> ekstresine ait bazik hidroliz (4 saat) kromatogramı	69
4. 26 <i>Ruscus aculeatus</i> ekstresine ait serbest enzim hidrolizi (96 saat) kromatogramı (enzim miktarı:400 µg)	69
4. 27 <i>Ruscus aculeatus</i> ekstresine ait serbest enzim hidrolizi (96 saat) kromatogramı (enzim miktarı:800 µg)	70
4. 28 <i>Ruscus aculeatus</i> ekstresine ait serbest enzim hidrolizi (96 saat) kromatogramı (enzim miktarı:1600 µg)	70
4. 29 <i>Ruscus aculeatus</i> ekstresine ait serbest enzim hidrolizi (5 saat ve 24 saat) kromatogramı (enzim miktarı:40 µg)	71
4. 30 <i>Ruscus aculeatus</i> ekstresine ait aljinat-silika hibrit monolitik mikroreaktörde gerçekleştirilen enzimatik hidroliz kromatogramı (100, 200 ve 300. 'ü dakikalara ait)	71
4. 31 <i>Ruscus</i> türüne ait saponin molekülü	72
4. 32 Ruscin	72

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Destek materyallerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları (Brena and Batista- Viera, 2006)	12
2.2 İmmobilizasyon metotlarının avantaj ve dezavantajları (Hwang and Gu, 2013)	12
3.1 Aljinat-silika hibrit monolit formülasyonun optimizasyonu.....	33
3.2 Aljinat-silika hibrit jel içeren enzimatik mikroreaktörün hazırlanması	44
3.3 Asidik, bazik ve enzimatik hidroliz örneklerinin analizi için geliştirilen HPLC- ELSD metodu	45
3.4 Mikroreaktörde yapılan hidrolizlerin analizinde kullanılan HPLC metodu ...	46
4.1 Aljinat-silika hibrit boncukların BET yüzey alanı ve BJH por hacmi değerleri	50
4.2 Aljinat-silika hibrit monolitlerin BET yüzey alanı ve BJH por hacmi değerleri	51
4.3. Serbest ve immobilize enzime ait kinetik değerler	60
4.4. Farklı yöntemlerle hazırlanan aljinat-silika hibrit jellerin aktivitelerinin karşılaştırılması	62
4.5 HPLC kromatogramlarına göre pik alanları.....	71

1. GİRİŞ

Çeşitli farmasötik aktiviteleri ile bilinen saponinler, bitkilerde ve bazı mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Antosiyoninler *R. aculeatus*'un ana bileşeni olarak bilinse de, rizom ve köklerden izole edilen kimyasal bileşenlerin ana sınıfı olan steroidal saponinler *R. aculeatus* ticari ürünlerinin aktif bileşenlerini oluşturmaktadır. Saponin molekülleri glikozidik bağları ile bağlı glikon ve aglikon bölümlerinden oluşmaktadır (Wojciechowska et al., 2014). Saponinlerin hidrolizi sonucu elde edilen aglikonlar saponinlerin sahip olmadığı ya da çok düşük oranlarda sahip olduğu biyolojik aktiviteye sahiptir (Francis et al., 2002).

Monolitin kimyasal ve mekanik kararlılığı enzim immobilizasyonunda önemli rol oynamaktadır. Organik-inorganik hibrit materyaller olarak adlandırılan malzemeler hafiflik, esneklik ve iyi kalıplanabilirlik gibi organik malzemelerin avantajlarına sahip olmasının yanısıra inorganik materyallerin de yüksek mukavemet, ısıl kararlılığı ve kimyasal direnç gibi avantajlarına da sahip iyi derecede biyoyumluluk gösteren bir malzeme türüdür ve tüm bu özellikler hibrit materyalleri enzim immobilizasyonunda üstün bir destek materyali olma özelliği kazandırır (Hwang and Gu, 2013; Ruan et al., 2014)

Mikroakışkan sistemlerde reaksiyonlar hızlı gerçekleşir ve kısa sürede sonuç alınır. Daha az örnek kullanılacağı için maliyet düşer ve verimlilik artar. Tüketilen kimyasal ve solventin az miktarda olması, daha az enerji harcanmasına ve daha az atık oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca çalışılan yüzey alanının artmasıyla enzimatik hidrolizde geleneksel yöntemle göre avantaj sağlanmaktadır (Baharudin, 2008; Qasaimeh et al., 2013).

Karakterizasyonu yapılan 3 boyutlu aljinat-silika hibrit monolite β -glukosidaz enziminin immobilizasyonun ve kinetik parametrelerinin belirlenmesinin ardından, diğer bir basamak olarak mikrorektör içerisine

yüklenmiş jel içerisine immobilize edilmiş enzim ile *Ruscus aculeatus*'un hidrolizi hedeflenmiştir.

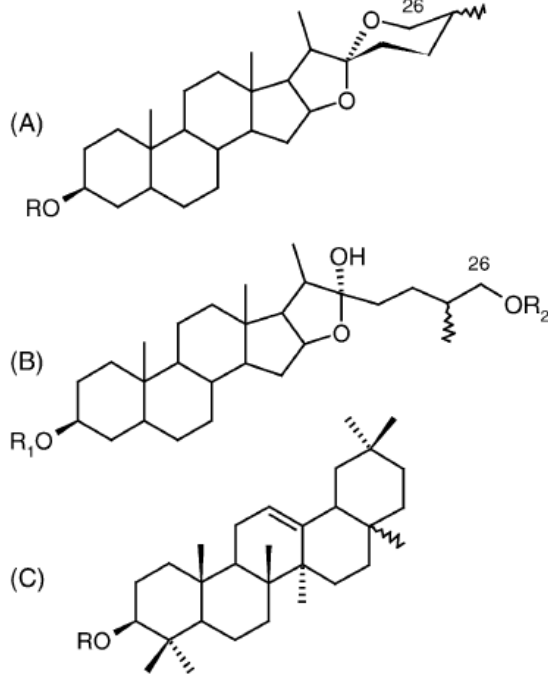


2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Saponinler ve Aglikonların Özellikleri

Doğada yaygın olarak bulunan saponinler genellikle uçucu olmayan, yüzey aktif bileşenler olarak bilinir. ‘Saponin’ kelimesi, Latince anlamı sabun olan ‘sapo’dan türemiştir. Bunun nedeni ise su içerisindeki saponin molekülleri çalkalandığında sabun benzeri köpük oluşturmalarıdır (Augustin et al. 2011; Oleszek, 2002). Çoğunlukla bitkilerin köklerinde, yumrularında, yapraklarında, çiçeklerinde ve tohumlarında bulunan saponinler karbon iskeletlerine göre triterpenler ve steroidler olarak sınıflandırılmaktadır (Man et al. 2010). Saponinler; triterpenoid, steroid veya steroidal glikoalkaloid moleküllerine bağlı bir veya birden fazla şeker zinciri içermektedir (Osborn, 1996). Glikosidik bağı ile birbirine bağlanmış saponin molekülünün şeker içeren kısmı; glikon ve şeker içermeyen kısmı ise aglikon olarak adlandırılmaktadır (Wojciechowska et al., 2014). Saponinler; bir, iki veya üç tane şeker zincirinin bağlanması baz alınarak sırasıyla monodesmoside, bidesmoside ve tridesmoside olarak adlandırılmaktadır (Yunanca’da desmos=bağ) (Oleszek, 2002). Saponinlerin şekerden oluşan kısımları doğada genellikle glukoz, galaktoz, glukuronik asit, ksiloz, ramnoz veya metilpentoz içermektedir ve glikosidik bağı ile hidrofobik aglikona (sapogenin) bağlı bulunmaktadır (Francis et al, 2002). Bu aglikon iskeleti baz alınarak saponinler iki sınıfa ayrılabilirler. İlk grup, yalnızca monokotiledon anjiyospermde bulunan steroidal saponinleri içerir. İkinci grup olan triterpenoid saponinler ise çoğunlukla dikotiledon anjiyospermelerde bulunurlar (Bruneton, J, 1995). Steroidal saponinler, C₂₇ spirosten iskeletlerinde steroidal aglikon içerirler ve genellikle six-ring yapıyı da kapsarlar (Şekil 2.1A). Bazen taze bitki materyallerinde, 26. pozisyondaki hidroksil grup glikosidik bağ ile birleşir ve bu yüzden aglikon yapı pentasiklik olarak kalır ki bu yapı frostan iskelet olarak adlandırılmıştır (Şekil 2.1 B). Triterpenoid saponinler ise C₃₀ iskeletinde triterpenoid aglikonları içerir ve pentasiklik yapıyı da kapsar (Şekil 2.1 C) (Sparg et al, 2004).

Saponin moleküllerindeki bu polar ve nonpolar yapıların birleşimi sulu çözeltilerdeki sabun benzeri davranışı açıklamaktadır (Vincken et al 2007).



Şekil 2. 1 Aglikon iskeletleri: (A) Steroidal spirostane, (B) steroidal furostane ve (C) triterpenoid saponinler. R = Şeker yapısı (Sparg et al, 2004)

Saponinler, çeşitli farmakolojik özelliklerinden dolayı birçok bitki ilaçlarının ve geleneksel tıbbın ana bileşenini oluşturmaktadır (Estrada, 2000). Sorumlu olduğu bu özellikler anti-inflamatuvar (Akkol et al. 2007), anti-tümör (Yoshiki et al, 1998; Man et al. 2010), antiviral (Tam and Roner, 2011), anti fungal ve antimikrobiyal (Avato et al. 2006) olarak bilinmektedir.

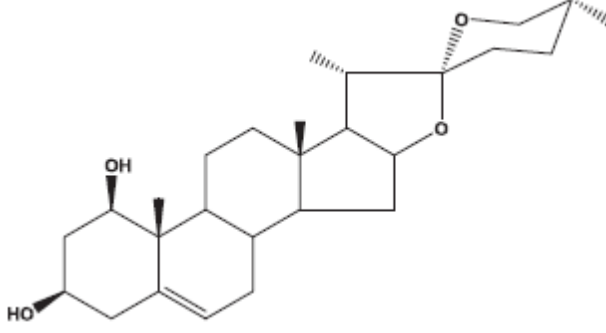
2.1.1 *Ruscus Aculeatus*'un terapötik özellikleri

Liliaceae'nın Asparagoideae alt ailesine ait *Ruscus* familyası çiçekli bitkilerden altı tane türe sahiptir (Mimaki et al. 2008). Steroidal saponinlerin aktif bileşenlerine sahip *Ruscus aculeatus* L. (butcher's broom=çoban püskülü), Liliaceae ailesinin her mevsim yeşil kalan bodur ağaç türüdür.

Ruscus aculeatus, Avrupa'da özellikle Akdeniz'de geniş bir alana yayılmıştır, Kuzey Afrika'dan (Fas, Tunus ve Libya) Doğu Avrupa ve Macaristan'da bulunmaktadır. Yükseklik limitlerine bakıldığında çok detaylı bilgiye rastlanmasa da güney Romanya'da 300 m, güney İtalya'nın ormanlarında 656 m, Slovenya'da 930 m ve Güney Anadolu/Türkiye'de 1000 m'de yetişmektedir (Thomas and Mukassabi, 1992). *Ruscus* steroidal saponinleri çoğunlukla bitkilerin köklerinde ve toprak altı gövdelerinde bulunurlar Spirostan tiplerinin çoğu neoruscogenin ve ruscogenin gibi aglikonlara sahiptir (Mangas et al, 2006; Perrone et al. 2009).

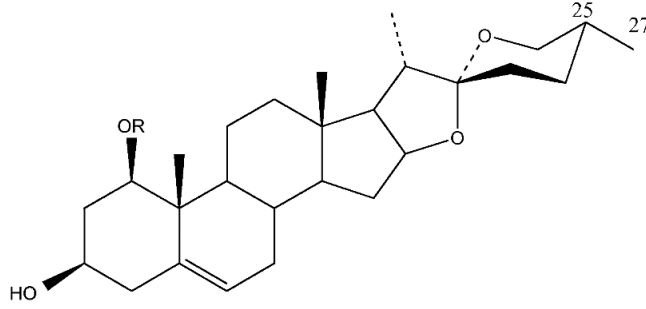
Ruscus aculeatus toprak altı gövdeleri idrar söktürücü ve anti-inflamatuar (iltihap sökücü) ajan olarak kullanılmasının yanısıra hemoroid, damar tıkanıklığı ve dolaşım yetersizliğinin tedavisinde kullanılmaktadır (Güvenç et al, 2011). *Ruscus aculeatus*'un aktif bileşenleri olan steroidal saponinlerden ruskogenin ve neoruscogeninin vazokonstrüksiyon (kan damarlarının daralması) ve damar açıcı özelliklerinin keşfedilmesinin ardından özellikle Almanya ve Fransa'da kronik venöz yetersizliği, varisli damar, hemoroid ve ortostatik hipotansiyonun tedavisinde kullanılmıştır (Bouskela and Cyrino, 1994; Bouaziz et al, 1999; Redman 2000). Ayrıca *Ruscus aculeatus*'un geleneksel tıpta birçok kullanımı vardır. Filistin geleneksel tıbbında rizom ekstraktı deri hastalıklarına karşı kullanılmıştır (Ai-Shtayeh et al., 1998). Türkiye'de ise hazırlanan dekoksiyon egzama, böbrek taşı ve böbrek iltihabında kullanılmıştır (Tuzlacı et al. 2001; Kültür, 2007). İtalya'da ise kalın bağırsak iltihabı ve ishal tedavisinde kullanılmıştır (Savo et al., 2011).

% 0.12 oranında ruskogenin, neoruscogenin, ruscin ve ruscoside içeren steroidal saponin bileşen karışımları *Ruscus aculeatus*'un % 4-6'sını oluşturmaktadır. Ruscogenin ve neoruscogenin genellikle beraber izole edilmektedir ve 'ruscogeninler' olarak isimlendirilmektedirler. Antosiyoninler *R. aculeatus*'un ana bileşeni olarak bilinirken ruscogeninler *Ruscus aculeatus*'un ve bazı ticari ilaçların aktif bileşenlerini oluşturmaktadır (Tansi et al, 2007; Mari et al, 2012).

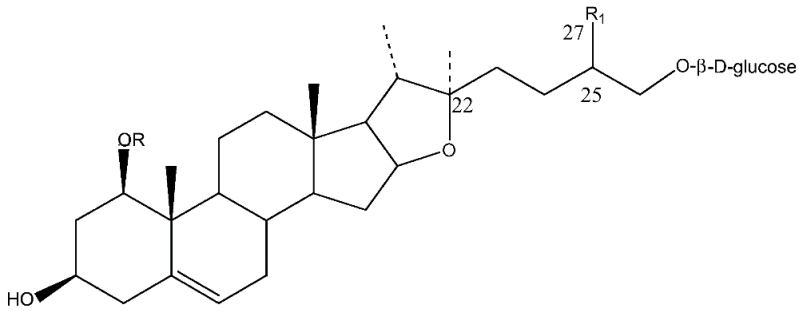


Şekil 2. 2 Ruscogenin yapısı (RUS) (Huang et al., 2008)

R. aculeatus saponinleri C-1 veya C-3 te şeker zinciri bulundurmasına göre spirostanol veya furostanol aglikonlar olarak karakterize edilirler (Mari et al. 2012). *Ruscus* türünden izole edilen steroidal saponinler spirostane prosapogeninlerdir ve taşıdıkları şeker zinciri C-1'e bağlıdır. Furostanoller ise C-1'de şeker zinciri ve C-26' da D-glucose grubu içerir. Spirostanol glikozitler furostanol glikozitlerinin C-26 şekerinin hidrolizi ve yan zincirdeki siklizasyon sonucu spiroketal oluşturmasıyla meydana gelir. (Kite et al. 2007).



		R
1	$\Delta(25-27)$	H
2		H
3a	$\Delta(25-27)$	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-Arap-
3b		β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-Arap-
4a	$\Delta(25-27)$	α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-Arap-
4b		α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-Arap-
5a	$\Delta(25-27)$	α -L-Arap-
5b		α -L-Arap-



		R
6a	$\Delta(25-27)$	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-Arap-
6b	25R	β -D-Glcp-(1 \rightarrow 3)-O- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-Arap-
7a	$\Delta(25-27)$	α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-Arap-
7b	25R	α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-O- α -L-Arap-

Şekil 2. 3 R.aculeatus aglikonları

Spirostan prosapogeninler aglikon olarak neuroscogenin(1) ve ruscogenin(2) içerirler. Prosapogeninler; ruscin (3a), desgluconruscin (4a) ve desglucodesrhamnoruscin (5a) olarak isimlendirilirler ve aglikon olarak neuroscogenin içerirler. Bu bileşenler (25R)-25,27- dihidro türevleri ile uyumludur (birbiri yerini tutar) ve ilgili yapıları 3b,4b ve 5b'dir. Tüm spirostane prosapogeninlerde olduğu gibi hepsi C-26'da glukoz grubu taşıyan

furostanol saponinlerden türevleniler. İki furostanol saponin (R. aculeatus'ta tanımlandığı gibi ruscoside (6a) ve desglucoruscoside (7a)) 25-27 pozisyonunda çift bağ içerirler. Ayrıca (25R)-25,27-dihydro türevleri benzer içeriktedir ve ilgili yapıları 6b ve 7b'dir. Çalışmalar ruscus saponinlerin farmakolojik etkilerinin şeker gruplarının azalmasıyla arttığı yönünde sonuçlar ortaya konmuştur (di Lazzaro et al. 2001; de combarieuet al, 2002) En aktif bileşenler neoruscogenin ve ruscogenindir; bu bileşenlerin karışımı bazı ticari ilaçların aktif bileşenini oluşturmaktadır (Mari et al. 2012;). Bu nedenle R. aculeatus'un hidrolizi için bir çok enzimatik veya kimyasal hidroliz yöntemi geliştirilmiştir (di Lazzaro et al. 2001).

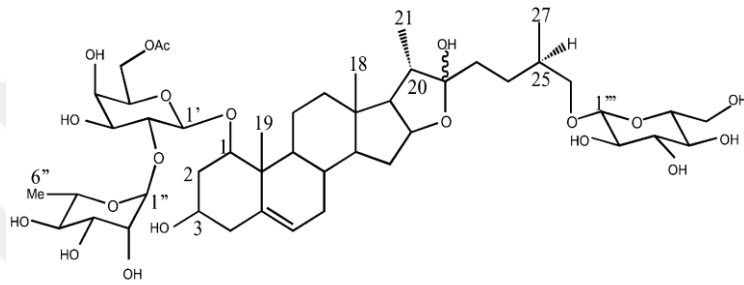
2.1.2 *Ruscus Aculeatus*'un kimyasal ve enzimatik yöntemlerle hidrolizi

Saponinlerin hidrolizi sonucu 'sapogenin' olarak bilinen aglikon ve 'şeker' olarak bilinen glikon oluşur (Negi et al., 2013) . Moleküllerin farmakolojik öneme sahip olması endüstriyi bu moleküllerin verimli ve uygun prosedür içerisinde üretimi konusunda araştırmaya itiyordur. Ruscosid ve desglukoruskosidlerin ruscin ve desglucoruscine dönüşümü iki farklı yöntemle mümkündür. Birincisi; asit hidrolizine dayanan kimyasal yaklaşım, ikincisi ise enzim uygulamasına dayalı biyoteknolojik yaklaşımdır. Asit hidrolizi enzim hidrolizine göre daha az seçicidir. Asit hidrolizinde güçlü asitlerin kullanımı, kompleks yöntem basamakları gibi nedenlerden dolayı heterojen ara ürünler ve ürünler elde edilmektedir. Başka bir ifade ile istenmeyen bileşenler oluşur ve ilgili ürün düşük verimde elde edilir. (Ireland and Dzedzic, 1986; Acquati and Ponzzone, 2003) . Enzim hidrolizinde ise glikozitlerden şeker kısmını ayırmada glikozidaz kullanır. Biyokatalitik yöntem diğer yöntemlere göre daha seçici olması, daha ılımlı koşullara sahip olması ve çevreci bir proses olmasında dolayı endüstriyel açıdan daha çok tercih edilen bir yöntemdir (Di Lazzaro et al, 2001; Chang et al, 2012).

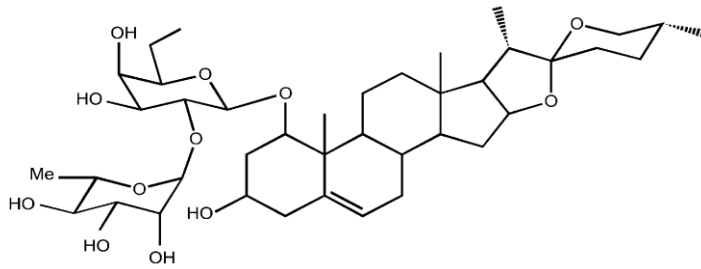
β -Glukozidaz (β -D-Glukozid glukohidrolaz EC 3.2.1.21) iki karbohidrat grubun veya bir karbohidrat ve aglikon arasındaki β -glukozidik bağın hidrolizini katalizleyen bir enzimdir. Çok çalışılan enzimlerden biri olan β -Glukozidazın

enzimatik özellikleri enzimin kaynağına, üretilme ve saflaştırma koşullarına göre değişmektedir (Shewale, 1982; Morant et al. 2008).

De Combarieu et al (2002) *R. colchicus*'tan izole edilen bileşenin (20 mg) hidrolizini 10 mg β -glukozidaz ve 5 ml (% 0.5) fosforik asit ile 37 °C 'de 24 saat süre ile gerçekleştirmiştir. Soğutma işleminin ardından n-bütanol ile ekstraksiyon yapılmıştır. *R. colchicus* saponinin (Şekil 2.4) hidrolizi sonucunda spirostan sapogenin (Şekil 2.5) elde edilmiştir.



Şekil 2. 4 Enzimatik hidroliz öncesi *R. colchicus* saponin molekülü



Şekil 2. 5 Enzimatik hidroliz sonrası *R. colchicus* saponin molekülü

Napolitano et al. (2011) *Ruscus ponticus*'un hidrolizini 2.8 mg bileşenin 10 mg β -glukozidaz enzimi ve 5 ml (% 0.5) fosforik asit ile 37 °C'de 24 saat süre ile gerçekleştirmiştir. Soğutma işleminin ardından n-bütanol ile ekstraksiyon yapılmıştır. Spirostanol glikozitlerin karakterizasyonu NMR analizi ile yapılmıştır. Analiz sonucunda, α -

rhamnopyranosyl biriminin C-3'de b-glucopyranosyl biriminin bulunmadığı ortaya konmuştur ve bu yeni bileşen Ruscus (25R)-26-O-b-D-glukopiranosil-furosta-5,20(22)-diene-1b,3b,26-triol 1-O-[a-Lrhamnopyranosil-(1→2)-O-a-L-arabinopyranosit] tanımlanmıştır.

Di Lazzaro et al. (2001) *R. aculeatus L.* 'un enzimatik hidrolizini β -glukopiranosidaz ve α -rhamnopyranosidaz enzimlerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Desglukoruscinin desglucodesrhamnoscine hidrolizi 3 gün sonunda elde edilmiştir. Bu çalışmada başlangıç substrat konsantrasyonunun ruscosidin desglucodesrhamnoscine dönüşümünde reaksiyon süresini etkilediği gösterilmiştir. Ruscosid'in % 5'lik ve % 20'lik ruscosaponinden 25 °C tamamen dönüşümünün gerçekleştirilebilmesi için sırasıyla 2 ve 7 gün gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. 25 °C'de karıştırmalı biyoreaktörde Ruscosid'in tamamen hidrolizi 1 gün sonra, desglukoruscinin tamamen desglucodesrhamnoscine dönüşümü ise 4 gün sonra gerçekleşmiştir.

2.2 Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, karmaşık molekülleri substrat olarak kabul etme kapasitesine ve reaksiyonları paralel olmayan bir biçimde kiral (enantio-) ve pozisyonel (regio-) katalizleme seçiciliğine sahip olduklarından dolayı dikkat çekici katalizörlerdir. Yüksek derecede seçiciliğe sahip olmalarından dolayı az miktarda yan ürün oluştururlar. Başka bir deyişle reaksiyon sonucu oluşacak atığı azaltır ve verimli bir reaksiyon gerçekleştirirler. Enzimler standart kimyasal yollar ile karşılaştırıldığında sadece ılımlı reaksiyon şartlarına ihtiyaç duyar. Bu da düşük maliyet ve enerji anlamına gelmektedir. Ayrıca enzimler uygun bir biçimde uygulanırlarsa tekrar kullanımları mümkündür ve oldukça biyobozunurdurlar. Bu nedenle enzimler geleneksel kimyasal katalizörlere alternatif olarak 'çevre dostu katalizör' olarak tanımlanır (Schmid et al, 2001; Hobbs and Thomas, 2007).

Enzimlerin kullanımı geleneksel katalizörler ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahip olmasına karşın endüstriyel uygulamalarda

kullanımında çeşitli problemler ile karşılaşmaktadır. Enzimlerin izolasyonu ve saflaştırılması sıradan katalizörlere göre daha pahalıdır. Doğal çevrelerden izole edilirken protein yapıda olmalarından dolayı çok hassastırlar ve bu nedenle izole işlemi sırasında denatüre olma riski taşımaktadırlar. Sıcaklık, pH ve takip etme seviyesindeki maddeler gibi proses koşulları inhibitör etkisi yaratabilir ve maliyet artışına neden olabilir. Ayrıca diğer geleneksel heterojen katalizörlerin aksine enzimler su içerisinde homojen katalizör sistemlerde çözünür, bu nedenle ürünün kontamine olmasına neden olur ve aktif form reaksiyon ortamında tekrar kazanılamaz. Tüm bu sorunların üstesinde gelmek için immobilizasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Krajewska, 2004; Homaei et al, 2013).

İmmobilize enzim terimi ilk olarak 1971 yılındaki Enzim Mühendisliği Kongresi'nde kullanılmıştır. İmmobilize enzim terimi enzimin fiziksel olarak hapsedilmesi veya katalitik aktivitenin belli bir bölgede tutulmasıyla tekrarlı ve sürekli olarak kullanılması olarak tanımlanır (Costa et al., 2004). İmmobilize enzimler, Nelson ve Griffin'in kömüre absorblanan invertazın sükrozu hidrolizme özelliğini keşfetmesi ile birlikte 1916 yılından itibaren kullanılmaktadır (Nelson and Griffin, 1916). İmmobilize enzimlerin tekrar kullanılabilirliği ve kararlılığı ise Grubhofer and Schelth tarafından çeşitli enzimlerin kovalent immobilizasyonu ile ortaya konmuştur (Grubhofer and Schelth, 1954).

Enzimin immobilize formu, enzimin çoğunlukla canlı hücredeki hücre iskeletine, membrana ve organel yapılarına tutunmuş halini taklit eder. Bu nedenle serbest enzimle karşılaştırıldığında immobilize enzimler çevresel değişikliklere daha dayanıklıdır. Buna ek olarak heterojen enzim sistemleri kolaylıkla tüm enzimin ve ürünün geri kazanılmasına, enzimlerin çoklu tekrar kullanımına, tekrar kullanımı sayesinde maliyetin azalmasına, enzimatik prosesin sürekli işletilmesine, reaksiyonun hızlıca sonlandırılmasına, ürünlerdeki protein kontaminasyonunun önlenmesine, mikrobiyal kontaminasyonun kolaylıkla önlenmesine olanak sağlamaktadır. Fakat bunun yanında serbest enzim ile karşılaştırıldıklarında substrata ulaşmakta yaşanan

zorluktan dolayı çoğunlukla düşük aktiviteye ve yüksek Michaelis sabitine neden olurlar (Bornscheuer, 2003; Nisha et al., 2012; Homaei et al., 2013).

2.2.1 Kullanılacak destek materyalin seçimi

İmmobilize enzimlerin performansına karar vermede destek materyalinin karakteristik özellikleri büyük öneme sahiptir. Destek materyalinin en önemli özelliklerinden biri enzim ile etkileşimine karar verecek olan kimyasal yapısıdır. İdeal bir destek materyalinde bulunması gereken özellikler; basınca karşı fiziksel direnç, hidrofiliklik, inert olması, biyoyumluluk, mikrobiyal saldırılara dayanıklılık ve düşük maliyete sahip olmasıdır. Hidrofilik karakter immobilize enzimin aktivite seviyesinin belirlenmesinde etkili en önemli karakteristik özelliklerden biridir (Brena and Batista-Viera, 2006).

Destek materyalleri kimyasal yapılarına göre organik ve inorganik olarak sınıflandırılmaktadırlar (Çizelge 2.1.) (Brena and Batista-Viera, 2006).

Destek materyali geniş yüzey alanına sahip olmasının yanında enzimatik reaksiyonda substrat ve ürünlerin taşınımı için olabildiğince düşük difüzyon kısıtına sahip olmalıdır (Krajewska, 2004).

Destek materyalinin oldukça poroz bir yapıya sahip olması, por çapı ve por çapı dağılımının ideal olması enzim immobilizasyonunda önemli bir role sahiptir. Küçük por çapları difüzyonun kısıtlanmasına yol açarak enzimin yapısal değişimine ve devamında aktivitesini kaybetmesine neden olur. Buna karşın çok geniş por çapı ise enzimin kümelenmesine ve aktivite kaybetmesine neden olur. Küçük poroz partiküllere sahip olan malzemeler büyük çaplı poroz malzeme ile karşılaştırıldıklarında substratlar daha kısa difüzyon yoluna sahip oldukları için daha düşük kütle transfer direncine sahip oldukları görülmüştür. Bu yüzden immobilizasyon yönteminin optimizasyonu çok önemlidir ve bazen kararlılık gibi faktörler yükleme kapasitesini artırma adına feda edilebilir (Kim et al., 2006; Betancor and Luckarift, 2008; Metic et al., 2012).

Çizelge 2. 1. Destek materyallerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmaları (Brena and Batista- Viera, 2006)

Organik
<p>Doğal polimerler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Polisakkaritler: selüloz, dekstran, agar, agaroz, kitin, aljinat • Proteinler: kollajen, albümin • Karbon <p>Sentetik polimerler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Polistiren • Diğer polimerler: poliakrilat polimetakrilatlar, poliakrilamid, poliaminler, vinil ve ali-polimerler
İnorganik
<p>Doğal mineraller: bentonit, silika</p> <p>İşlenmiş materyaller: cam (poroz olmayan ve kontrollü porlu), metaller, kontrollü porlu metal oksitler</p>

2.2.2 Enzim immobilizasyon teknikleri

Enzim immobilizasyonu 3 farklı yaklaşımda sınıflandırılmaktadır: i) destek materyale bağlama (Fiziksel adsorpsiyon, Kimyasal bağlanma) ii) çapraz bağlama (taşıyıcısız) iii) enkapsülasyon veya hapsetme (entrapment). Her bir metodun kendine göre avantajları ve dezavantajları vardır Çizelge 2.2. (Hwang and Gu, 2013).

Çizelge 2. 2 İmmobilizasyon metotlarının avantaj ve dezavantajları (Hwang and Gu, 2013)

İmmobilizasyon metodu	Avantajları	Dezavantajları
Destek materyaline bağlama (Fiziksel adsorpsiyon) (İyonik bağlanma)	Basit deneysel yöntemin toksik solvent kullanılmaması Enzim moleküllerinin tutulması Çok fazla organik bağlayıcı seçeneğine sahip olması	Reaksiyon sırasında enzim sızması Destek materyalinin hazırlanmasında kullanılan yöntemin karmaşık olması Enzim moleküllerinin taşıyıcı içerisinde hareketsiz olması
Enkapsülasyon veya hapsedme	Enzim moleküllerinin tutulması Enzim moleküllerinin taşıyıcı içerisinde serbest olarak hareket etmesi	Karmaşık deneysel yöntem Reaktif türler ve toksik solventlerin enzimi denatüre edebilmesi Reaktantların ve ürünlerin difüzyon hızının azalması
Çapraz bağlama	Geliştirilmiş raf ömrü ve işlemsel kararlılık Tekrar elde edilmesinin ve tekrar kullanımının kolay olması Sulu ortamlarda sızmaya karşı kararlı olması	Enzimin esnekliğini kaybetmesi Reaktantların ve ürünlerin difüzyon hızının azalması

2.2.3 Destek materyaline bağlama yöntemi

Destek materyaline bağlama yöntemi fiziksel (hidrofobik ve van der Waals etkileşimleriyle) iyonik veya kovalent bağlama ile gerçekleştirilebilir. Destek materyali üzerine enzimin adsorpsiyonu en temel enzim immobilizasyon yöntemlerinden biridir. Enzim ve destek materyali arasında fiziksel yüzey etkileşimine dayanan bir yöntemdir ve bu yöntem hidrojen

bağı, elektrostatik güçler, hidrofobik etkilere dayanabilir (Tran and Balkus, 2011).

Fiziksel adsorpsiyon yöntemi en basit enzim immobilizasyonu yöntemi olarak bilinmektedir. Fiziksel adsorpsiyon koşulları altında, enzimin aktif bölgesi çoğunlukla etkilenmez ve neredeyse tüm aktivitenin korunmasını sağlar. Buna karşın enzim immobilizasyonu zayıf fiziksel kuvvetler tarafından gerçekleştiği için (van der Waals veya dispersiyon kuvvetleri) enzim sızmasına neden olur (Hartmaan and Jung, 2009).

- **Çapraz bağlama**

Glutaraldehitin protein yüzeyindeki reaktif NH_2 grubuyla reaksiyona girmesine dayanan protein çapraz bağlama yöntemi 1960 yılında geliştirilmiştir. Fakat bu yöntem ile çapraz bağlı enzim çalışmalarında düşük aktivite, düşük tekrar üretilebilirlik, zayıf mekanik kararlılık, jelatinimsi çapraz bağlı enzim hazırlamadaki zorluklar gibi bazı problemlerle karşılaşmıştır. Quioco and Richards kristal enzimlerin glutaraldehit tarafından çapraz bağlanabileceğini 1964 yılında göstermiştir. Çapraz bağlı enzim kristallerinin endüstriyel biyokatalizör olarak kullanımı ise Vertex Pharmaceuticals tarafından gerçekleştirilmiş ve ardından ticarileşmiştir. Fakat bu yöntemdeki enzimin solüsyondan presipitasyonu karmaşık bir basamaktır ve deneme yanılma çalışmaları zaman kaybına neden olmaktadır. Ayrıca kullanılacak enzimin yüksek derecede saf olması gerekir (Sheldon et al, 2005; Hartmaan and Jung, 2009) Çapraz bağlı enzim yönteminde karşılaşılan diğer bir problem ise partikül çaplarınının 10 μm altında olması heterojen rekasyon sistemlerinde immobilize enzimlerin sürekli olarak kullanımını engellemektedir (Cao et al. 2003).

- **Enkapsülasyon veya hapsedme**

Hapsedme yöntemi, polimerik bir yapı içerisinde sınırlandırılmış bir alanda enzimin fiziksel olarak tutturularak, reaksiyon substratların girişine ve

enzimatik reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin çıkışına izin veren bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (Brena and Batista-Viera, 2006; Wang et al. 2012). Hapsetme yöntemi mekanik olarak kararlılık sağlar ve enzim sızma ihtimalini en aza indirir. Ayrıca enzim polimer ile kimyasal bir etkileşime girmediği için çoğunlukla denatürasyon önlenmiş olur. Fakat kütle transferini sınırlandırması ve düşük enzim yüklenmesi gibi problemleri de beraberinde getirir. Hapsetme yöntemine benzer bir şekilde enkapsülasyon yöntemi de enzimi dış etkenlere karşı korur fakat kütle transferi sınırlandırmasından dolayı büyük substratların biyokatalizinde uygulanması sınırlıdır. Fakat hapsetme yöntemi enkapsülasyon materyalinin modifiye edilmesine olanak verir ve enzim için en uygun mikroçevrenin (optimum pH, polarite, amfiliklik) oluşturulmasını sağlar. Bu mikroçevre polimerler, sol-jel, polimer/sol-jel kompozitler ve diğer inorganik malzemelerle oluşturulabilir (Lalonde and Margolin 2002; Wang et al., 2012; Mohamad et al., 2015).

- **Silika sol-jel**

Sol-jel bilimi, silika camların oda sıcaklığında hidrolitik yollarının keşfedilmesi ile bu teknoloji kullanılarak ve sentez koşullarındaki modifikasyonlar sayesinde kontrollü morfoloji, yüzey özellikleri ve por yapısına sahip termal ve kimyasal olarak kararlı malzemelerin sentezine olanak sağlamaktadır. Günümüzde sol-jel prosesinin en önemli avantajı ılımlı reaksiyon koşullarında, nano- yapı ve makroporoz yapı aralığında inorganik ve hibrit organik-inorganik polimerlerin elde edilmesini sağlaması olarak belirtilmektedir (Gill, 2001; Fumes et al. 2015). Silikalar, ana grup ve geçiş metal oksitler, metallo-silikatlar, organik modifiye silikatlar (ormosiller) ve çeşitli kompozitler; biyoteknoloji, tıp, optik, çevresel teknoloji, hafıza cihazları, sensör ve fotonik uygulamaları için sentezlenmekte ve kullanılmaktadır. Ayrıca hassas fabrikasyon tekniklerindeki gelişmeler sol-jel yönteminin ayırma biliminde, heterojen katalizde ve mikrocihaz teknolojilerinde kullanımını arttırmıştır (Gill, 2001; Livage et al., 2001).

Sol-jel terimi, bir sıvı içerisinde dağılmış katı partiküllerin (sol, çoğunlukla koloidal) bir araya gelerek üç boyutlu (3B) bir yapı oluşturan proses (jel) olarak tanımlanmaktadır. Bu terim öncül maddenin hidrolizini içeren ve polikondensasyon reaksiyonları üzerinden jel oluşumunu sağlayan herhangi bir çözelti için kullanılmaktadır. Sol-jel teknolojisi inorganik polimerlerin ve organik-inorganik hibrit malzemelerin sentezi için çeşitli yaklaşımlar sunmaktadır (Amiri, 2016).

Sol-jel terimi, silika solüsyonu üzerine çalışmaları sırasında Graham tarafından 1864 yılında ilk kez kullanılmıştır. 1640 yılında silika malzemelerin alkali içerisinde çözüldüğünü ve asitleşme ile silika jel oluştuğu yani sodyum silikat (water glass) van Helmont tarafından keşfedilmiştir. 1912-1915 yılları arasında Patrick doktora çalışmalarını yaparken, sodyum silikattan (Na_2SiO_3) silika jel oluşumu sağlayan hızlı bir sol-jel yöntemi geliştirmiştir. 1931 yılında ise Kistler ilk kez yüksek derecede poroz silika (SiO_2) sentezini gerçekleştirmiştir. Silisik asidin $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ hidrolitik polikondensasyonu ile elde edilen jel süperkritik koşullarda kurutulmuş ve kurutma sonucu elde edilen bu jel 'aerojel' olarak isimlendirilmiştir (Criminna et al., 2013).

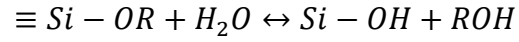
Sol-jel yaklaşımıyla enzim immobilizasyonu ilk kez Avnir et al. (1994) tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmada rhodamin 6G, silikon alkoksit olan tetramethoxysilane [TMOS, $\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$]'ın basit hidrolizi ile elde edilen silika matris içerisine immobilize edilmiş ve oda sıcaklığında kondensasyon reaksiyonunu gerçekleştirilmiştir (Avnir et al., 1994). Kısaca tipik enzim immobilizasyonu prosedürü şu şekilde gerçekleşir: Tetrametilortosilikat (TMOS) veya tetraetilortosilikat (TEOS) 'sol' içerisinde hidrolizlenir ve 'sol' içerisine enzim çözeltisinin eklenmesiyle kondensasyon reaksiyonu başlar ve enzimin silika matris içerisine enkapsüle olduğu 'jel' oluşumu gerçekleşir. Bu yöntemle silika matris 0.1-500 nm aralığında por ve kanallara sahip olur. Enkapsüle enzimin sızmasını engellemek için prosesin dikkatlice optimize edilmesi gerekir (Gill et al., 1999). Sol-jel prosesinin oda sıcaklığı koşullarında gerçekleşmesi enzim immobilizasyonu için bir avantajdır. Ayrıca, sol-jel türevli malzemelerin inert, hidrofilik ve ısıl olarak kararlı

olması enzimin doğal yapısının bozulmasını engellemektedir (Yang et al, 2009).

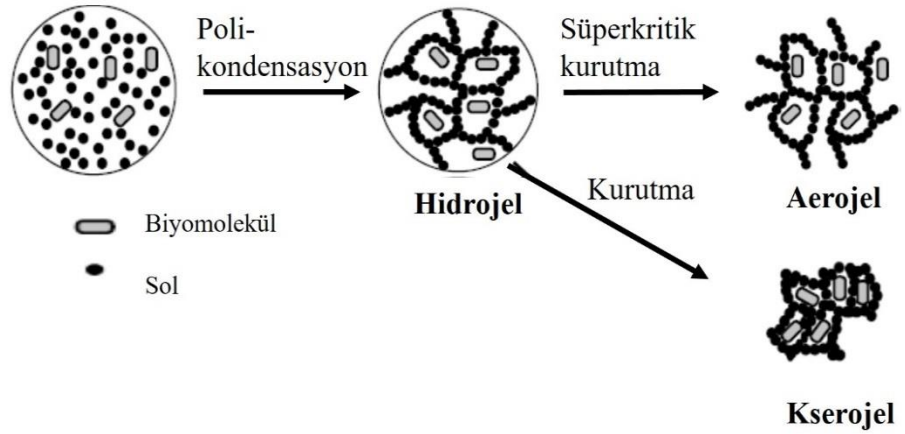
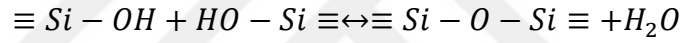
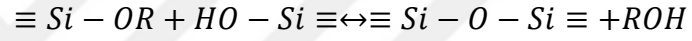
Sol-jel kimyası polimer ağının oluşumundan önce, metal alkoksitlerin $[M(OR)_x]$ katalizör (asit veya baz) ve solvent (su ve/veya alkol) varlığında hidroliz ve kondensasyon reaksiyonlarına dayanır. Polimerizasyon prosesinin ilk adımı hidroksil grupların alkoksil gruplarının yerini almasıyla oluşur (hidroliz). Kısmen hidrolizlenmiş öncül maddelerin kondensasyon reaksiyonu; dimerler, trimerler ve bunun sonucunda polimerik zincir oluşturur. Polimerik ağ gelişerek birkaç Angstrom çapında primer partikülleri oluşturur (sol). Kolloidal partiküller çap olarak büyümeye devam ederler ve kondensasyon reaksiyonu tarafından yüzeyinde hidroksil grupların oluşumu yoluyla sol partiküllerinin agregasyonu oluşur. Sonuç olarak, sol partikülleri birbirlerine kimyasal bağlar ile bağlanırlar. Bu proses, rijit üç boyutlu makro yapıyla jel oluşumunu sağlar. Monolit olarak adlandırılan bu matris yapı nm-çapında porlara sahiptir ve biyomoleküllerin enkapsülasyonunda kullanılmaktadır. Başlangıçta kırılabilir veya yarı esnek bir yapıya sahip olan jel; %50-80 oranlarında su içeriğine, 0.4-3.4 ml/g por hacmine, 4-200 nm por dağılımına ve 600-2100 m²/g yüzey alanına sahiptir. Islak silika jelin günlerden haftalara kadar sürebilen yaşlandırma işlemi ile ileri kondensasyon gerçekleşir ve polimer ağı güçlenir. Polimer kararlılığını arttıran yaşlandırma adımının ardından reaksiyona girmemiş öncül maddeler ve hapsedilmiş solventler kurutma prosesi ile polimerden uzaklaştırılır. Eğer öncül madde olarak silika alkoksitler kullanıldıysa ıslak jel hidrofilik Si-OH yan gruplar taşır ve bu nedenle tüm yapıya kapiler kuvvet uygular. Bu kuvvet solventin giderilmesine ve por duvarlarının büzülmesine neden olur ve bu monolit kserojel olarak adlandırılır. Aerojel olarak adlandırılan diğer bir tip monolit ise süperkritik koşullarda kurutularak elde edilir. Süperkritik kurutma yüzey gerilimine neden olmaz bu nedenle porlarda büzülme olmadan monolit kurutulur. Sol-jel materyalinin yapısal özellikleri sol-jel prosesi koşullarına (hidrolizlenen karışımın bileşimi, katalizör, pH) göre değişmektedir (Sakai-Kato and Ishikura, 2009; Morosanova, 2012; Fumes et al. 2015).

Reaksiyonlar aşağıda belirtilmiştir (Morosanova, 2012):

Hidroliz



Kondensasyon



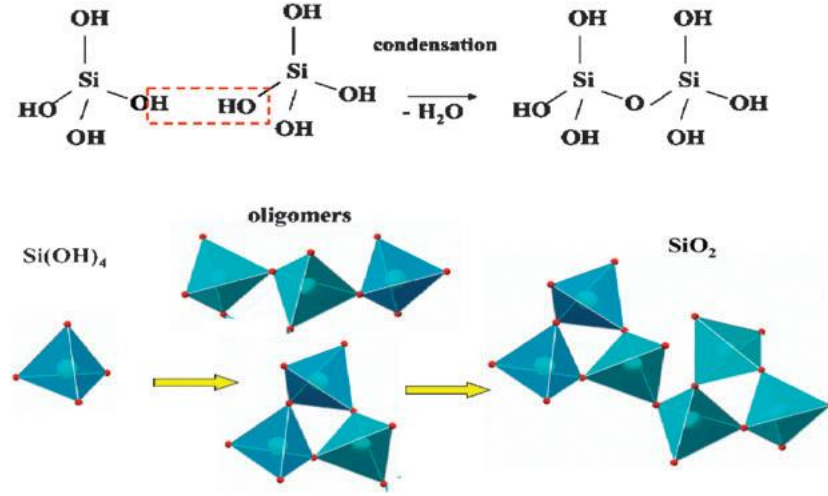
Şekil 2. 6 Sol-jel prosesinin şematik gösterimi ve jel matrisi içerisine enkapsülasyon (Sakai-Kato and Ishikura, 2009)

Silika sentezinde öncül madde seçimi önemlidir. Alkoksit tabanlı silika öncül maddeleri hidroliz ve polikondensasyon boyunca alkol gibi sitotoksik yan ürünler salmaktadır. Sentezde kullanılan solüsyonlar ise; organik olarak

modifiye silika öncül maddeler, sulu sodyum silikat, iyon değişimi ile elde edilmiş silisik asit veya silika nanopartiküllerle güçlendirilmiş makroskobik silika monolitlerdir (Desmet et al., 2015).

Mezoporoz silika sentezinde çoğunlukla tetraetilortosilikat (TEOS) ve sodyum silikat (Na_2SiO_3) gibi çözülebilir silikat bileşenler kullanılmaktadır. Na_2SiO_3 solüsyonu silanol gruplara sahipken, TEOS silanol grupların elde edilmesi için hidrolizlenmektedir ve miktarları önkondensasyon derecelerine göre değişmektedir (Melendez-Ortiz et al., 2013). Alkoksit öncül tabanlı silika jellere benzer olarak sodyum silikatın da basit nötrleşme veya biraz daha detaylandırılmış iki adımlı bir proses ile (asitleştirme/iyon değişimi ardından baz eklenmesi) jelleşmesi sağlanabilir.

Sodyum silikat (Na_2SiO_3) solüsyonunun nötrleştirilme yöntemine göre jelleşmesi genellikle solüsyon pH'ına ve kullanılan asitin tipine bağlı olarak hızlı (dakikalar içerisinde) gerçekleşmektedir. Bu yöntemde sodyum silikattan kalan sodyum iyonları prosesi zorlaştırmaktadır. Yapılan çalışmalar üretilen aerojellerin daha kırılğan olduğunu göstermiştir. İki adımlı sodyum silikat prosesinde ise sodyum silikattaki Na^+ iyonları ile H^+ iyonlarının yer değiştirmesiyle elde edilen silisik asit (H_2SiO_3) ve onun oligomerleri olan polisilisik asit içeren sol kullanılarak jel hazırlanmaktadır. Sodyum silikat solüsyonundaki sodyum iyonlarının uzaklaştırılması ise seyreltilmiş sodyum silikat solüsyonunun çok güçlü asidik, katyonik iyon-değiştirme resinden geçirilmesiyle sağlanmaktadır. Sodyum silikat solüsyonu pH'ı 11.5 iken iyon değişimi sonrası 2.5'a düşmektedir. İyon değişimi adımının ardından jelleşmenin başlatılması için baz eklenmektedir (Koebal and Zhao, 2012)



Şekil 2. 7 Silisik asitin kondensasyon reaksiyonu ile silikanın oluşumu (Nassif and Livage, 2011)

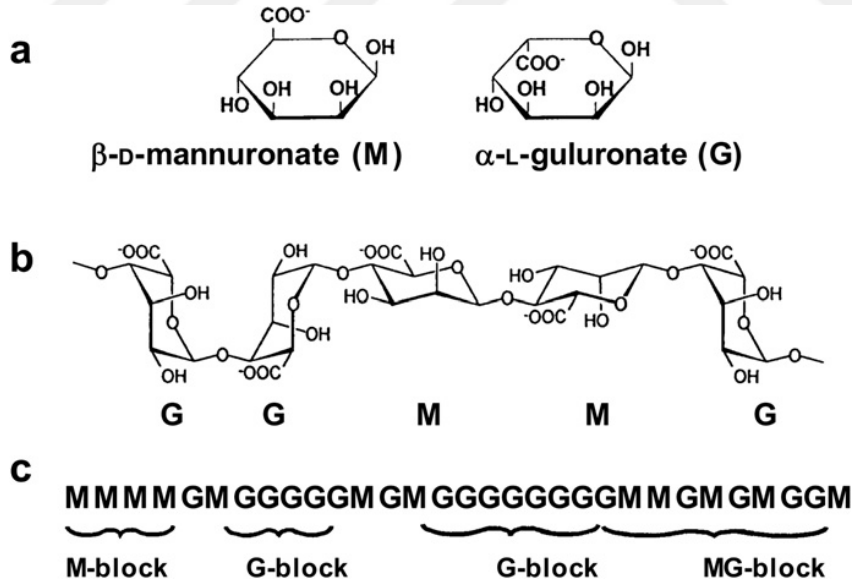
Amin ve poliaminler silisik asit polimerizasyonunu katalizlemektedir. Poli(allillamin), poli(lisin) veya poli(arjinin) gibi polipeptitler silisik asit çözeltisinin jelleşmesini düzenlemede etkilidir (Coradin and Livaage, 2001). Poliaminler, siloksan bağlarının oluşumunda ve flokulasyon ajanı olarak davranarak, silisik asitten silika oluşumunda rol alır (Sumper, 2004). Polikasyonların özellikle poliaminlerin, silisik asitin kondensasyon reaksiyonunu düzenlediği bir başka deyişle silisik asitin silika nanopartiküllere, partiküllerin de bir araya gelerek sol-jel materyallerin üretildiği bilinmektedir. Poliaminler, silika polikondensasyonunu hızını artırarak katalitik rol oynamasının yanında kompozit malzemelerin aktif bileşenleridir. Si-O gerilme bağı polikasyon yokluğunda 1085 cm⁻¹ 'den 1039 cm⁻¹ değerine değişmektedir. Saf silika jel küçük katyonlara karşı geçirgen iken silika polikasyon kompozitlerin küçük aniyonlara karşı seçici geçirgen davranmasında rol alır. Bu özelliği kompozit malzemenin sabit yüklü işaretinin negatiften pozitif zıt yönde hareket ettiğini gösteririr (Laugel et al., 2007).

Silisik asidin polimerizasyonu karışık bir proseştir; ilk olarak kararlı çekirdekler oluşur ve bu oluşum partiküllerin oluşumunu sağlar; partiküllerin kümelenmesi ise dallanmış ağısı yapıyı, daha büyük partikülleri ve diğer yapıları oluşturur. Polimerizasyonun ilk aşaması boyunca silisik asit

konsantrasyonu hızlıca azalırken sonraki aşamaları oluşturan silisik asitin çözünme ve çökme reaksiyonları baskınlaşır ve ardından olgunlaşma reaksiyonları takip eder. Polimerizasyonun profili ve ürün özellikleri çözeltinin pH'ına ve elektrolitler gibi katkı maddelerine bağlıdır (Annenkov et al., 2007).

- **Aljinat sol-jel**

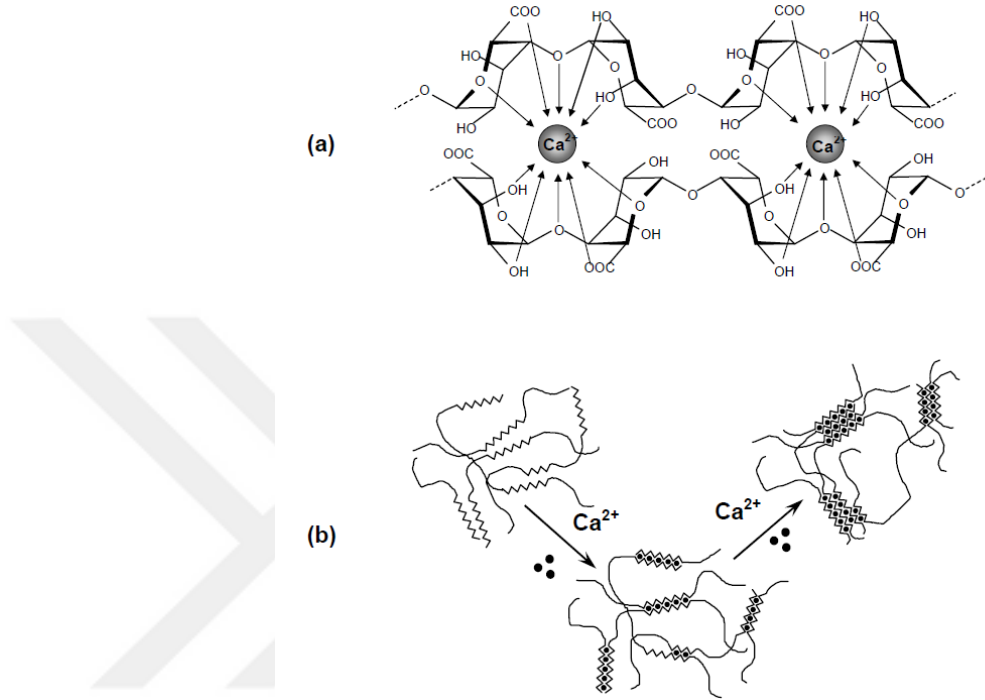
Aljinat, kahverengi deniz alglerinden ekstrakte edilen doğal bir polisakkarittir. Düz blok polianiyonik kopolimer ailesine ait olan aljinat, (1-4)-bağlı β -D-mannuronik asit (M birimi) ve (1-4)-linked α -L-guluronik asit (G birimi) bileşiminden oluşmuştur (Byron, 1991). Suda yüksek çözünürlüğe sahip ve biyobozunur olan aljinatın biyolojik uygulamalar için güvenliği bilinen testler tarafından kanıtlanmıştır (Bardaje et al., 2011). Çoğunlukla gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan aljinat; yüksek derecede hidrofilik, biyoyumlu, diğer polimerlere nazaran ekonomiktir (Sheridan et al., 2000).



Şekil 2. 8 Aljinatın yapısal karakteristiği: (a) aljinat monomerleri, (b) zincir yapısı, (c) blok dağılımı (Draget and Taylor, 2011)

Aljinatın en önemli fiziksel özelliği çok değerlikli katyonlara seçici olarak bağlanmasıdır ki bu özelliği jel oluşumunun temelini oluşturmaktadır. Jel oluşumu, pH düşürülerek veya iki değerlikli katyonlar (Ca^{+2} , Sr^{+2} , and

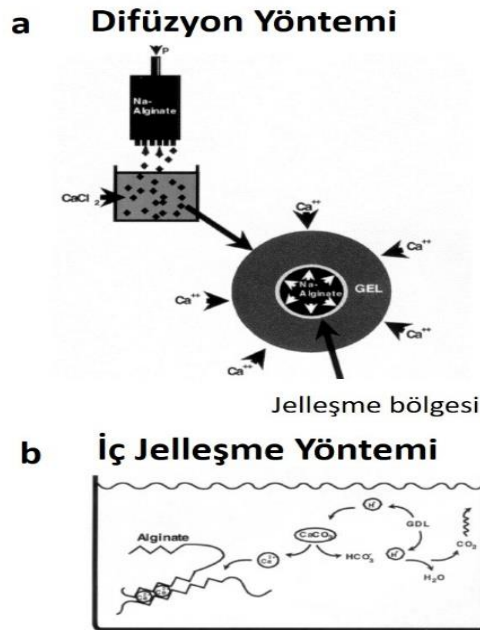
Ba²⁺) eklenerek sağlanabilir. Grant et al., tarafından sunulan modele göre iki değerlikli katyonlar, aljinat polimer zincirindeki negatif yüklü G blok çiftlerine çapraz bağlanarak 'egg-box' yapısını oluşturmasıyla jelleşmeyi sağlar (Şekil 2.8) (Grant et al., 1973; Smidsrod, 1973; Eral et al, 2014).



Şekil 2.9 İki değerlikli iyonların aljinata bağlanması – egg box modeli (a) İki değerlikli iyonların bağlanması (b) Zincirlerin lateral birleşmesi (Morch, 2008).

Aljinatın kalsiyum ile çapraz bağlanması iki yöntem ile gerçekleştirilmektedir; difüzyon ve iç jelleşme yöntemleri. Sodyum aljinat çözeltisi kalsiyum veya iki değerlikli katyonlarla temas ettiğinde hızlı, güçlü ve tersinmez bir şekilde jel oluşumu gerçekleşir. Jel oluşumu sıcaklıktan bağımsız olduğu için özeldir ve bunun sonucu olarak da ısıl kararlıdır. Difüzyon ile jelleşme yönteminde çapraz bağlayıcı iyonlar dıştaki haznedan aljinat çözeltisi içerisine difüze olur. Bu yöntemle elde edilen jellerde çoğunlukla heterojen bir yapı elde edilir. İç jelleşme yönteminde ise aljinat çözeltisi içerisine yerleştirilmiş iyon kaynağı kontrollü olarak uyarılır (pH veya iyon kaynağının çözünürlüğü) ve çapraz bağlayıcı iyonların çözelti içerisine salınır. Difüzyon yönteminde jelin kalınlığı boyunca Ca²⁺ iyon konsantrasyon gradyenti oluşur bir başka deyişle yüksek konsantrasyon

yüzeyde bulunur ve jelin merkezine doğru azalır, iç jelleşme yönteminde ise homojen iyon dağılımına sahip jel elde edilir (Skjåk-Bræk et al., 1989; Morch, 2008; Draget and Taylor, 2011). Difüzyon yönteminde tipik olarak jeller Na-aljinat çözeltisinin kalsiyum klorit (CaCl_2) çözeltisi içerisine damlatılması ile oluşturulmaktadır. Bu yöntem çoğunlukla aljinat jel boncuklar oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu hızlı proses jel içerisindeki jelleşme iyonlarının difüzyonu tarafından sınırlandırılmaktadır. Bu yüzden farklı şekil ve yapılarda jel üretimi için çok kullanışlı bir yöntem değildir (Larsen et al., 2015). İç jelleşme yönteminde ise kalsiyum kaynağı olarak çoğunlukla CaCO_3 gibi çözünmeyen kalsiyum tuzu kullanılmaktadır. Suda düşük çözünürlüğe sahip olan CaCO_3 jelleşme oluşmadan önce aljinat çözeltisinde homojen dağılımı sağlar. D-glucono-d-lactone (GDL) gibi yavaşça hidrolizleyen lakton sayesinde değişimi gerçekleştirir ve içerideki Ca^{+2} iyonları salımını uyarır ve jel oluşumunu sağlar (Kuo and Ma, 2001; Draget et al., 2005).



Şekil 2. 10 İmmobilizasyon yöntemi ile örneklendirilmiş difüzyon yöntemi (a) ve CaCO_3/GDL tekniği ile örneklendirilmiş iç jelleşme yöntemi (b) arasındaki temel farklılıklar (Draget et al., 2005).

CaCl_2 , aljinatın iyonik olarak çapraz bağlanmasında çok sık kullanılan ajanlardan biridir. Fakat sulu çözeltilerde hızlı çözünmesi nedeniyle hızlı jelleşmeye neden olur ve jelleşmenin kontrol edilmesine izin vermez. Yavaş ve kontrollü jelleşme için kullanılan yöntemlerden bir tanesi fosfat içeren tampon (örn; soyum heksametafosfat) kullanılarak jelleşmenin gerçekleştirilmesidir. Tampondaki fosfat grupları, kalsiyum iyonları ile reaksiyondaki aljinatın karboksil grupları ile yarışır ve jelleşmeyi geciktirir. Kalsiyum sülfat (CaSO_4) ve kalsiyum karbonat (CaCO_3) düşük çözünürlüğe sahip olduğu için jelleşme hızını azaltarak, aljinat jellerle çalışma süresini artırır ve böylece hücre veya diğer biyomoleküllerin taşıyıcı sıvıya eklenmesine izin verir. Buna ek olarak jelleşme oluşmadan önce aljinat çözeltisi içerisinde homojen dağılım sağlar (Kuo and Ma, 2001; Lee and Mooney, 2012).

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak matriks yapıda bulunması gereken en önemli özelliklerden biri küçük substrat ve ürünlerin difüzyonunu sağlamasıdır. Özellikle aljinat boncuklar enzim immobilizasyonu için iyi tasarlanmış bir matriks yapıdır ve enzim immobilizasyonunda en çok çalışılan matrislerden biri olmuştur. Fakat enzim immobilizasyonunda aljinat boncuklarla çalışılırken çeşitli sorunlarla karşılaşmıştır. Aljinat boncuklardaki Ca^{+2} iyonları ile fosfat tamponu içerisindeki Na^{+2} iyonlarının değişimi sonucu şişme gerçekleşir ve enzim sızmasına neden olur. Bu problemlere takiben reaksiyon ortamındaki enzimin tekrar kullanımında inhibisyon oluşur. Tüm bu problemlerin üstesinden gelmek için aljinat mikrokürelerin mekanik dayanımını artırıcı çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Son yıllarda özellikle aljinatın mekanik özelliklerini geliştirmek amacıyla organik-inorganik silika tabanlı hibrit malzemeler üzerine çalışılmaktadır (Sanchez et al., 2005; Hwang et al., 2011).

- **Organik-inorganik hibrit malzemelere enzim immobilizasyonu**

Organik ve inorganik bileşenlerden oluşan hibrit malzemeler üstün özelliklere sahiptir. Bu özellikler; dayanım, esneklik, yoğrulabilirlik gibi mekanik özellikleri geliştirir ve uygun mikroçevrede kimyasal bağlanmayı sağlar. Hızlı ve basit olarak hazırlanabilen organik-inorganik hibrit malzemeler hafiflik, esneklik ve iyi kalıplanabilirlik gibi organik malzemelerin avantajlarına sahip olmasının yanısıra inorganik materyallerin de yüksek mukavemet, ısıl kararlılığı ve kimyasal direnç gibi avantajlarına da sahip iyi derecede biyouyumluluk gösteren bir malzeme türüdür. Organik-inorganik hibrit malzelerin sağladığı diğer önemli avantaj ise organik ve inorganik monolitlere göre daha yüksek spesifik yüzey alanına ve poroz hacme sahip olmasıdır. Etkili bir difüzyon için poroz hacmin artışı anahtar faktördür. Difüzyon artışı ise enzim immobilizasyonu verimliliğini açısından önemlidir. Tüm bu özellikler organik-inorganik hibrit materyalleri enzim immobilizasyonunda üstün bir destek materyali olma özelliği kazandırır (Ma et al., 2008; Hwang and Gu, 2013, Ruan et al., 2014).

Enzim immobilizasyonunda organik-inorganik hibrit malzeme kullanımı ilk olarak aljinat bonculardaki mekanik özellikleri geliştirmek amacıyla Lloyd-George and Chang, (1995) tarafından kullanılmıştır. Bu çalışmada TMOS ($\text{Si}(\text{OCH}_3)_4$) silika öncül maddesi olarak kullanılmış ve aljinat jel içerisinde çok miktarda koloidal silika partikülü iyi bir şekilde dağıtılmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde organik-inorganik hibrit malzemeler aljinat boncuklarda karşılaşılan sorunlara çözüm üretmek amacıyla çalışılmıştır ve çoğunlukla difüzyon ile jelleşme yöntemi kullanılmıştır (Xu et al., 2006; Allouche et al., 2006; Zhang et al., 2008; Macori et al., 2009; Ai et al., 2013).

Wang et al., (2012) aljinat/protamin/silika hibrit kapsül içerisinde lakkaz immobilize ederek klasik yöntemlerle karşılaşılan sorunların çözümü için farklı bir yöntemle yaklaşmıştır. Ai et al., (2013) hibrit böhmit/silika boncuk içerisinde maya alkol dehidrojenaz (YADH)'i immobilize ederek çoğunlukla aljinat boncuklarda karşılaşılan sızma probleminin önüne geçmeyi amaçlamışlardır ve ümit verici sonuçlar elde etmişlerdir.

Enzim immobilizasyonu için geliştirilen organik-inorganik hibrit jel formülasyonlarında karşılaşılan başlıca sorun; silika partiküllerin homojen dağılımının sağlanamamasından dolayı kümelenmesi ve bu kümelenmeden dolayı poroz yapının bozulması ve substrat ve ürünlerin difüzyonunun gerçekleşmemesidir (Lu et al., 2006).

2.3 Mikroakışkan Sistemler

2.3.1 Mikroakışkan sistemler ve temel terimler

Mikroakışkanlar, akışkan akışını kontrol eden ve çalıştıran milimetre ölçeğinden daha küçük cihaz ve yöntemler olarak tanımlanmaktadır (Stone et al. 2004). Mikroakışkanlar son 20 yıldır yaşam bilimleri ve tıp alanlarındaki güçlü teknolojisini ve birçok uygulamasıyla dikkat çekmektedir (Qasaimeh et al., 2012)

Mikroakışkan teknolojileri analizlerde; çok küçük miktarda örnek ve reaktif kullanımı, yüksek çözünürlük ve hassaslıkta ayırma ve tayin, düşük maliyet, analizlerin kısa sürede gerçekleştirilmesi, küçük alan kaplamaları gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır (Whitesides, 2006).

Mikroakışkan sistemlerin önemli bileşenleri; boru işlevi gören mikrokanallar, vana, karıştırıcılar ve pompalardır (Whitesides, 2006). Performans ölçütleri ise boyut, ölü hacim, kanal boyutları, çalıştırma basıncı ve ölçeklenebilirlik olarak sıralanabilir. Bu performans ölçütlerinin önemi uygulamaya göre değişmektedir (Studer et al., 2004).

Mikroakışkan kanal boyutları genellikle 1-1000 µm genişlik ve yükseklik aralığındadır. Sıklıkla sadece bir kanal boyutu bu aralıkta olur ve laminar akış karakteristiğini sağlamada yeterlidir (Weigl et al., 2003). Mikroakışkan cihazlarda laminar akış düşük Reynolds sayısı değerlerinde (~0.01-100) oluşmaktadır (Song et al., 2003).

Akışkan akışı iki rejim ile karakterize edilmektedir: laminar ve türbülent. Laminar akış paralel akış sonucu yüksek oranda tahmin edilebilir, model profiline sahiptir. Aksine, türbülent akış ise tahmin etmesi, sayısal olarak modellemesinin zor olmasının yanında burgaç ve vorteks gibi karışık akış deseni içerir. Buna karşın sistemde akış tipine karar vermede dikkat edilen en önemli parametreler; kullanılan akışkanın tipi, akışkana kanalların ölçeği ve kanallardaki akışkanın hızıdır. Bu parametreler arasındaki ilişki boyutsuz bir sayı olan Reynolds sayısı (Re) ile tanımlanmaktadır. Reynold sayısı; kanallardaki akışkan akışının eylemsizlik ve akışmazlık kuvvetlerinin oranı olarak tanımlanmaktadır. Düşük Reynold sayısı laminardır, akışkan akışları birbirine birbirine paraleldir, sadece konvektif ve moleküler difüzyon ile karışma gerçekleşir. Laminar akışta viskoz güçler hakimdir. Sınır koşulları sabit olduğunda akışkan hızı tüm bölgede zamanla değişmez. Sadece akışkan akışı yönünde konvektif kütle transferi vardır. Yüksek Reynold sayısına sahip akış ise türbülent akıştır ve akışta eylemsizlik hakimdir. Çeşitli boyutlarda akışkan parselleri tüm alan ve zamanda eş zamanlı rastlantısal olarak hareket sağlar. Tüm yönlerde önemli konvektif kütle taşınımı oluşur. Laminar ve türbülent akış arasındaki taşınım $Re=2000$ 'in üzerinde iç akışta gerçekleşir. Re sayısı;

$$Re = v \frac{DH}{\mu}$$

v ; kanallardaki akışkanın ortalama hızı, μ ; akışkanın viskozitesi ve D_H ; hidrolik çaptır. Reynold sayısı kanal geometrisine bağlı olarak akış türbülentten laminar akıma değişiklik gösterir (Weigl et al., 2005). Düz pompalarda bu geçiş $Re \sim 2100$ 'de oluşur. Düşük Reynold sayılarında ise

(~40-300) ediler oluşur. Kapilerdeki sıvı akışlarında, sıvı akış hızı $0,5 \text{ m s}^{-1}$ 'dir ve çoğunlukla düşük Re sayısına sahip olur dolayısıyla laminar akıştır. İki veya daha fazla akım dar bir kanalda bir arada paralel olarak fakat türbülent olarak karışmadan akar. Bileşenlerinin tek karışım mekanizması sadece akış ara yüzeyleri boyunca difüzyondur. Laminar akış kapilerdeki reaktiflerin konumsal dağıtımının kontrolüne izin verir. Laminar akış sistemleri reaksiyonların özellikle kapilerin belli bir bölgesinde; akış ve kapilerin iç yüzeyi arasında veya bitişik akıştaki ara yüzey arasında gerçekleşmesini sağlar (Kenis et al., 2000).

Mikroakışkan kanallardaki ağ, kimyasal ve biyolojik analizde veya sentezde küçük hacim reaksiyon maddelerinin yönlendirilmesinde kullanıldığı için uzaklık-zaman (distance-to-time) dönüşümü için çok önemlidir. Fakat mikroakışkan sistemlerde akışın laminar olması dönüşümün gerçekleşmesini zorlaştırmaktadır. İlk olarak kanala enjekte edilen iki madde laminar akıştan dolayı karışımı sadece difüzyon ile sağlanmaktadır. Problemin çözümü için yavaş karıştırma üzerine çalışılmaktadır. Türbülent akış hızlı karıştırma ve düşük dağılımı sağlar fakat türbülent akım sadece yüksek akış hızlarında ($\sim 10 \text{ m/s}^{-1}$) gerçekleşir. Bu akış hızının gerçekleşmesi için de yüksek miktarda örnek tüketimi ve yüksek basınç gerekir. Bu sorunu çözümü için tapa (plug) tasarımları üzerinde çalışılmaktadır (Song et al., 2003). Ayrıca küçük ölçekte karıştırma zor olsa da mikrokarıştırmacı tasarımı ve peristaltik mekanizmaları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Stone and Kim, 2001).

2.3.2 Mikroakışkan sistemlerin üretim yöntemleri

Poly(dimetilsiloksan) (PDMS), fabrikasyonunun kolaylığı (hızlı prototiplenmesi, sızdırmazlığı) UV-görünür bölgelerde geçirgen olması, kimyasal olarak inert olması, düşük polariteye sahip olması, düşük elektriksel iletkenliğe ve esnekliğe sahip olması gibi birçok karakteristik özelliğe sahip olmasından dolayı mikroakışkan cihazların

fabrikasyonlarında kullanışlı bir polimerdir. Diğer malzemelerle karşılaştırıldığında (ör: cam veya silikon) fabrikasyon maliyetinin de düşük olmasından dolayı mikrocihazların ve MEMs fabrikasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (Lee et al., 2003).

Silikon tabanlı substratların bağlanması (PDMS-PDMS homojen birleşme ve PDMS-cam, PDMS-quartz ve PDMS-silikon heterojen birleşme olarak) plazma uygulanarak yüzey hidroksilasyonu sağlanmasının ardından ısıtma uygulanarak gerçekleştirilmektedir. Kolay ve dirençli bağlanma sağlamanın yanı sıra, PDMS'in fabrikasyonun basit olması, yüksek optik geçirgenliğe ve düşük maliyete sahip olması gibi avantajları vardır (Tang and Lee, 2010). Ayrıca PDMS'in temiz oda koşulları dışarısında kolay ve hızlı olarak üretilebilmesi, biyouyumlu olması ve esnekliğe sahip olması açısından da BioMEMS uygulamalarında da tercih edilmektedir (Song et al., 2008).

PDMS, tekrarlayan $-\text{OSi}(\text{CH}_3)_2-$ birimlerden oluşmaktadır. Kimyasal yapısı hidrofobik yüzeye ($\theta_a^{\text{H}_2\text{O}} = 108^\circ$) neden olur. Bu yüzeyin havaya veya oksijen plazmaya maruz kalması, metil grupların uzaklaştırılarak, silanol grupların oluşmasını sağlar ve yüzeyi hidrofilik yapar. Plazma uygulanmış PDMS yüzeyi, su veya polar organik çözücülerle temas ettirilerek hidrofilik yüzeyin devamlılığı sağlanabilir. Aksi takdirde, yüzeyin hava ile teması kesilirse yüzeyde yeni hidrofobik gruplar oluşur ve yüzey serbest enerjisinin düşmesine neden olur (Lee et al., 2003).

PDMS'e alternatif olarak plastik malzemeler düşük üretim maliyetleri ve mikroelektronik teknoloji ile birleştirilebilme potansiyeline sahip olmasından dolayı kullanılmaktadır. Mikrokanallar kolaylıkla sıcak gofraj (hot embossing), enjeksiyon kalıplama yöntemleri ile üretilmektedir ve yüzeyi PDMS'e göre daha az hidrofobiktir ki bu özelliği mikrokanallara sıvı girişinde avantaj sağlamaktadır. Birçok avantajına rağmen iki homojen veya heterojen plastik malzemenin bağlanması karmaşık bağlanma prosedürleri içermektedir (Tang and Lee, 2010).

2.3.3 Mikroakışkan sistemlerde enzimatik reaksiyon

Mikroreaktörler, küçük miktarda akışkan ve reaktiflerin konumsal ve zamana bağlı idaresini sağlayan seri halindeki çeşitli geometrilere birbirine bağlanmış küçük (10-100 μm) kanallar içerir (Mason et al., 2007). Büyük ölçek reaktörler ile karşılaştırıldığında mikroreaktörler; küçük reaktör ölçeğine sahip olmasının yanı sıra yüksek yüzey-hacim oranı (10.000-50.000 m^2/m^3) ile sürekli çalışma moduna sahip olması sonucu, gelişmiş karıştırma ve enerji verimliliği, ısı kontrolünün sağlanması, ölçeklendirilebilirlik, güvenli ve daha az atık oluşumu gibi stratejik avantajlar sağlamaktadır (Wohlgemuth et al., 2015).

Mikroreaktörler, kimyasal maddelerin ve farmasötiklerin üretim proseslerinde yıllardır kullanılmaktadır. Mikroreaktörler geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında kimyasal reaksiyonların gerçekleştirilmesinde birçok avantaj sağlarlar. En önemli avantajı; geleneksel kesikli yöntemlerle sağlanamayan hızlı ısı değişimi ve hızlı kütle transferini sağlamalarıdır. Mikroakışkan sistemlerde laminar akış oluşması reaksiyon koşullarının ve sürenin kontrolü açısından önemli bir özelliktir. Bunlara ek olarak mikrokanallı reaksiyon sistemleri geniş yüzey alanı ve arayüzey alanına sahiptir ve bu özelliği ekstraksiyon ve katalitik reaksiyonlar gibi birçok kimyasal prosese avantaj sağlar (Miyazaki and Maeda, 2006; Kurt et al., 2015). Mikroreaktör uygulamalarının endüstriye katkıları; çalışmadaki sonuçların üretime hızlı transferi, düşük maliyetle üretime başlama, üretim kapasitesinde kolayca ölçek büyütme, daha küçük tesis hacmi, taşıma, malzeme ve enerji için daha düşük maliyet, market taleplerine daha esnek cevap vermesi olarak belirtilmektedir (Urban et al, 2006).

Enzimatik mikroreaktörler; biyokataliz uygulamaları ve biyokimyasal analizlerdeki rutin çalışmaları gerçekleştirmek için geliştirilmiştir. Enzimatik mikroreaktörler analitik uygulamalarda, birleştirilmiş sistemlerin genellikle 'lab-on-a-chip' veya 'micro total analysis systems' (μTAS) olarak adlandırılan sistemlerin bir bileşeni olarak kullanılmaktadır (Vilkner et al.,

2004). İlk enzimatik mikroreaktörler 1970 ve 1980'lerde üretilse de pratik uygulamaları 1990'ların sonunda gelişmiştir.

Enzimatik mikroreaktörlerin analitik uygulamaları iki sınıf olarak bölünebilir. Birincisi, biyokatalizde analitin kolaylıkla ölçülebilir forma dönüştürülmesinde kullanılır. Birçok mikroreaktör ölçülebilen peptitlere dönüşümü sağlayan proteinlerin sindirimi için tasarlanmaktadır. İkinci olarak ise mikroreaktörler substratların, enzimlerin taranması ve kinetik karakteristiklerinin araştırılması amacıyla tasarlanmaktadır. Sürekli akışlı mikroakışkan sistemlerde enzim kinetiğinin nicel olarak ölçülmesi örnek olarak verilebilir. Mikroreaktörler enzimlerin immobilize edilmesi veya reaksiyon bölgesine solüsyonun enjekte edilmesiyle kullanılabilir; bu yaklaşımlar sırasıyla heterojen ve homojen biyokataliz olarak adlandırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda çoğunlukla immobilize enzim kullanılmaktadır. Mikroölçekteki homojen biyokataliz uygulamaya örnek olarak elektroforetik mikroanaliz (EMMA: electrophoretically mediated microanalysis) verilebilir. Bu uygulama ilk olarak Bao ve Regnier (1992) tarafından tanımlanmıştır ve EMMA olarak tanımlanmıştır. Bu yöntem karmaşık görülmüş katalizör ve substrat arasındaki temas süresinde kontrol sağlar. Fakat, bu yöntem sadece hızlı katalitik yöntemler için uygundur çünkü temas süresi genellikle milisaniye ve saniye arasında değişmektedir. Avantajı ise kullanılan enzim miktarının oldukça küçük miktarlarda olmasıdır (Urban et al., 2006).

İmmobilize enzim içeren mikroreaktörler ise dört ana kategoriye ayrılabilir (Lauranti and Vianna Jr., 2015):

- a) Yüzeyle immobilize enzimler: enzimler mikroreaktör yüzeyine bağlanmıştır (kapilerin iç kanalının aktive edilmesi ile) ve reaktif akışına maruz kalırlar;
- b) Enzimle aktive edilmiş boncuklar: poroz boncukların yeterli bir miktarı öncelikle enzimle fonksiyonel hale getirilir ve mikroreaktör haznesine doldurulur (dolgu yatak);

- c) Enzim içeren monolitler: mezo veya makro- poroz monolitler dirençli bir tabaka ile kaplanır veya direk olarak mikrokanal içerisinde hazırlanır ve enzim ile fonksiyonelize edilir;
- d) Membranlar: enzimler seçici ultrafiltrasyon membran üzerine immobilize edilirler.

Herhangi bir tip mikroreaktörde, enzimler katı destek üzerine adsorpsiyon, kovalent immobilizasyon veya hapsedme yöntemlerinden herhangi biriyle immobilize edilirler (Lauranti and Vianna Jr., 2015). Fakat direk yüzeye tutturma ve dolgulu yatak yaklaşımı uzun difüzyon süresi, yapısal konformasyonun değişmesiyle enzim aktivitesinin kaybı, kovalent bağlama, çapraz bağlama ve sonucu sterik engel oluşması gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Yüksek miktarda enzim yüklemek oluşan sınırlamaları genellikle azaltmaktadır. Ayrıca dolgulu yatak mikroreaktörler genellikle yüksek geri basınca sahiptir bu da sızma veya tıkama problemlerine yol açar ve kararlı koşullarda çalışmayı zorlaştırır. Yüksek geri basıncı düşürmek için özel reaksiyon haznesi tasarlanmasına neden olmuştur. Son yıllarda geliştirilen monolit mikroreaktör cihazlar iyi porozite kontrolü sağlama ve düşük geri basınca sahip olmasından dolayı; protein, peptit ve nükleik asitlerin analizinde dolgulu yatak mikroreaktörlere alternatif olmuştur (He et al., 2009).

3 MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Aljinat-Silika Hibrit Boncuk ve Monolitlerin Hazırlanması

3.1.1 Difüzyon jelleşme yöntemi ile aljinat-silika hibrit boncukların hazırlanması

Desmet et al. (2014) metodu kullanılarak aljinat-silika hibrit boncuklar hazırlanmıştır. Silisik asit (1.5 M), Na-silikatın (1.5 M, assay 25.5–28.5%, Merck) resin (Amberlite IR 120, H form, Acros) kullanılarak asit iyon iyon değişimi gerçekleştirilerek hazırlanmıştır (Rooke et al., 2010). 5 ml silisik asit (0.75M, pH: 5.1) ve 5 g Na-aljinat (% 3 w/w) (alginic acid sodium salt, from brown algae, Sigma Aldrich) vialde birleştirilmiş ve manyetik karıştırıcıda homojen hale getirilmiştir. İnkübasyon solüsyonu olarak PDADMAC (Polidialdimetil amonyum klorid) (% 0.4 w/w) (Sigma Aldrich) ve CaCl_2 (20 mM) (Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Oda sıcaklığında 3 saatlik inkübasyona bırakılmıştır (Desmet et al., 2014).

3.1.2 İç jelleşme yöntemi ile aljinat-silika hibrit monolit formülasyonunun hazırlanması

Desmet et al. (2014) metodu modifiye edilerek iç jelleşme yöntemine dayalı aljinat-silika hibrit jel formülasyonu geliştirilmiştir. 5 g Na-aljinat (% 2-3 w/w) çözeltisine 0.1825 g/g aljinat oranında CaCO_3 (Sigma Aldrich) eklenmiş ve bir saat boyunca manyetik karıştırıcıda homojen hale getirilmiştir. Silisik asit (1.5 M), H form resin ile Na-silikattan iyon değişimi gerçekleştirilerek hazırlanmıştır (Rooke et al., 2010). 5 ml silisik asit (0.75M, pH:3,8) ve 30 μl Polidialdimetil amonyum klorid (PDADMAC) (% 0.4 w/w) başka bir vialde homojen hale getirilmiştir ve pH 4.8±0.1'e ayarlanmıştır. Ardından 3 ml D-glucono- δ -lactone (GDL) (100 mM) Na-aljinat-Ca-karbonat solüsyonuna eklenmiş (Akay et al., 2017) ve homojen hale gelmesinin ardından silisik asit-PDADMAC solüsyonu

eklenerek manyetik karıştırıcıda homojen hale getirilmiştir. Hazırlanan jel, jelleşmenin tamamlanması için 24 saat yaşlanmaya bırakılmıştır.

Çizelge 3. 1 Aljinat-silika hibrit monolit formülasyonunun optimizasyonu

	Na-aljinat	Ca karbonat/Na-aljinat	Gdl (100 mM)	Silisik asit (0.75M)	PDADMAC (%0.4)
D1	5 g (%3)	0.1825 g	3 ml	5 ml	-
D2	5 g (%3)	0.1825 g	3 ml	5 ml	30 µl
D3	5 g (%2)	0.1825 g	3 ml	5 ml	-
D4	5 g (%2)	0.1825 g	3 ml	5 ml	30 µl

3.2 Aljinat-silika Hibrit Boncuk ve Monolitlerin Kurutulması

Hazırlanan aljinat-silika hibrit jellerin karakterizasyon analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için kurutma işlemi uygulanmıştır ve hibrit aerogel elde edilmiştir. Süperkritik CO₂ ile kurutma işlemi ile kurutmada jel özellikleri büyük ölçüde korunduğu için bu yöntem başvurulmuştur. Kurutma öncesi 12 saat aryla sırasıyla %10 (v/v), %30 (v/v), %50 (v/v), %70 (v/v), %99 (v/v) etanol ile solvent değişimi yapılmıştır. Aljinat-silika hibrit jeller 40°C'de, 120 bar basınç, 10 g/dk CO₂ hızında 4 saat boyunca süperkritik CO₂ cihazında kurutulmuştur (SFE 100 System, Thar Instruments, Inc., UK, 2006) (Cumana et al., 2014).

3.3 Aljinat-silika Hibrit Jellerin Karakterizasyonu

3.3.1 Por büyüklüğü, por hacmi ve yüzey alanı analizi (BET)

Mikromeritics Gemini V cihazı kullanılarak, Brunauer–Emmett–Teller (BET) and Barrette–Joyner–Halenda (BJH) teorisine göre nitrojen

adsorpsiyon ve desorpsiyon metodu ile hibrit aerjel örneklerinin por büyüklüğü ve hacmi, yüzey alanı analizleri 70 °C, 1200 dk degas koşullarında yapılmıştır.

Analiz İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

3.3.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Aljinat-silika hibrit boncuk aerjellerin morfolojik incelemeleri SEM cihazı (FEI Quanta 250 FEG) ile gerçekleştirilmiştir. Aerjellerden ince kesitler alınarak cihazın örnek haznesine yerleştirildikten sonra vakum altında altın kaplaması (Emitech K550X sputter coater) yapılmıştır. Ardından farklı büyütme oranlarında görüntüler alınmıştır.

Aljinat-silika hibrit boncuk aerjellerin SEM analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

Aljinat-silika hibrit monolit aerjellerin morfolojik incelemeleri SEM cihazı (Jeol 6060) ve EDS/mapping ile gerçekleştirilmiştir. Aerjellerden ince kesitler alınarak cihazın örnek haznesine yerleştirildikten sonra vakum altında altın kaplaması (Quorum Technologies SC 7620) yapılmıştır. Ardından farklı büyütme oranlarında görüntüler alınmıştır.

Aljinat-silika hibrit monolit aerjellerin SEM analizleri Dokuz Eylül Üniversitesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümünde yapılmıştır.

3.3.3 Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi analizi

Aljinat-silika hibrit jellerdeki moleküler bağ karakterizasyonu Fourier Perkin Elmer Spectrum 100 cihazı ile yapılmıştır. Analiz işlemi Ege Üniversitesi Tekstil Mühendisliği Bölümünde gerçekleştirilmiştir.

3.3.4 Aljinat-silika hibrit monolitlerin büzülme testi

Silika jeller zamanla hacimlerini kaybederek büzülme eğilimi göstermektedir. Buna karşın aljinat jeller tampon veya yaşlandırma ortamı içerisinde beklediği sürece şişme eğilimi göstererek hacmi artmaktadır. Na-Ca asetat tamponun aljinat-silika hibrit monolitler üzerine etkisini görmek amacıyla yaşlandırma süresi sonunda monolitler Na-Ca asetat tampon içerine alınarak 37 °C’de inkübe edilmiştir. Aljinat-silika hibrit monolitlerin büzülme oranını belirlemek için ise 5 gün boyunca monolitın çapı ve yüksekliği kumpas ile llmştir. lm sonucu büzülmeyi belirlemek için şu formül kullanılmıştır.

$$\text{Büzülme (\%)} = \frac{\text{Hacim}}{\text{Başlangıçtaki hacmi}} \times 100$$

3.4 Enzim Kinetiği alışmaları

3.4.1 Serbest enzim aktivitesinin belirlenmesi

% 99 saflıkta, toz formunda bulunan beta-glukozidaz enzimi (Sigma Aldrich, 6.85 U/mg) 1 mg tartılarak 100 mM, 1 ml Ca-Na asetat tamponu (pH=4.8) içerisinde zlmştir. Hazırlanan stok enzim 25 kat seyreltilerek kullanılmıştır. Substrat olarak olarak 4-nitrofenil β-D-glukopiranosit (pNPG) (Alfa Aesar) kullanılmıştır. Substrat konsantrasyonları 1 mM, 2 mM, 6 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM olarak belirlenmiştir. Reaksiyon ortamını 100 µl beta-glukozidaz enzimi ve 900 µl Ca-Na asetat tamponu olmak üzere toplam hacim 1 ml’dir. Reaksiyon; 37 °C, 100 rpm karıştırma hızında ve 15 dk’da gerçekleştirilmiştir. 15 dakika sonunda, reaksiyonu durdurmak için 5 ml Na₂CO₃ (100 mM) eklenmiştir. Ardından rnekler spektrofotometrede (Amersham Biosciences Ultraspec 1100 pro) 420 nm’de köre karşı absorbans değerleri okunmuştur.

Absorbans değerlerine karşılık gelen dđnüşüm ürünü (4-para-nitrofenol) konsantrasyonunu belirlemek için 4-para-nitrofenol (PNP) (Sigma Aldrich, lot:MKBK3825V) kalibrasyon denklemi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi için PNP konsantrasyonu 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardan 1 ml alınıp 5 ml Na-karbonat eklenerek ve 420 nm dalga boyunda köre (1ml Na-Ca asetat tampon, 5ml Na-karbonat) karşı spektrofotometre ile absorbans ölçümleri yapılmıştır. Absorbans değerlerine karşılık gelen dđnüşüm ürünün (4-para-nitrofenol) konsantrasyonunu belirlemek için 4-para-nitrofenol kalibrasyon denklemi oluşturulmuştur.

Standart eğriden elde edilen denklemden yararlanılarak konsantrasyon hesabı yapılmış ve ardından aşağıda verilen denklem ile enzim aktivitesi hesaplanmıştır. Enzim aktivitesi ünite (U) olarak belirlenmiştir.

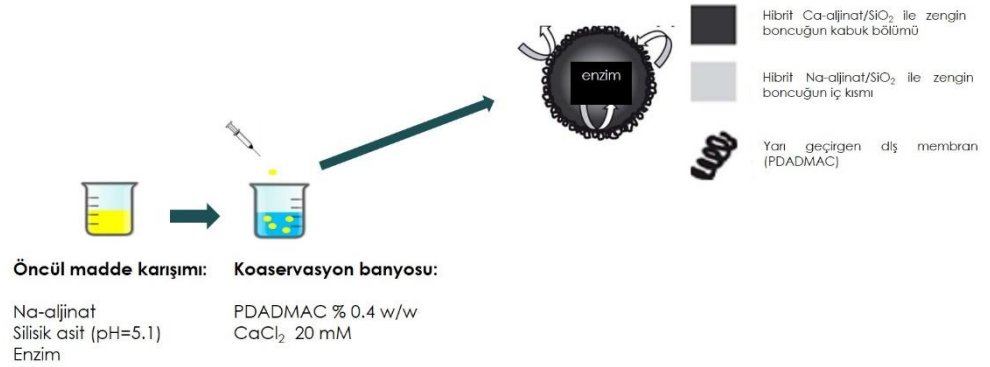
Enzim aktivitesi

$$= \frac{(Abs/eğim) \times toplam\ reaksiyon\ hacmi}{reaksiyon\ süresi \times enzim\ miktarı} \times enzim\ seyreltme\ faktörü$$

3.4.2 Aljinat-silika hibrit boncuklarda immobilize enzim aktivitesinin belirlenmesi

İçerisine 4 µg β glikozidaz (Sigma Aldrich, 6.85 U/mg) enzimi immobilize edilmiş aljinat-silika hibrit boncuklar 3 saatlik inkübasyonun ardından 15 ml'lik falkonlara alınmış ve üzerine 750 µl pNPG (Sigma Aldrich) substratı eklenerek 15 dakika 37° C ve 100 rpm'de karıştırmalı inkübatör içerisinde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Substrat konsantrasyonları 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM olarak belirlenmiştir. Reaksiyon; 37 °C, 100 rpm karıştırma hızında ve 15 dk'da gerçekleştirilmiştir. 15 dakika sonunda, reaksiyonu durdurmak için 5 ml Na-karbonat (100 mM) eklenmiştir. Homojenize edilmiş reaksiyon ortamı filtreden geçirildikten sonra

spektrofotometrede (Amersham Biosciences Ultraspec 1100 pro) 420 nm’de köre karşı absorbens değeri okunmuştur.



Şekil 3. 1 Aljinat-silika hibrit boncuklara β glikozidaz enziminin immobilizasyonu (Desmet et al. (2015)’ten modifiye ve adapte edilmiştir)

Absorbans değeri karşılık gelen dönüşüm ürünü (4-para-nitrofenol) konsantrasyonunu belirlemek için 4-para-nitrofenol kalibrasyon denklemi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi için PNP konsantrasyonu 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardan 1,5 ml alınıp 5 ml Na-karbonat (100 mM) eklenerek ve 420 nm dalga boyunda köre (1,5 ml Na-Ca asetat tampon, 5ml Na-karbonat) karşı spektrofotometre ile absorbens ölçümleri yapılmıştır.

Hazırlanan pnp konsantrasyon değeri karşılık gelen absorbens değeri ile standart eğri denklemi oluşturulmuştur. Enzim aktivite hesabı aşağıdaki denklem kullanılarak yapılmıştır.

$$\text{Enzim aktivitesi} = \frac{(\text{Abs}/\text{eğim}) \times \text{toplam reaksiyon hacmi}}{\text{reaksiyon süresi} \times \text{enzim miktarı}} \times \text{enzim seyreltme faktörü}$$

3.4.3 Kinetik parametrelerin belirlenmesi (V_{max} , K_m)

Serbest enzim ve immobilize enzimin farklı substrat konsantrasyonlarına karşılık gelen reaksiyon hızları belirlenmiştir. Substrat konsantrasyonları serbest enzim için, 1 mM, 2 mM, 6 mM, 10 mM, 15mM, 20 mM, 25mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM; immobilize enzim için; 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM olarak belirlenmiştir. Belirlenen substrat konsantrasyonlarına karşılık gelen enzim aktiviteleri hesaplanıp, Michaelis-Menten ve Lineaver- burk grafiği çizilerek kinetik parametreler (V_{max} ve K_m değerleri) belirlenmiştir.

3.4.4 İç jelleşme yöntemi ile sentezlenen aljinat-silika hibrit monolitlerdeki immobilize enzim aktivitesinin belirlenmesi

D3 ve D4 kodlu aljinat-silika hibrit monolitlere 4 μ g β glikozidaz enzimi immobilize edilmiş ve 24 saat yaşlanmaya bırakılmıştır. Yaşlanmanın ardından monolitler 15 ml'lik falkonlara alınmış ve üzerine 20 mM, 750 μ l pNPG substratı eklenerek 15 dakika 37° C ve 100 rpm'de karıştırılmalı inkübatör içerisinde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. 15 dakika sonunda, reaksiyonu durdurmak için 5 ml Na_2CO_3 (100 mM) eklenmiştir. Homojenize edilmiş reaksiyon ortamı filtreden geçirildikten sonra spektrofotometrede (Amersham Biosciences Ultraspec 1100 pro) 420 nm'de köre karşı absorbans değerleri okunmuştur. Enzim immobilize edilen aljinat-silika hibrit boncukların enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan 4-para-nitrofenol kalibrasyon denklemi kullanılarak hibrit monolitlerdeki enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

3.4.5 Enzim miktarının optimize edilmesi

D4 kodlu aljinat-silika hibrit monolite 20, 40 ve 60 μ g enzim immobilize edilmiş ve 24 saat yaşlanmaya bırakılmıştır. Yaşlanmanın ardından monolitler 15 ml'lik falkonlara alınmış ve üzerine 20 mM, 750 μ l pNPG substratı eklenerek 15 dakika 37° C ve 100 rpm'de karıştırılmalı inkübatör içerisinde reaksiyon gerçekleştirilmiştir. 15 dakika sonunda, reaksiyonu durdurmak için 5 ml Na_2CO_3

(100 mM) eklenmiştir. Homojenize edilmiş reaksiyon ortamı filtreden geçirildikten sonra spektrofotometrede (Amersham Biosciences Ultraspec 1100 pro) 420 nm'de köre karşı absorbans değerleri okunmuştur. Enzim immobilize edilen aljinat-silika hibrit boncukların enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanılan 4-para-nitrofenol kalibrasyon denklemi kullanılarak hibrit monolitlerdeki enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

Farklı enzim miktarının aktivite ve % dönüşüme etkisi belirlenmiştir. Aynı zamanda belirtilen enzim miktarlarında serbest enzim aktivitesi de hesaplanarak nispi aktivite değerleri hesaplanmıştır.

3.4.6 Aljinat-silika hibrit monolitte 5 günlük enzim kararlılığının belirlenmesi

D4 kodlu aljinat-silika hibrit monolitlerin zamana bağlı olarak enzim aktivitesini belirlemek amacıyla 40 µg enzim immobilize edilmiş, 37 °C'de inkübe edilen monolitlerin pNPG substratı ile reaksiyonu gerçekleştirilerek 5 gün boyunca aktiviteleri ölçülmüştür.

3.4.7 Mikroreaktörde pNPG'nin enzimatik hidrolizi

Mikroakışkan sistemlerin enzimatik dönüşüm üzerine etkilerini incelemek ve monolitik sistemlerle karşılaştırmak amacıyla 40 µg β-glukozidaz (Sigma Aldrich, 6.85 U/mg) enzimi aljinat-silika hibrit jele immobilize edilerek, 100 µl hacmindeki PDMS mikroreaktöre enjekte edilmiştir ve 24 saat yaşlandırmaya bırakılmıştır. Ardından, 1 µl/dk sürekli akış hızında mikropompa (New Era Pump Systems, Inc.) ile 20 mM pNPG substratı 37 °C'de PDMS mikroreaktöre beslenmiştir. Substratın kalış sürelerine bağlı olarak; 100., 200. ve 300. dakikalarda, 20. ve 24. saatlerde örneklerden alınarak 420 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Amersham Biosciences Ultraspec 1100 pro) okunmuştur.

Absorbans değerlerine karşılık gelen dönüşüm ürünü (4-para-nitrofenol) konsantrasyonunu belirlemek için 4-para-nitrofenol kalibrasyon denklemi

oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisi için pnp konsantrasyonu 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 0.5 mM, 0.6 olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardan 0,3 ml alınıp 1 ml Na-karbonat (100 mM) eklenerek ve 420 nm dalga boyunda köre (0,3 ml Na-Ca asetat tampon, 1 ml Na-karbonat) karşı spektrofotometre ile absorbans ölçümleri yapılmıştır.

Hazırlanan PNP konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans değerleri ile standart eğri denklemi oluşturulmuştur. Enzim aktivite hesabı denklem kullanılarak yapılmıştır.

3.5 *Ruscus Aculeatus* Ekstresinin Kimyasal ve Enzimatik Hidrolizi

3.5.1 *Ruscus Aculeatus* ekstresinin asit hidrolizi

Asit hidrolizi için *Ruscus aculeatus* metanol ekstresinden (1 mg/ml) 4 ml alınmış 40 ml %5'lik HCl içeren ortamda çözülerek kaynama sıcaklığında 4 saat hidrolize bırakılmıştır. Reaksiyon sonunda örneklerin Etilasetat (EtOAc) ile partiyonu yapılmış ve reaksiyon ürünlerinin organik faza alınması sağlanmıştır.

3.5.2 *Ruscus Aculeatus* ekstresinin bazik hidrolizi

Bazik hidrolizi için *Ruscus aculeatus* metanol ekstresinden (1 mg/ml) 4 ml alınarak 40 ml % 5'lik NaOH (suda) içeren ortamda çözülerek kaynama sıcaklığında 4 saat hidrolize edilmiş ve aynı prosedür izlenerek partiyonu gerçekleştirilmiştir.

3.5.3 *Ruscus Aculeatus* ekstresinin enzimatik hidrolizi

Ruscus Aculeatus ekstresinin saponinlerinin enzimatik hidrolizi için β -glukozidaz enzimi (G 4511-250U) 1mg/ml olacak şekilde 100 mM sitrat tamponu pH 4.5 içerisinde hazırlanmıştır. Substrat miktarı sabit (1 mg/ml, 200 μ l ekstre) tutularak, farklı enzim miktarları (400 μ l, 800 μ l ve 1600 μ l) ile 37°C'de 150 rpm karıştırma hızında 4 gün boyunca enzimatik hidroliz

gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için reaksiyon hacmine eşit hacimde etil asetat eklenmiş ve üst faz alınarak evaporatörde uçurulmuştur. Kalan kısım 1 ml metanol içerisinde çözülerek HPLC-ELSD analizi için hazırlanmıştır.

Ruscus aculeatus ekstresinin mikroreaktördeki enzimatik hidrolizi ile karşılaştırma yapabilmek için 900 µl substrat (1mg/ml) , 100 µl enzim (0.4 mg/ml) ile reaksiyon ortamı 1 ml olacak şekilde hazırlanarak 37°C’de 150 rpm karıştırma hızında 24 saatlik enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için reaksiyon hacmine eşit hacimde etil asetat eklenmiş ve üst faz alınarak evaporatörde uçurulmuştur. Kalan kısım 1 ml metanol içerisinde çözülerek HPLC-ELSD analizi için hazırlanmıştır.

3.6 *Ruscus Aculeatus* Ekstresinin Mikroreaktörde Enzimatik Hidrolizi

3.6.1 *Ruscus Aculeatus* ekstresinin enzimatik hidrolizinde

kullanılacak PDMS mikroreaktörlerin üretimi

Enzimatik hidrolizde kullanılacak 100 µl hacme sahip olan polidimetilsiloksan (PDMS) mikroreaktörler kalıp esaslı üretim yöntemine göre üretilmiştir. PDMS polimeri silikon elastomer viskoz sıvısı (Sylgard™ 184 Silicone Elastomer) onun çapraz bağlayıcısı (Sylgard 184 Curing Agent) ile sırasıyla 10:1 (w/w) oranında petri içerisinde karıştırılmış ve homojen hale getirilmiştir. Petri içerisindeki PDMS karışımındaki hava kabarcıkları, petrinin vakum pompasının bağlı olan desikatör içerisine yerleştirilerek vakum uygulayarak uzaklaştırılmıştır. Ardından PDMS karışımı kalıba dökülüp tekrar desikatör içerisine yerleştirilmiş ve kalıp yüzeyindeki hava kabarcıkları uzaklaştırılmıştır. Kalıp içerisindeki PDMS karışımının katılaşması için 80 °C’de 1 saat 30 dk boyunca etüvde bekletilmiştir. Ardından bistüri yardımıyla katılaşmış PDMS (negatif kalıp) kesilip kalıptan çıkartılmıştır.



Şekil 3. 2 Mikroreaktör üretiminde kullanılan kalıp

Yapıştırma işleminde kullanılacak lam yüzeyi aktifleştirme işlemi öncesinde sırasıyla aseton, izopropil alkol ve distile su ile yıkanarak üzerindeki kalıntılar uzaklaştırılmıştır ve hava tabancası ile kurutulmuştur.

Plazma temizleyici (Harrick Plazma, PDC-32G) ile yüzey aktifleştirme işlemi için PDMS negatif kalıbının ve temizlenen lamın yapıştırılacak yüzeyleri üste gelecek şekilde cihazın haznesine yerleştirilmiştir.

Plazma temizleyicinin kapağının kapatılmasını ardından cihaza entegre olan vakum pompası çalıştırılmış ve yüzey aktifleştirme işlemi cihazın maksimum çalışma gücünde (RF3) plazma oluşumunu gösteren pembe ışığın görülmesinden itibaren 30 saniye boyunca uygulanmıştır. Cihazın haznesinden çıkartılan lam ve PDMS negatif kalıbı yüzeylerine temas edilmeden yapıştırılır. Yapıştırma işleminin ardından kanallara distile su basılarak aktifleştirme işleminde sorun olup olmadığı kontrol edilmiştir.



Şekil 3. 3 100 µl hacme sahip PDMS mikroreaktör

3.6.2 Mikroreaktöre yükleme yapılması ve *Ruscus Aculeatus* ekstresinin mikroreaktörde hidrolizi

Enzimatik reaksiyonun mikroakışkan sistem içerisinde gerçekleştirilmesi amacıyla 40 µg β-glukozidaz enzimi jel içerisine immobilize edilerek 100 µl hacimli, kıvrımlı kanal geometrisine sahip mikroreaktöre yüklenmiştir. Yükleme hacimleri monolite yüklenen hacimlerin küçültülmesiyle belirlenmiştir. *Ruscus aculeatus* ekstresinin hidrolizini gerçekleştirmek amacıyla D4 kodlu organik-inorganik aljinat-silika hibrit jelle enzim immobilize edilerek mikroreaktörde enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 2Aljinat-silika hibrit jel içeren enzimatik mikroreaktörün hazırlanması

Aljinat-silika hibrit jel	86,7 µl
Enzim (3 mg/ml)	13,3 µl
Toplam	100 µl

Aljinat-silika hibrit jeller Çizelge 3.2’de verilen miktarlarda, 3 ml hacmine sahip şırınga içerisine çekilerek, 5 saniye vorteks uygulandıktan sonra mikroreaktör içerisine yüklenmiştir. Yükleme yapılırken toplam 100 µl hacmi mikroreaktöre tamamen boşaltılmadığından bileşenler aynı oranlarda artırılarak yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Mikroreaktöre yükleme esnasında kanallarda hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir.

Mikroreaktöre yüklenen jelin 24 saatlik yaşlandırılmasının ardından substrat mikropompa (New Era Pump Systems, Inc.) ile sürekli olarak beslenmiştir. Mikroreaktör mikropompaya silikon boru ile bağlanmıştır ve borudan sızıntıların önlenmesi için giriş ve çıkış akım boru çevreleri silikon ile yapıştırılmıştır. *Ruscus aculeatus* ekstresi 1 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanmış ve 3 ml’lik şırıngadan mikropompa ile 1 µl/dk akış hızında 37 °C’de mikroreaktöre beslenmiştir.

3.6.3 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi analizlerinin yapılması

Asidik, bazik ve serbest enzimatik hidrolizlerin analizini sağlamak için ortak bir HPLC metodu (Çizelge 3.3) geliştirilmiştir. Bu metotta kolon olarak Phenomenex Luna C18 (150mmx4.6mmx5 μ m), kolon sıcaklığı 30⁰C, akış hızı 1ml/dak olarak seçilmiştir. ELS dedektör için de şu parametreler belirlenmiştir; Spray Chamber sıcaklığı 40⁰C, Drift Tube sıcaklığı 70 ⁰C, azot gazı basıncı 40 psi.

Çizelge 3. 3 Asidik, bazik ve enzimatik hidroliz örneklerinin analizi için geliştirilen HPLC- ELSD metodu

Zaman (dak)	0	15	20	21	24
%A (Su)	90	5	5	90	90
%B (ACN)	10	95	95	10	10

Mikroreaktörde gerçekleştirilen enzimatik hidrolizin analizi için HPLC-ELSD analizleri Thermo Scientific Finnigan Surveyor sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon için Softa ELS dedektör kullanılmıştır. Analiz 1 ml/dakika akış hızında, 30 °C Kolon (Phenomenex C18 150x4.6x5u) sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 4 Mikroreaktörde yapılan hidrolizlerin analizinde kullanılan HPLC metodu

Zaman	Su (%)	Asetonitril (%)
0	95	5
2,5	95	5
5	60	40
15	40	60
25	5	95
28	5	95
28,5	95	5
30	95	5

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Aljinat-Silika Hibrit Boncuk ve Monolitlerin Hazırlanması,

Karakterizasyonu

Aljinat-silika hibrit boncuklar tek adımdan oluşan bir proses ile Na-aljinat ve silisik asit karışımı iki değerlikli tuz ve poliamin içeren inkübasyon solüsyonuna içerisine şırınga ile damlatılarak sentezlenmiştir.

Sodyum aljinatın guluronik monomerleri Ca^{+2} iyonları gibi iki değerlikli iyonlar varlığında çapraz bağlanmaya maruz kalır (egg-box modeli). Bu aşamada sıvı sodyum aljinat solüsyonundan kalsiyum aljinat jele geçiş gerçekleşir. $CaCl_2$ boncuklarda optik geçirgenliği sağlamanın yanısıra, boncukların kümelenmesini engellemektedir (Desmet et al., 2015).

Silisik asit öncül maddesi pH değişimi etkisiyle hızlı hidroliz ve polimerizasyonu sağlayarak 3 boyutlu silika jel yapısını oluşturur. Bununla beraber polikasyon olarak polidialidimetilamonyum klorid (PDADMAC) pıhtılaştırıcı ajan olarak kullanılır. Yüzeyinde pozitif yüke sahip olan bu polimer negatif yüklü silika ile etkileşime girer ve mikroskobik etkileşimler makroskobik küre-benzeri morfoloji oluşumuna neden olur ve dış yüzeyde polikasyonca zengin yarı-geçirgen dış membran oluşur. Polikasyonun ikinci rolü ise silika jel ağının oluşumunu katalizlemesidir. Ayrıca aljinat kapsüllerin ve aljinat-silika boncukların şişmesi ek bir mekanik direnç sağlayan polikasyon eklenmesiyle sağlanabilir (Coradin and Livaage, 2001; Sumper, 2004, Desmet et al., 2015).

İlk olarak, aljinat ve silika kullanılarak Fukushima et al. (1988) tarafından enzim veya mikroorganizma immobilizasyonu bir yöntem geliştirilmiştir. Literatürde aljinat-silika kullanılarak çeşitli yöntemler yayınlanmıştır (Coradin et al., 2001; Coradin et al., 2003; Sakai et al., 2001; 2002a; 2002b; 2003; Carturan et al., 2004). Bu yöntemlerde çekirdek- kabuk

yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Yani içte aljinat dışarıda silika olacak şekilde hibrit boncuklar geliştirilmiştir.



Şekil 4. 1 Süperkritik CO₂ ile kurutma sonrası aljinat-silika hibrit boncuklar

Desmet et al. (2014), tarafından geliştirilen bu yöntemde ise çekirdek-kabuk yönteminden farklı olarak boncuğun iç kısmında aljinat ve silikanın homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Aljinat-silika hibrit boncukların çekirdek kısmını sodyum aljinat-silika kompoziti oluşturmaktadır. İç kısmı çevreleyen orta tabaka ise kalsiyum aljinat-silika bulunur ve en dış tabakada polikasyon PDADMAC bulunur. Amaç, immobilizasyon materyallerinin tasarlanmasında en önemli parametrelerden biri olan porozitenin geliştirilerek yeterli difüzyonun sağlanmasıdır.

Bu tez çalışmasında amaç, immobilizasyonda kullanılacak boncuk veya monolitlerin mikroakışkan sistemler için tasarlanmasıdır. Yani mikrokanallar içerisinde jelin homojen olarak dağılımının sağlanmasıdır. Difüzyonla jelleşme yönteminde hazırlanan jel mikroreaktöre yüklenmesinin ardından mikroreaktör PDADMAC ve CaCl₂ içeren solüsyon içerisine bırakılarak jelleşmenin gerçekleşmesi sağlanmıştır. Fakat bu yöntem ile 100 µl hacmine sahip bir mikroreaktörde Ca⁺² iyonlarının difüzyonla mikroreaktörün iç kısımlarına ulaşması zaman almaktadır ve homojenliği sağlamak zordur.

Karşılaşılan bu sorunun önüne geçmek için Desmet et al. (2014)'un metodu modifiye edilmiş iç jelleşme yöntemi kullanılarak aljinat-silika hibrit monolit sentezi gerçekleştirilmiştir. Difüzyon jelleşmeden farklı olarak sodyum aljinatın jelleşmesini sağlayan çapraz bağlayıcı iyon kaynağı CaCl₂

yerine CaCO_3 kullanılmıştır. Yeni formülasyonda CaCO_3 tercih edilmesinin nedeni, CaCl_2 hızlı jelleşmeye neden olması ve bu nedenden dolayı jelin iç kısımlarına doğru polimer konsantrasyon gradyenti oluşmasıdır. Bunun aksine, CaCO_3 saf suda çok düşük çözünürlüğe sahiptir. Bu özelliği sayesinde jelleşme gerçekleşmeden önce aljinat çözeltisi içerisinde homojen dağılımı gerçekleşmektedir ve jelleşmenin ardından tekdüze bir yapı elde edilmekte mekaniksel olarak da bir bütünlük sağlanmaktadır (Kuo and Ma, 2001). CaCO_3 sodyum aljinat çözeltisi içerisinde homojen olarak hazırlanmasının ardından taze hazırlanmış glukon-d-lakton (GDL) karışıma eklenmiştir. GDL'in yavaş hidrolizi ile pH düşer ve kalsiyum tuzları çözünerek kalsiyum aljinat jel formunu oluşturur (Holte et al., 2005).



Şekil 4. 2 Süperkritik CO_2 kurutma sonrası aljinat-silika hibrit monolit

İç jelleşme yöntemiyle hazırlana jellerde CaCO_3 / Na-aljinat oranı 0.1825'te sabit tutulmuştur (Gurikov et al., 2015). Na-aljinat konsantrasyonu %2 ve 3 (w/w) oranlarında hazırlanarak aljinat-silika hibrit monolite morfolojik ve yüzey alanı açısından etkisi incelenmiştir.

Literatür incelendiğinde, Kuo and Ma (2001) GDL miktarının optimizasyonunu CaCO_3 -GDL oranı sabit tutularak gerçekleştirmişlerdir. Akay et al., (2017) ise farklı konsantrasyonlarda GDL hazırlanarak jelleşme süresine etkisini incelemiştir. Bu çalışmada, farklı konsantrasyonlar içerisinde enzim immobilizasyonu ve mikroreaktöre jelin yüklenmesi için yeterli zaman tanıdığı için 100 mM konsantrasyonunda GDL kullanılmıştır.

Silisik asitten 3 boyutlu silika jel oluşumunun katalizleyen PDADMAC ise difüzyon yönteminde olduğu gibi % 0.4 konsantrasyonunda sabit tutularak farklı miktarlardaki PDADMAC'in silisik asitin jelleşme hızına etkisi incelenmiş ve formülasyonda 1 ml silisik asit için 0,006 ml PDADMAC (%0.4) oranı kullanılmıştır. Silisik asit (0.75 M)-PDADMAC (%0.4) karışımın pH'ı 4.8 ± 0.1 'e 0.1 M NaOH ile ayarlanmıştır.

4.1.1 Por büyüklüğü, por hacmi ve yüzey alanı (BET) analizi sonuçları

Çizelge 4.1 Aljinat-silika hibrit boncukların BET yüzey alanı ve BJH por hacmi değerleri

Boncuk Bileşimi	İnkübasyon süresi (saat)	BET yüzey alanı (m ² /g)	Por hacmi (cm ³ /g)
Aljinat/SiO ₂ /PDADMAC	3	692	4.14
Aljinat/SiO ₂ /PDADMAC	12	776	4.48
Aljinat/SiO ₂ /PDADMAC	24	192	1.13

Difüzyon jelleşme yöntemine göre hazırlanan aljinat-silika hibrit boncuklara ait BET yüzey alanı ve BJH por hacmi değerleri Çizelge 4.1. 'de verilmiştir. Yüzey alanı değerleri BET teorisine, gözenek hacmi ve gözenek çapı ise BJH teorisine göre incelenmiştir. Sonuçlar literatürdeki değerler ile karşılaştırıldığında beklenen değerlerdir. İnkübasyon süresi yüzey alanı ve por çapı açısından 3. ve 12. saatte önemli bir etki göstermezken, 24. saat sonundaki değerlerde düşüş gözlenmiştir. Desmet et al. (2015) farklı inkübasyon süreleri (1-1440 dk) arasında yaptıkları analizler sonucunda BET yüzey alanının 592-629 m²g⁻¹, por hacimlerinin ise 1.26-3.02 cm³g⁻¹ arasında değiştiğini belirtmiştir. Hibrit boncuklardaki 24. saat sonundaki değerlerdeki düşüşün sebebi zamanla boncuklarda büzülme görülmesi olabilir. Desmet et al. (2015) 1. dakikadaki boncuk çapının 4.6 mm, 24. saatteki boncuk çapının ise 3.1 mm olduğunu belirtmiştir.

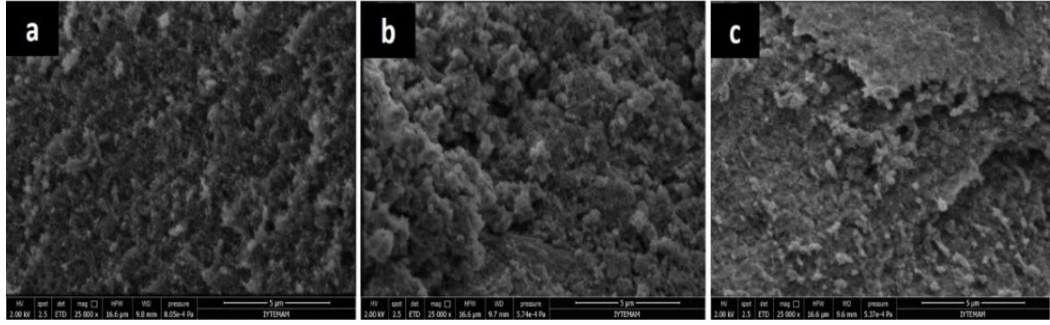
Çizelge 4. 2 Aljinat-silika hibrit monolitlerin BET yüzey alanı ve BJH por hacmi değerleri

Örnek	Monolit Bileşimi	Yaşlanma süresi (saat)	BET yüzey alanı (m^2g^{-1})	Por hacmi (cm^3g^{-1})
D1	Aljinat (% 3) / $CaCO_3/SiO_2$	24	600	1.76
D2	Aljinat (%3)/ $CaCO_3/SiO_2/PDADMAC$	24	655	1.71
D3	Aljinat (% 2)/ $CaCO_3/SiO_2$	24	682	1.80
D4	Aljinat (%2)/ $CaCO_3/SiO_2/PDADMAC$	24	682	1.68

İç jelleşme yöntemine göre hazırlanan aljinat-silika hibrit monolitlere ait BET yüzey alanı ve BJH por hacmi değerleri Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Burada farklı aljinat konsantrasyonlarının (%2-3 w/w) ve PDADMAC (%0.4 w/w) varlığının yüzey alanı ve por hacmi üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar arasında çok önemli bir fark olmasada düşük aljinat konsantrasyonunun (%2 w/w) yüzey alanı ve por hacmi açısından olumlu etkide bulunduğu görülmektedir. PDADMAC (%0.4 w/w) varlığı yüzey alanına olumlu yönde etki ettiği görülürken, por hacminde az miktarda düşüşe neden olduğu görülmektedir. Fakat bu düşüş istatistiksel olarak çok bir önem taşımamaktadır.

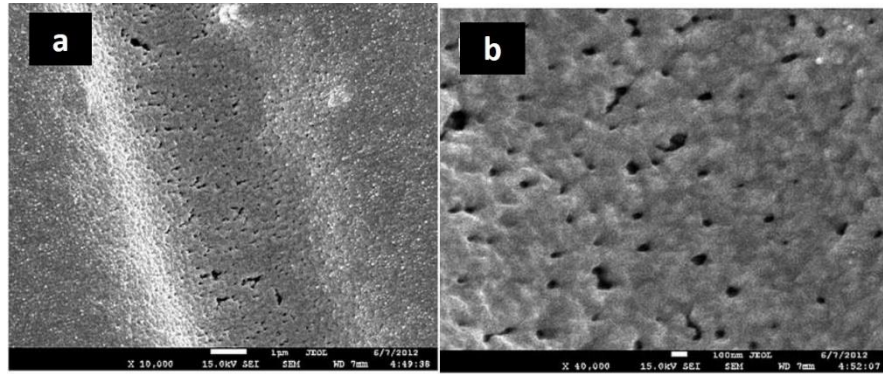
Chernev et al. (2006), inorganik öncül madde olarak tetrametilortosilika (TMOS), etiltrimetiloksisilan (ETMS); organik madde olarak Ca-aljinat kullanarak hibrit jel hazırlamıştır. Hibrit jellerin yüzey alanları $70-290 m^2g^{-1}$ arasında değişmektedir. Xu and Lee (2008) ait çalışmada tetrametilortosilika (TMOS) kullanarak hazırlanan silika tabanlı organik inorganik monolitlerin yüzey alanı $467 m^2g^{-1}$ olarak belirtilmiştir. İç jelleşme yöntemi ile hazırlanan aljinat-silika hibrit monolitler literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında elde edilen yüzey alanı değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Farklı yöntemlerle hazırlanan aljinat-silika hibrit boncuk ve monolitler yüzey alanı ve por hacmi açısından enzim immobilizasyonu için uygun immobilizasyon materyalleri oldukları sonucuna ulaşılmaktadır.

4.1.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi sonuçları

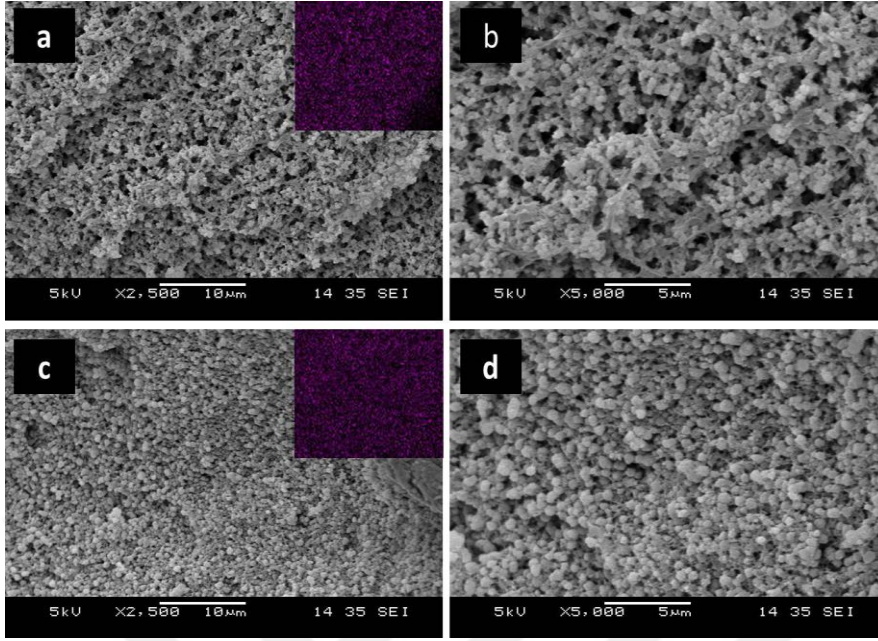


Şekil 4. 3 Difüzyon jelleşme yöntemi ile hazırlanmış boncukların SEM görüntüleri a) Aljinat/SiO₂/PDADMAC, inkübasyon süresi 3 saat (büyütme: 25000x), b) Aljinat/SiO₂/PDADMAC, inkübasyon süresi 12 saat, (büyütme: 25000x) c) Aljinat/SiO₂/PDADMAC, inkübasyon süresi 24 saat (büyütme: 25000x)

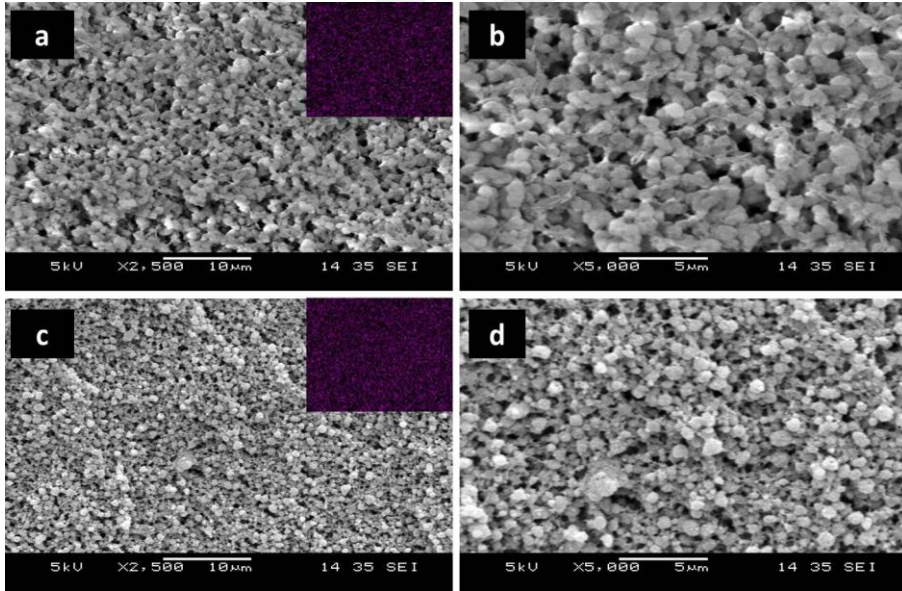
Difüzyon ile jelleşme yöntemi ile hazırlanmış aljinat-silika hibrit boncukların farklı inkübasyon sürelerine ait SEM görüntüleri Şekil 4.3. 'de verilmiştir. Hibrit boncuklarda poroz yapı net olarak gözlenememiştir. Şekil 4.4.'te aynı yöntemle hazırlanmış hibrit boncuklara ait SEM görüntülerinde 40000x'de poroz yapı gözlenebilmiştir (Desmet et al., 2014). Dış yüzeyin PDADMAC ile kaplandığı fakat poroz yapıyı koruduğu görülmektedir. Şekil 4.3.'deki boncuklarda poroz yapının görülememesinin nedeni SEM cihazının hassasiyetiyle ilgili bir durum olduğu düşünülmektedir çünkü BET analizi sonuçları hibrit boncuklarda poroz yapının varlığını desteklemektedir. Kullanılan SEM cihazında görüntünün alındığı en yüksek büyütmeye 25000x'dir.



Şekil 4. 4 Difüzyon jelleşme yöntemi ile hazırlanmış aljinat/ SiO₂/PDADMAC boncukların SEM görüntüleri (a) büyütmeye:10000x (b) büyütmeye:40000x (Desmet et al., 2014)

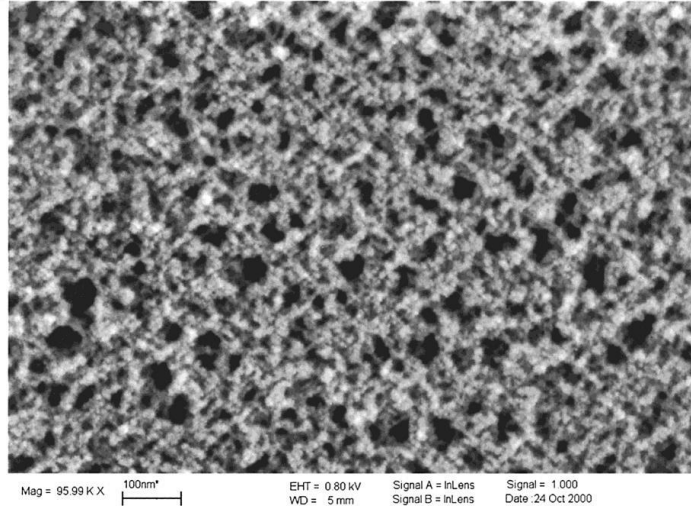


Şekil 4. 5 Hibrit monolitlerin SEM görüntüleri (a,b,c,d) ve EDS/mapping görüntüleri (a,c)
 a) Aljinat (% 3 w/w) /CaCO₃/SiO₂ (büyütme: 2500x) b) Aljinat (%3w/w)/CaCO₃/SiO₂
 (büyütme:5000x) c) Aljinat (%3 w/w)/ CaCO₃/SiO₂ /PDADMAC (büyütme:2500x)
 d)Aljinat(%3w/w)/CaCO₃/SiO₂/PDADMAC ,(büyütme:5000x)



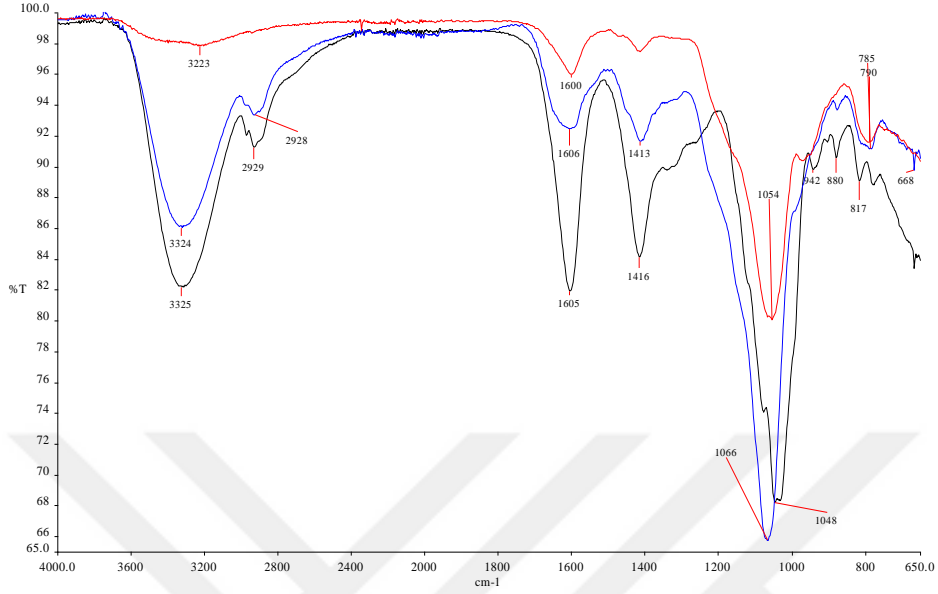
Şekil 4. 6 Hibrit monolitlerin SEM görüntüleri (a,b,c,d) ve EDS/mapping görüntüleri (a,c)
 a) Aljinat (% 2 w/w) /CaCO₃/SiO₂ (büyütme: 2500x) b) Aljinat (%2 w/w)/CaCO₃/SiO₂
 (büyütme:5000x) c) Aljinat (%3 w/w)/ CaCO₃/SiO₂/PDADMAC (büyütme:2500x) d)Aljinat (%3
 w/w)/CaCO₃/SiO₂/PDADMAC, (büyütme:5000x)

İç jelleşme yöntemiyle hazırlanan D1 ve D2 kodlu örneklerin SEM görüntüleri Şekil 4.5'te, D3 ve D4 kodlu örneklerin SEM görüntüleri ise Şekil 4.6'da verilmiştir. Örnekler morfolojik olarak incelendiğinde küre benzeri poroz yapılar görülmektedir. PDADMAC içeren monolitlerde içermeyenlere göre daha kompakt bir yapı görülmektedir. EDS/mapping analizi ile silikanın aljinat jel içerisindeki homojen dağılımı net olarak görülmektedir. Enzim immobilizasyonu için geliştirilen organik-inorganik hibrit jel formülasyonlarında karşılaşılan başlıca sorun; silika partiküllerin homojen dağılımının sağlanamamasından dolayı kümelenmesi ve bu kümelenmeden dolayı poroz yapının bozulmasıdır (Lu et al., 2006). Fakat iç jelleşme yöntemiyle geliştirilen formülasyonda homojen bir dağılım ve poroz yapı görülmektedir ki bu özelliği de monolitlerin enzim immobilizasyonu için uygun bir matris olduğunu göstermektedir. SEM görüntüsü Şekil 4.7'de verilen Meyer et al., (2002) tarafından, öncül maddesi silisik asit tetrakis(2-hidroksietil) ester olan silika jel ile hazırlanan aljinat-silika hibrit jeller morfolojik olarak benzerlik göstermektedir.

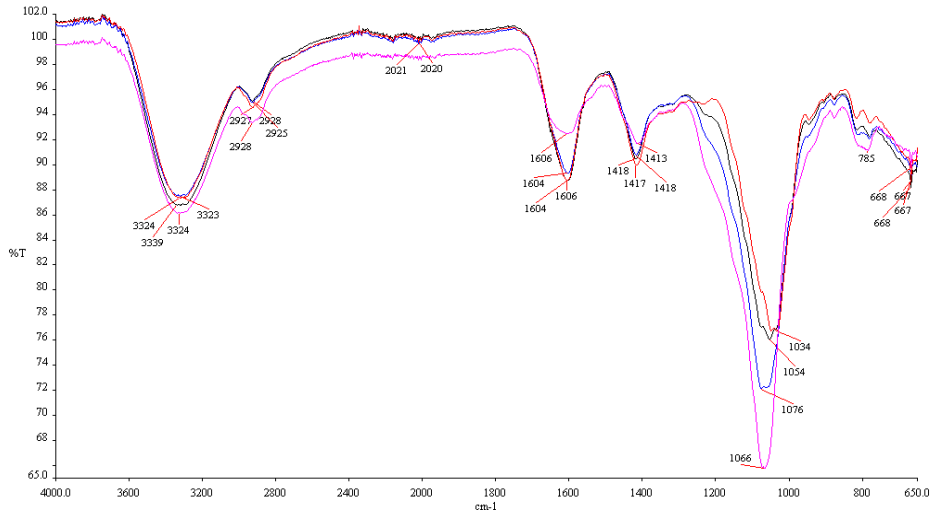


Şekil 4.7 Öncül maddesi silisik asit tetrakis(2-hidroksietil) ester olan silika jelin SEM görüntüsü (Meyer et al., 2002)

4.1.3 FT-IR analizi sonuçları



Şekil 4. 8 Aljinat-silika hibrit boncuklara ait FT-IR spektrumu (Aljinat-silika hibrit boncuk=kırmızı, silika=mavi, Ca-aljinat=siyah)



Şekil 4. 9 D3 ve D4 kodlu monolitlere ait FT-IR spektrumu (D3=siyah, D4=mavi, Ca-aljinat + GDL=kırmızı, silika=pembe)

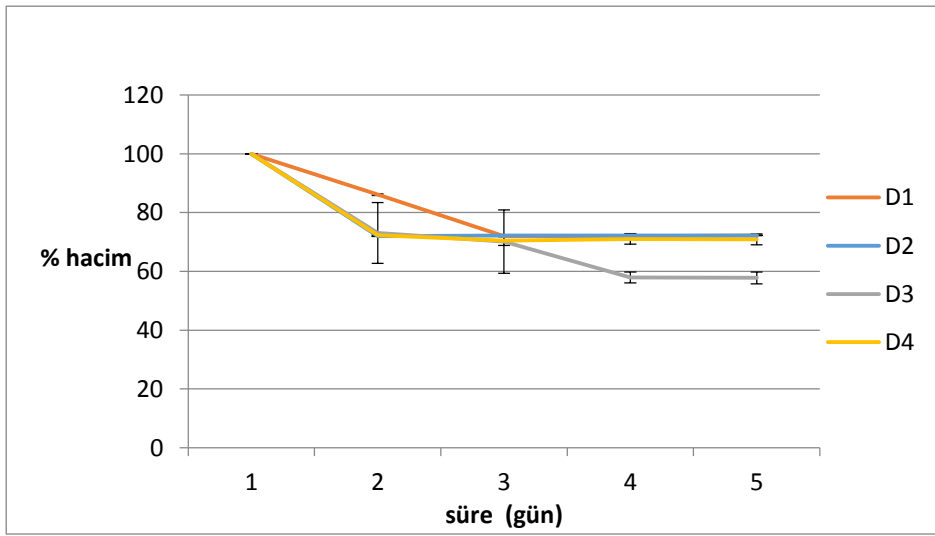
Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'e ait FT-IR spektrumlarına göre 3600 ve 3100 cm^{-1} arasındaki güçlü absorpsiyon piki Si-OH grupları arasındaki gerilmeyi göstermektedir ve büyük olasılıkla adsorplanan suyun geniş absorpsiyon bandı üzerinde çakışma gerçekleşmiştir. Şekil 4.8'deki aljinat-silika hibrit boncuklara ait kırmızı spektrumda 3600 ve 3100 cm^{-1} arası çok zayıf bir pik görülmektedir. Bunun nedeni silanol bağlar arası kondensasyonun gerçekleştiği ve 1100-1000 cm^{-1} arasında görüldüğü üzere siloksan bağlarının oluşmasıdır. Ayrıca 942 cm^{-1} 'de zayıf Si-OH piki görülmektedir. Şekil 4.9'da 1100-1000 cm^{-1} aralığında ise güçlü absorpsiyon piki siloksan (Si-O-Si) bağını göstermektedir. Bu bağ silanol gruplar (Si-OH) arasındaki kondensasyon reaksiyonu sonucu oluşmuştur. D3 ve D4'e ait pikleri incelediğimizde D4'e ait pikin daha güçlü olduğu görülmektedir. Bu da PDADMAC varlığı sonucu siloksan bağlarının daha güçlü oluştuğunu göstermektedir. 1410 ve 1600 cm^{-1} dolaylarındaki iki pik ise karboksil grupların simetrik ve asimetrik gerilme titreşimlerini göstermektedir (Pannier et al., 2014; Han et al., 2007) .

4.1.4 Aljinat-silika hibrit monolitlerin büzülme testi sonuçları

Aljinat-silika hibrit monolitlerin büzülme testi sonuçları Şekil 4.10'da verilmiştir. Monolitlerin büzülme oranları arasında benzerlik görülmektedir. 2. günde yüksek düşüş görülmesinin ardından hacim sabitlenmiştir. 2. gündeki % hacimce büzülme oranları hepsinde yaklaşık olarak % 28'dir. Monolitlerin mikroreaktör içerisinde uzun süreli kullanımı söz konusu olduğunda büzülme nedeniyle boş hacim oluşumuna neden olabilir ve bu istenmeyen bir durumdur. Fakat çalışmada kullanılan D4 kodlu monolit 24 saatlik yaşlandırmanın sonunda kullanıldığı için önemli derecede büzülme gerçekleşmemiştir. Deney 37 °C'de Na-Ca asetat tampon içerisinde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan tampon, jelin şişme veya büzülme karakteristiğini etkileyen bir parametredir.

Pannier et al. (2014) aljinat boncuklarla yaptıkları çalışmada, aljinat boncukların amino ile fonksiyonlaştırılmış silika solüsyonundaki 20 dakikalık inkübasyon sonrasında yaklaşık % 35 oranında çapının

azaldığı sonucuna ulaşmışlardır (Pannier et al. 2014). Kurayama et al. (2010) aljinat-silika hidrojelde yaşlandırma prosesi sırasında yüksek oranda büzülme gözlemişlerdir. Aljinatın asidik ve bazik koşullar altında büzülme gösterdiğini belirtmişlerdir. pH, karboksil grupların ve amino grupların çözünmesine neden olmasının yanısıra sol-jel prosesi boyunca Si-O-Si bağlarının oluşumunu etkileyen önemli bir parametredir (Kurayama et al., 2010).

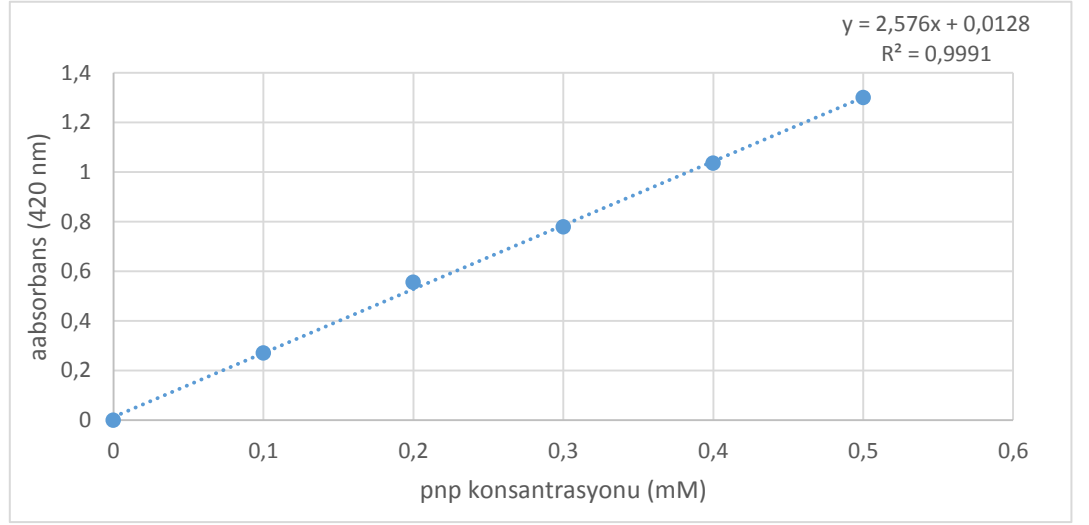


Şekil 4. 10 Aljinat-silika hibrit monolitlerin büzülme grafiği

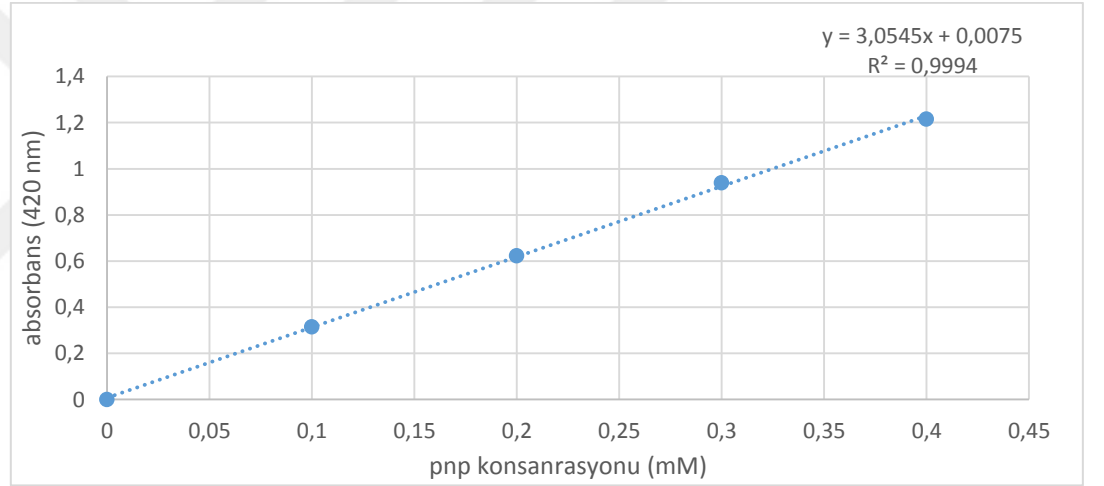
4.2 Enzim Kinetiği Çalışmaları

4.2.1 Serbest enzim ve immobilize enzim aktivitelerinin belirlenmesi

Serbest enzim aktivitesin hesaplanmasında Şekil 4.11.'de verilen kalibrasyon denklemi kullanılmıştır.



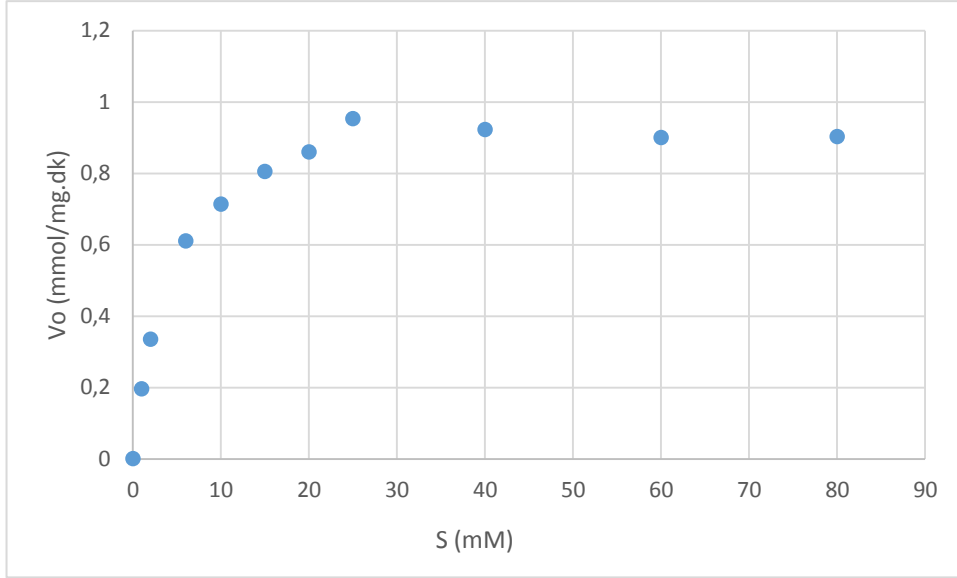
Şekil 4.11 Serbest enzim aktivitesini hesaplamasında kullanılan standart eğri ve denklemi



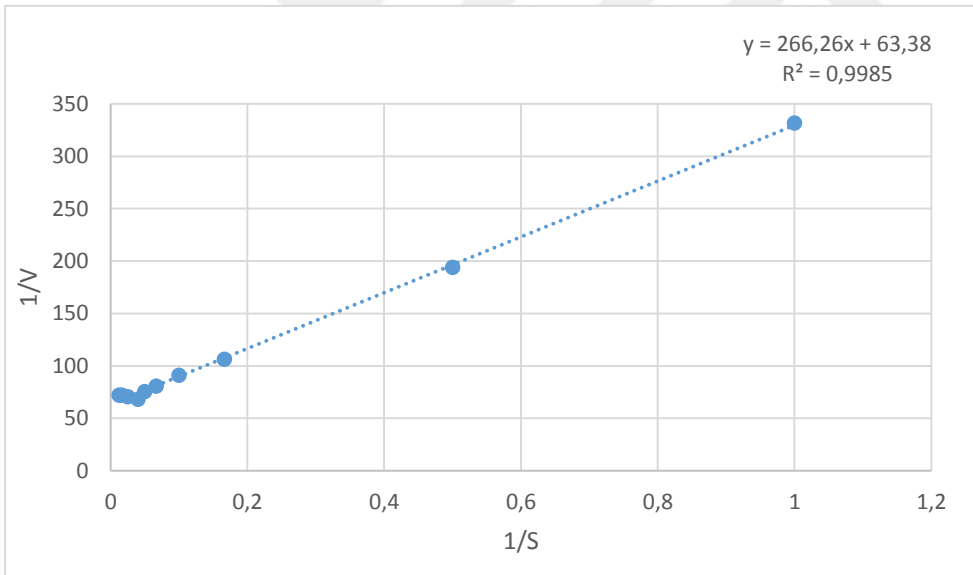
Şekil 4.12 İmmobilize enzim aktivitesini hesaplamasında kullanılan standart eğri ve denklemi

4.2.2 Kinetik parametrelerin belirlenmesi (Vmax, Km)

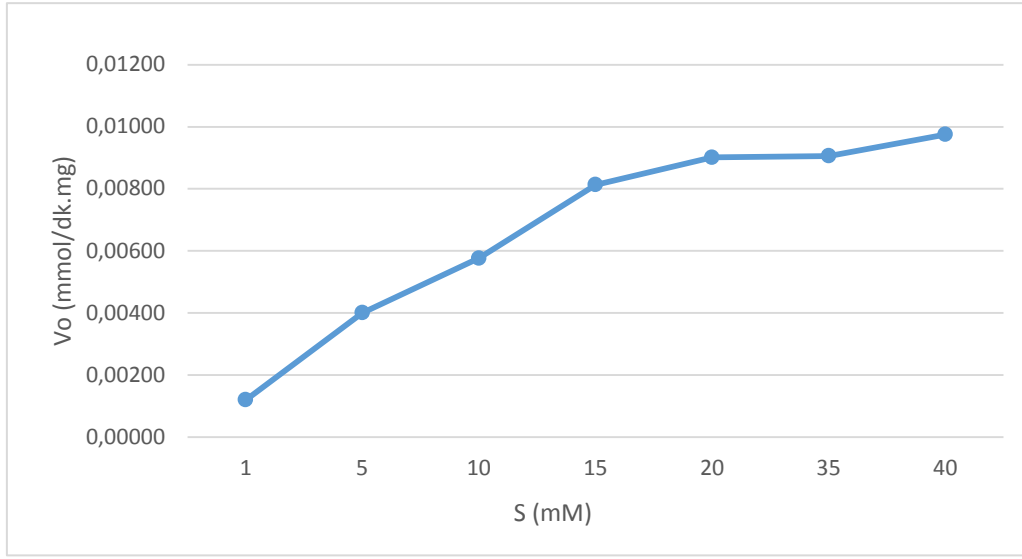
Serbest enzim ve immobilize enzimin kıyaslanmasında aljinat-silika hibrit boncuklar kullanılmıştır.



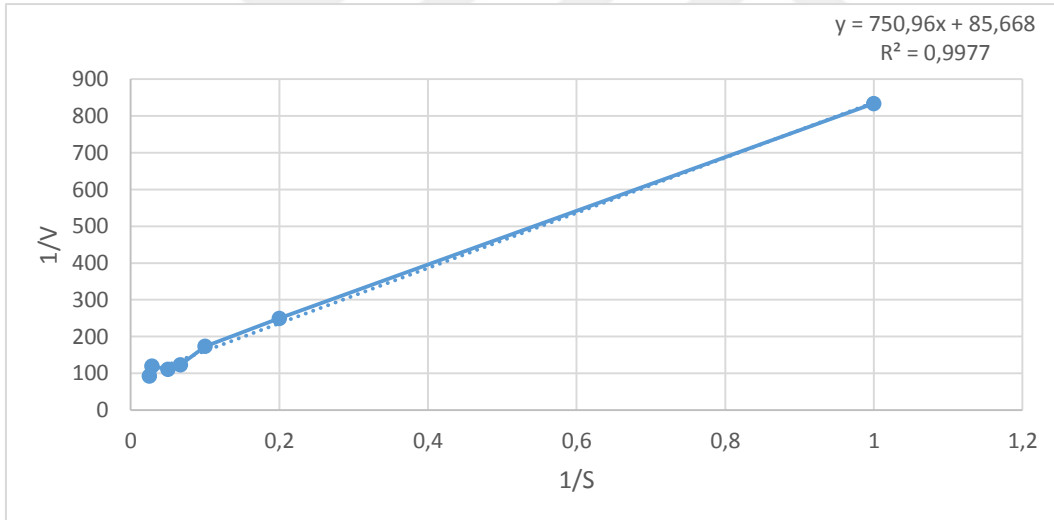
Şekil 4. 13 Serbest enzim için elde edilen Michaelis-Menten eğrisi



Şekil 4. 14 Serbest enzim için Lineweaver-burk grafiği



Şekil 4. 15 İmmobilize enzime ait Michaelis-Menten grafiği



Şekil 4. 16 İmmobilize enzime ait Lineweaver-burk grafiği

Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize enzime ait kinetik değerler

	Vmax (mmol mg ⁻¹ dk ⁻¹)	Km (mM)	Nispi aktivite (%)
Serbest Enzim	0.016	4	100
Aljinat- Silika Hibrit Boncuk	0.012	9	73

Serbest enzimin katalizlediği reaksiyonun maksimum hızının (V_{max}) immobilize enzimin katalizlediği reaksiyonun maksimum hızından büyük olması genellikle beklenen ve gözlenen bir olaydır. Immobilize enzimlerde enzim-substrat oluşumu polimer yapısı (porozite ve rijit yapı) zorlaşır ve bu nedenle V_{max} değerinde düşüş görülür. V_{max} , enzimin tümünün substratına doymuş olduğundaki olası en yüksek hızdır ve bu parametre immobilize enzimin gerçek özelliklerini ve difüzyon kısıtlarını yansıtır. K_m değeri bir enzimin substratına olan ilgisi olarak bilinir. K_m değerinin ise immobilize enzimlerde serbest enzimin K_m değerine göre yüksek olması beklenen bir durumdur. K_m değerinin yüksek olması, enzim substrat kompleksinin oluşma hızının düşük olduğunu göstermektedir. Bu durum substratın por matriksinden difüzyonu ile doğrudan bağlantılıdır (Park et al., 2005; Demirel et al., 2006; Kara et al., 2006). Nispi aktivite, serbest ve immobilize enzimlerin V_{max} değerleri baz alınarak hesaplanmıştır. Nispi aktivitenin % 73 olması hibrit boncukların difüzyon kısıtlarını büyük ölçüde aştığını göstermektedir.

Literatürde, beta glukozidaz enziminin TEOS-PEO türevli inorganik jellere immobilize edilmesiyle hesaplanan V_{max} değerleri; serbest enzim ve immobilize enzim için sırasıyla 0.018 ve 0.009 ($\text{mmol mg}^{-1}\text{dk}^{-1}$) olarak belirtilmektedir. K_m değerleri ise sırasıyla serbest enzim ve immobilize enzim için 30 ve 79 mM'dir. Nispi aktivite ise % 68'dir (Karabulut., 2015). Hibrit aljinat-Na silikat boncuklar ile TEOS jelde elde edilen V_{max} değerleri karşılaştırıldığında aljinat-silika hibrit boncuklarda V_{max} değerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Yani difüzyon kısıtlarının hibrit jelde aşıldığı söylenebilir. Hibrit boncuklardaki ve TEOS jeldeki enzim aktivitesi sonucu K_m değerinin hibrit boncuklarda daha düşük olduğu görülmektedir. Bu da hibrit boncuklardaki enzim-substrat kompleksinin oluşma hızının TEOS jelle göre daha hızlı olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca hibrit boncuklarda nispi aktivite inorganik jeldeki aktiviteye nazaran daha yüksek hesaplanmıştır. Bu sonuçlar aljinat-silika hibrit boncukların enzim immobilizasyonu için uygun bir matris olduğunu göstermektedir.

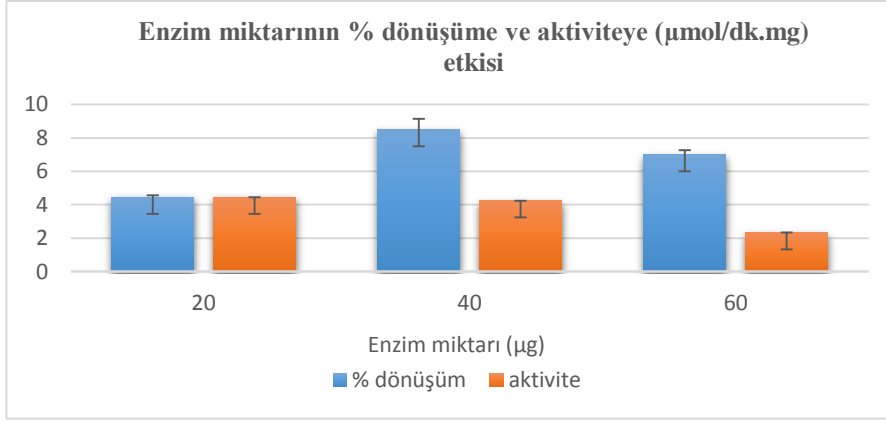
4.2.3 İç jelleşme yöntemi ile aljinat-silika hibrit monolitlerde immobilize enzim aktivitesinin belirlenmesi ve aljinat-silika hibrit boncuklarla aktivitenin karşılaştırılması

Çizelge 4.4. Farklı yöntemlerle hazırlanan aljinat-silika hibrit jellerin aktivitelerinin karşılaştırılması

Örnekler	Nispi Aktivite (%)
Serbest enzim	100
D4	73
D3	72
Aljinat-silika hibrit boncuk	69

Karakterizasyon sonuçlarına göre hidroliz çalışmalarının % 2 (w/w) aljinat konsantrasyonuna sahip aljinat-silika hibrit monolitlerle devam edilmesine karar verilmiştir ve PDADMAC'ın aktiviteye etkisini görmek amacıyla enzim aktiviteleri hesaplanmıştır. Çizelge 4.4. incelendiğinde difüzyon ve iç jelleşme yöntemleriyle hazırlanan jellere enzim immobilizasyonu sonucu nispi aktivitelerinin birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. İç jelleşme yöntemiyle hazırlanan aljinat-silika hibrit jelin aktivite üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu görülmektedir. D3 ve D4 kodlu jeller kendi aralarında değerlendirildiğinde ise PDADMAC'ın aktivite üzerine olumsuz herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bu nedenle D4 kodlu monolit ile çalışılmaya karar verilmiştir.

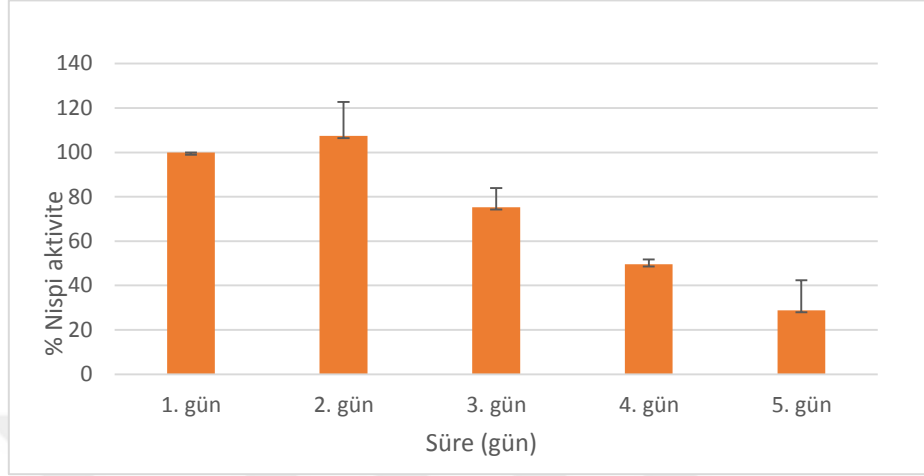
4.2.4 Enzim miktarının optimize edilmesi



Şekil 4. 17 Farklı enzim miktarının % dönüşüme ve aktiviteye etkisi µmol/dk.mg

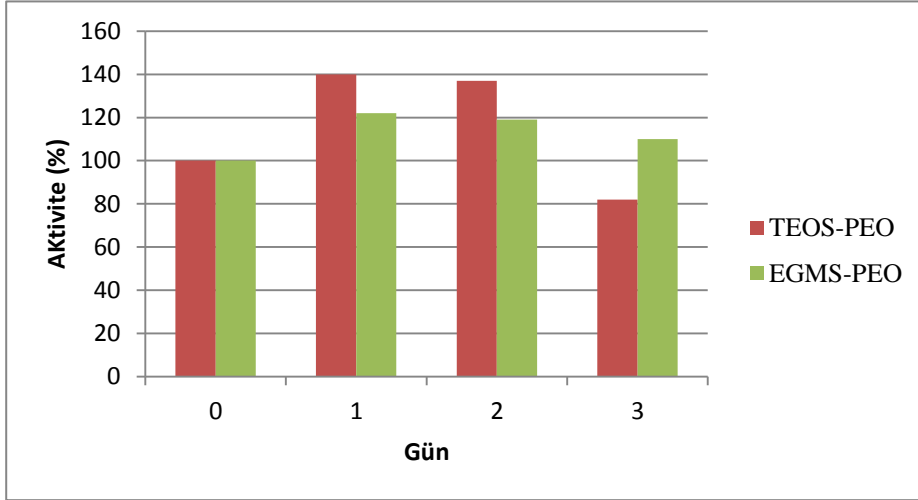
Şekil 4.17’de β-glukozidaz miktarının (20,40 ve 60 µg) % dönüşüm ve aktiviteye etkisi görülmektedir. Kullanılan 20 mM pNPG’nin PNP’ye % dönüşümü incelendiğinde 40 µg enzim miktarında en yüksek değere ulaştığı görülür. Aktiviteler dikkate alındığında ise 20 ve 40 µg enzim miktarlarında enzim aktivitesinin birbirine çok yakın değerler olduğu görülürken, 60 µg enzim miktarında enzim aktivitesinde %50 oranında bir düşüş vardır. Aktivitede yaşanan bu düşüşün sebebi sterik engel ile açıklanmaktadır. Sterik problem, immobilize enzimin katalizi sırasında ortaya çıkmaktadır. İmmobilize enzim makromoleküler substratı etkilediği zaman destek materyali yüzeyi substratın enzimin aktif bölgesine ulaşmasını engellemektedir (Guisan et al., 1997). Liu et al.,(2005) yaptıkları çalışmada yüksek miktarda enzim yüklenmesinin sterik probleme yol açacağını ve substrat ve ürünün difüzyonunu sınırlandıracağını belirtmiştir.

4.2.5 Aljinat-silika hibrit monolitte 5 günlük enzim kararlılığının belirlenmesi



Şekil 4. 18 D4 kodlu aljinat -silika hibrit monolitte 5 günlük enzim kararlılığı

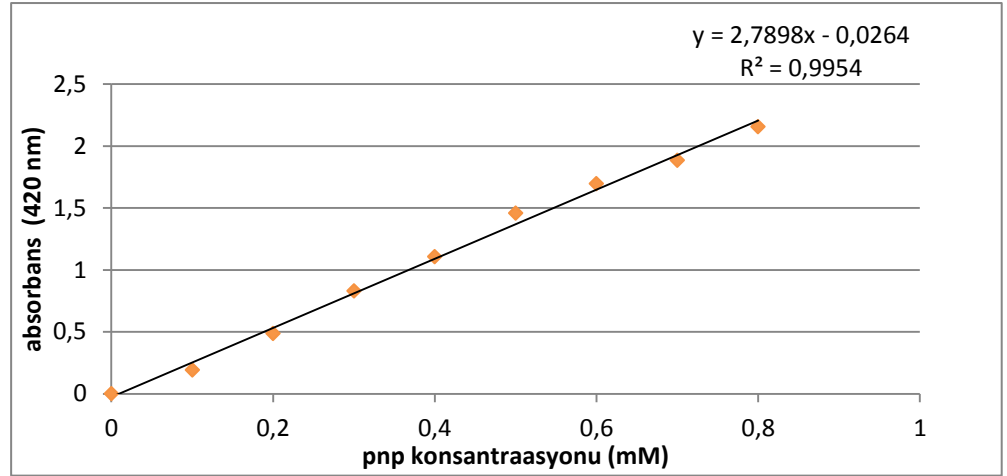
Şekil 4.18'e göre 2. gün en yüksek aktivite elde edilmiş ve zamanla aktivitede düşüş görülmüştür. Aktivitenin bu şekilde değişmesinde yaşlandırmanın etkili olduğu düşünülmektedir. 24 saat olan yaşlandırma süresince tamamladığını düşündüğümüz polikondensasyon reaksiyonlarının 2. günde devam ettiği sonucuna varılabilir ve enzim aktivitesine olumlu etkide bulunduğu görülmektedir. Fakat 2. günden itibaren aktivitede düşme gözlenmiş ve diğer günlerde aktivite kaybı artarak devam etmiştir. Karabulut (2015), TEOS-PEO ve EGMS-PEO türevli silika jellerde yaptığı enzim kararlılığı deneyinde elde ettiği sonuçlar silika jellerin hibrit monolite göre daha kararlı bir yapıda olduğu görülmektedir (Şekil 4.19). Fakat kinetik parametrelerin belirlenmesi başlığı altında tartışıldığı üzere aljinat-silika hibrit monolit enzim kinetiği değerleri bakımından değerlendirildiğinde enzim immobilizasyonu açısından daha uygun bir matris olduğu söylenebilir. Betancor and Luckarift (2008), immobilizasyon yönteminin optimizasyonunun çok önemli olduğunu, bazen kararlılık gibi parametrelerin yüklenme kapasitesini artırma adına feda edilebileceğini vurgulamıştır (Betancor and Luckarift, 2008).



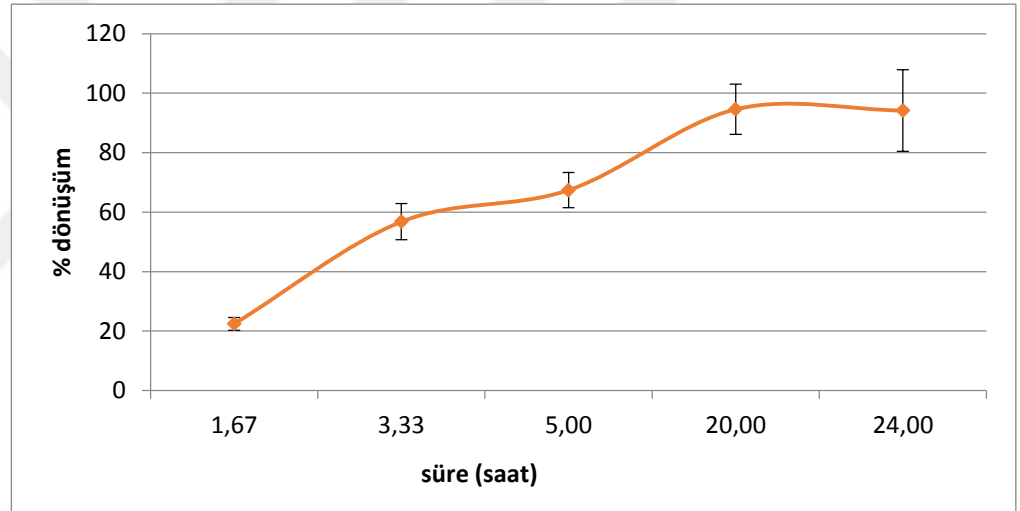
Şekil 4. 19 İnorganik silika jellerin yaşlandırma günlerine göre enzim aktivitesindeki değişimler (Karabulut, 2015)

4.2.6 Mikroreaktörde pNPG substratının enzimatik hidrolizi

Şekil 4.21'deki zamana bağlı % dönüşüm grafiği, mikroakışkan sistemlerin enzimatik reaksiyonlar üzerine pozitif etkisini göstermektedir. β -glukozidaz enzimi immobilize edilmiş aljinat-silika hibrit monolitlerde pNPG substratı ile gerçekleştirilen 15 dakikalık reaksiyonda dönüşüm % 8 iken, kalış sürelerince gerçekleştirilen mikroreaktördeki hidrolizde 100 dakika sonunda % 20 dönüşüm elde edilirken, 20. ve 24. saatlerde % 94'lük substrat dönüşümü ile dengeye ulaşmıştır (Şekil 4.21). Sonuçlar Şekil 4.20'deki kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, mikroakışkan sistemlerin sağladığı hızlı kütle ve ısı transferinin, geniş yüzey alanının ve arayüzey alanının enzimatik hidroliz üzerine olumlu etkisini göstermektedir (Asanomi et al., 2011).

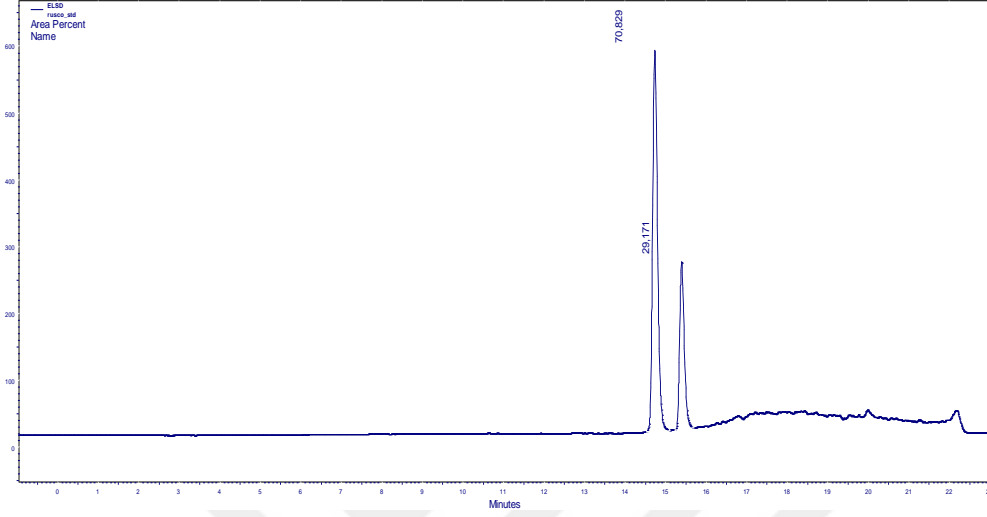


Şekil 4. 20 % dönüşümün hesaplandığı kalibrasyon eğrisi

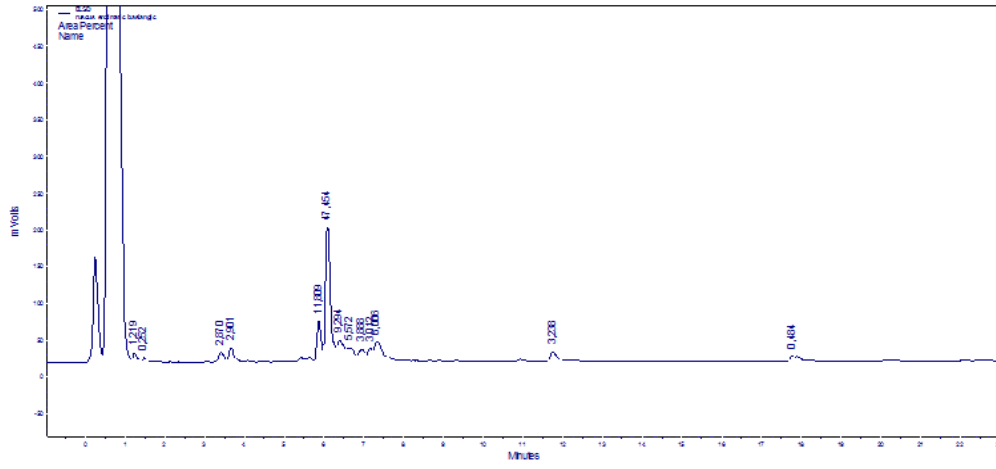


Şekil 4. 21 pNPG substratının aljinat-silika hibrit mikroreaktördeki % dönüşüm grafiği

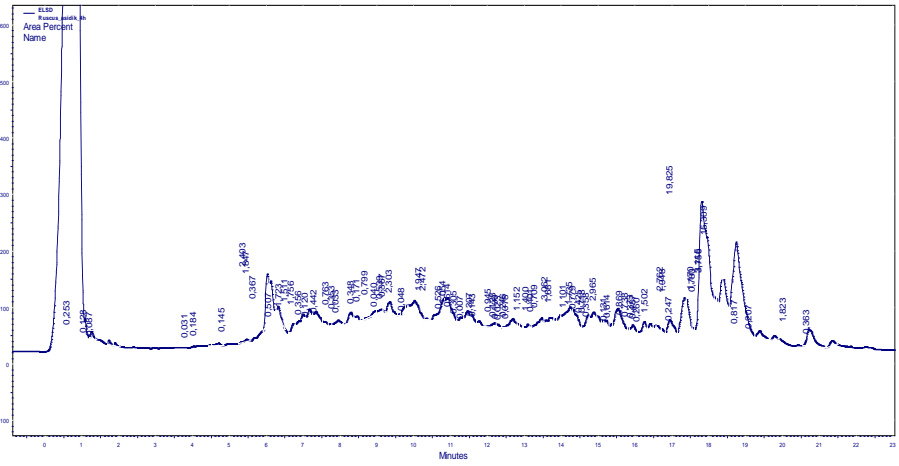
4.3 *Ruscus Aculeatus* Ekstresinin Kimyasal ve Enzimatik Hidrolizi



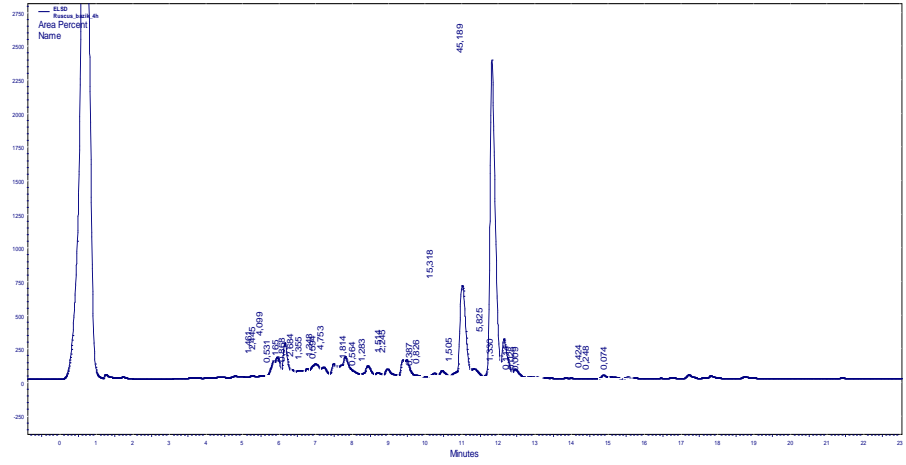
Şekil 4. 22 Ruscogenine ait standart kromatogram



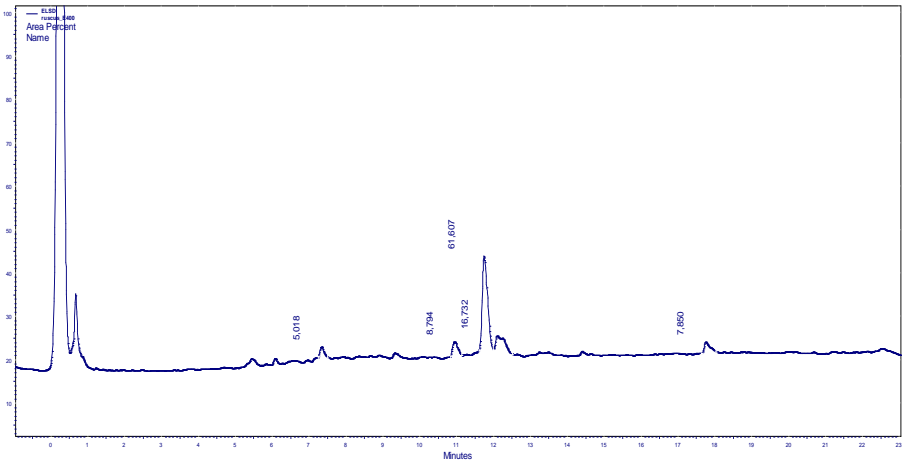
Şekil 4. 23 Ruscus aculeatus ekstresine ait başlangıç kromatogramı

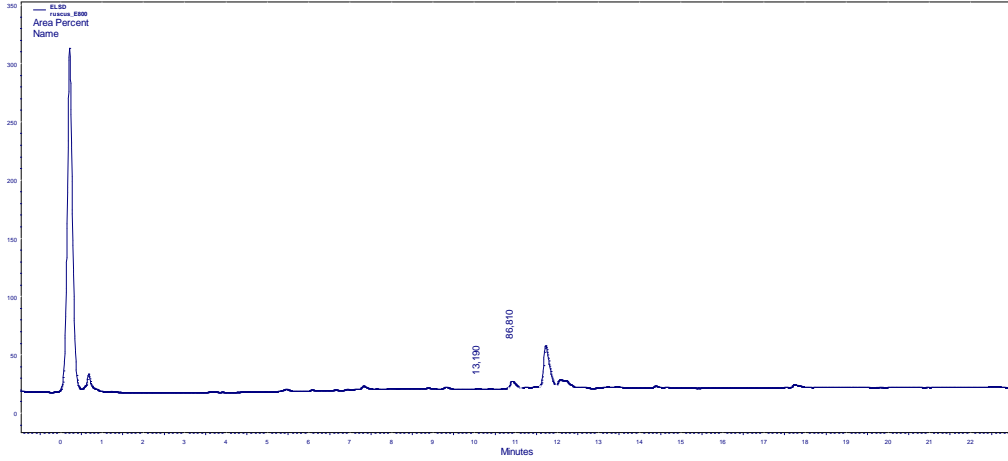


Şekil 4. 24 *Ruscus aculeatus* ekstresine ait asidik hidroliz (4 saat) kromatogramı

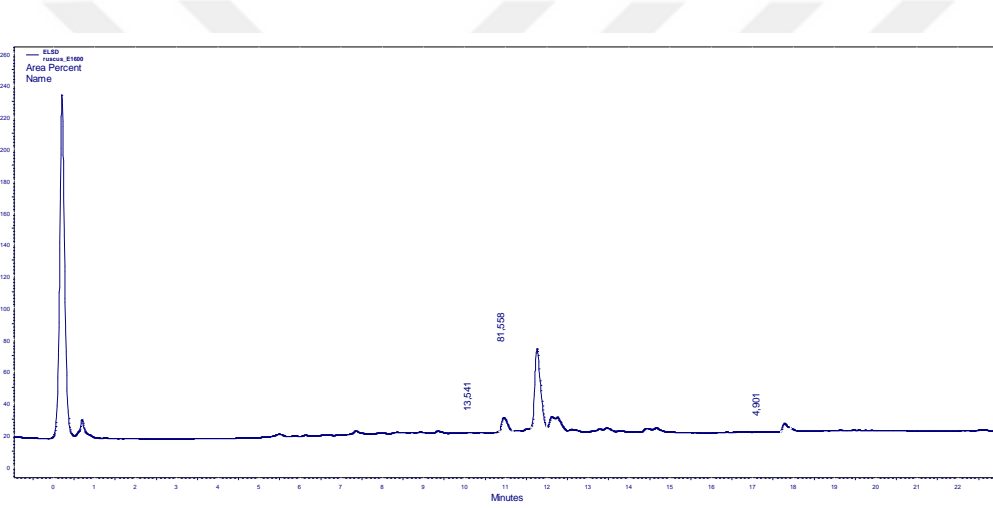


Şekil 4. 25 *Ruscus aculeatus* ekstresine ait bazik hidroliz (4 saat) kromatogramı



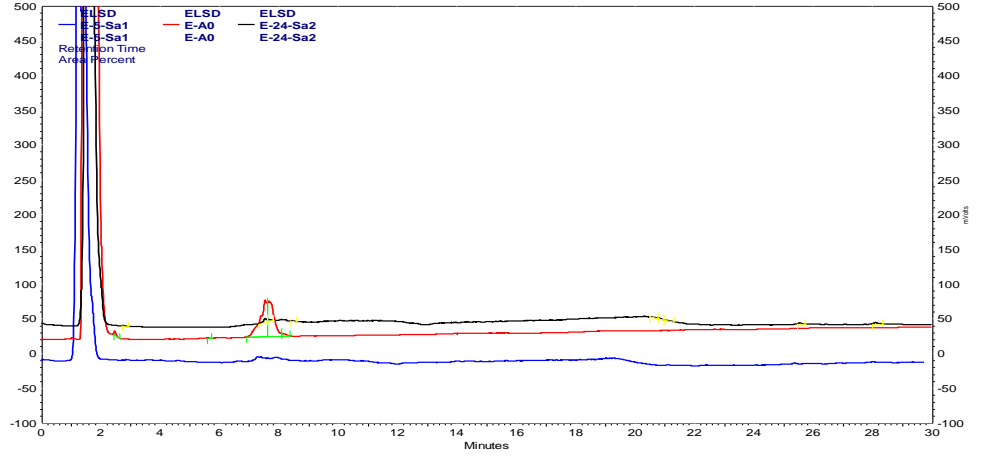


Şekil 4. 27 *Ruscus aculeatus* ekstresine ait serbest enzim hidrolizi (96 saat) kromatogramı (enzim miktarı:800 µg)



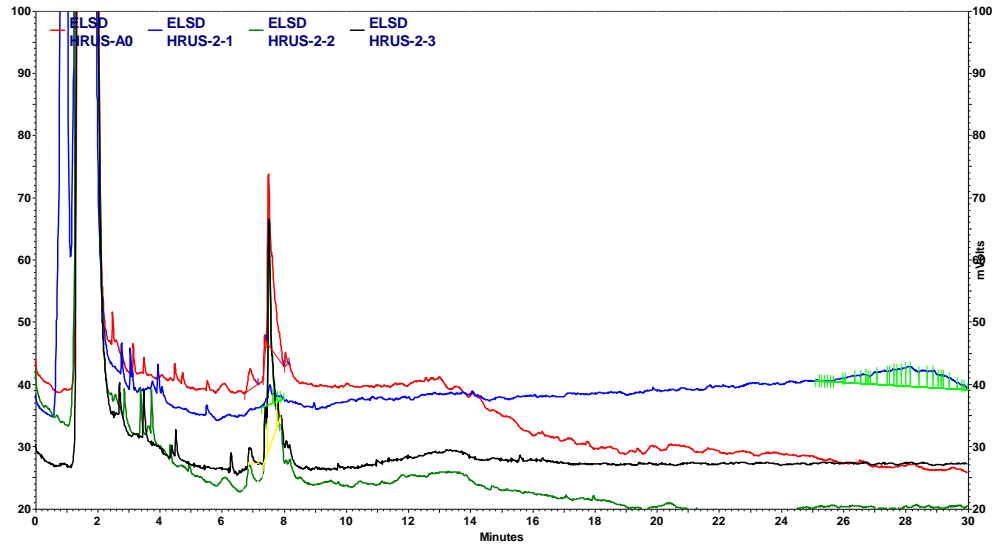
Şekil 4. 28 *Ruscus aculeatus* ekstresine ait serbest enzim hidrolizi (96 saat) kromatogramı (enzim miktarı:1600 µg)

Ruscus saponinlerinin asidik hidrolizi sonucunda ruscogeninler elde edilmiştir (Şekil 4.24). Bu saponine ait kromatogram incelendiğinde, özellikle dördüncü saatte ruscogeninlerin olduğu iyi bir şekilde görülmektedir. Bazı örneklere ait kromatogramlarda ise kısmi hidrolizin gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.25). *Ruscus* saponinlerin enzimatik hidrolizine ait sonuçlarda ise Ruscogenin oluşumu görülmemektedir. Polar bölgede yer alan pikler hidroliz sonucunda yok olmuş ve orta polaritede bir maddeye dönüşmüştür. Bu durum hidrolizin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermekle birlikte elde edilen madde için yapı tayinin yapılması gerekmektedir (Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28).



Şekil 4. 29 *Ruscus aculeatus* ekstresine ait serbest enzim hidrolizi (5 saat ve 24 saat) kromatogramı (enzim miktarı:40 µg)

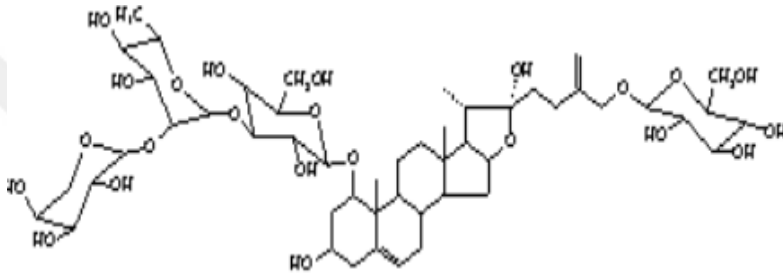
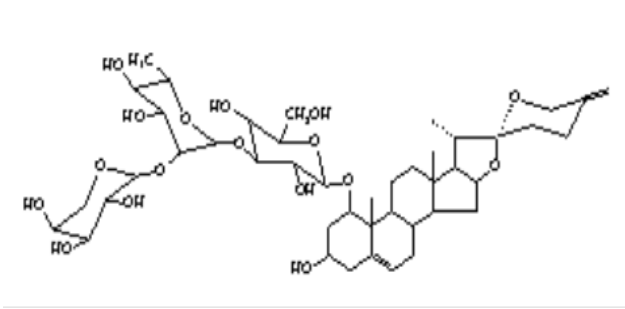
4.4 *Ruscus Aculeatus* Ekstresinin Mikroreaktörde Enzimatik Hidrolizi



Şekil 4. 30 *Ruscus aculeatus* ekstresine ait aljinat-silika hibrit monolitik mikroreaktörde gerçekleştirilen enzimatik hidroliz kromatogramı (100, 200 ve 300. 'ü dakikalara ait)

Çizelge 4. 5 HPLC kromatogramına göre pik alanlar

Pik	Kalış süresi (dk)	Pikin alanı (%)
HRUS AO (initial)	7.5	84.75
HRUS2-1 (100 min)	7.5	-
HRUS2-2 (200 min)	7.5	75.45
HRUS2-3 (300 min)	7.5	78.92

Şekil 4. 31 *Ruscus* türüne ait saponin molekülü

Şekil 4. 32 Ruscin

Ruscus Aculeatus ekstresinin aljinat-silika türevli mikroreaktör içerisinde hidrolizi 1 µl/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Hidroliz sonucunda kromatogramlarda 7.5 dakikada pik görülmektedir. Aglikonlar elde edilemese de bu pik bir şekeri kopmuş ara ürün olarak değerlendirilebilir. Ara ürünü tanımlayabilmek için yapı tayini gereklidir. Şekil 4.30'daki HPLC kromatogramında ise ilk kalış süresi sonunda (100 dk) pik oluşumu görülmezken, ikinci kalış süresinin sonunda % 75.445'lik alana sahip pik, üçüncü kalış süresi

sonucunda % 78.915'lik alana sahip pik görülmektedir. Sonuçlar, mikroreaktörde pNPG ile yapılan hidroliz sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Ruscus türlerinden izole edilen steroidal saponinler spirostan prosapogeninlerdir, C-1'e bağlı olarak şeker zinciri taşırlar, furostanoller C-1'de şeker zinciri taşır ve C-26'da D-glukoz bulunur. Spirostan prosapogeninler neorskogenin ve ruskogenin olarak adlandırılan aglikonlar içerirler. Spirostan prosapogeninler, C-26'da D-glukoz bulunduran furostanol saponinlerden köken alırlar. *R. aculeatus*'un furostanol saponinleri 25-27 pozsyonunda çift bağ içerir ve ruskozid ve desglukoruskozid olarak adlandırılır (de Combarieu et al., 2002). Bu çalışmada, *R. aculeatus* ekstre saponinlerinin (Şekil 29) β -glukozidaz ile hidroliz sonucu büyük ihtimalle ruscin (Şekil 30) elde edilmiştir. Molekülün kesin olarak tanımı için yapı tayini yapılması gerekmektedir.

Aljinat-silka hibrit türevli mikroreaktörde gerçekleştirilen hidroliz umut verici bir sonuçtur çünkü 40 μ g enzim miktarı ile 24 saat gerçekleştirilen enzimatik hidrolizde dönüşüm elde edilememiştir. Fakat mikroreaktörde gerçekleştirilen hidrolizde ara ürüne ulaşılmıştır. Bu sonuçlar, yüzey alanını arttırması, kütle ve ısı transferinin hızlı gerçekleşmesi gibi özelliklere sahip mikroakışkan sistemlerin enzimatik hidrolizde avantajını ortaya koymaktadır.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında enzim immobilizasyonu için iç jelleşme yöntemi ile aljinat-silika hibrit jel formülasyonu geliştirilmiştir. Homojen bir yapıya sahip olan aljinat-silika jel, aynı zamanda jelleşme süresinin kontrolünü sağlaması açısından biyomoleküllerin immobilizasyonunda ve mikroakışkan sistemlerde kullanımında avantaj sağlamaktadır.

Yüksek biyouyumluluğa sahip 3 boyutlu aljinat-silika hibrit monolitler sadece enzim immobilizasyonu uygulamaları için değil aynı zamanda mikroorganizmaların immobilizasyonu, hücre terapisi çalışmaları ve yapay organ tasarımı gibi çeşitli doku mühendisliği çalışma alanlarında da kullanımı mümkündür.

Ruscus Aculeatus'un enzimatik hidrolizi aljinat-silika hibrit monolit türevli mikroreaktörde gerçekleştirilmiştir ve hedeflenen aglikon forma ulaşılmasa da mikroreaktördeki enzimatik hidroliz sonucu ara ürün elde edilmiştir.

Fakat bu sonuçlar çalışılan parametrelerin optimizasyonu (farklı akış hızları, farklı mikroreaktör hacmi ve mikroreaktör tasarımları gibi..) ile aglikona ulaşabilme ihtimalini güçlendirmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acquati, W. and Ponzone, C.**, 2003, Process for the Preparation of Derivatives of *Ruscus Aculeatus* Steroid Glycosides, *patent no: US 6,528,280 B1*
- Ai, Q., Jiang, Z., Yang, D., and Zhu, Y.**, 2013, Fabrication of Boehmite/Alginate Hybrid Beads for Efficient Enzyme Immobilization, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52:14898–14905 pp.
- Akay, S., Heils, R., Trieu, H. K., Smirnova, I., Yesil-Celiktas, O.**, An injectable alginate-based hydrogel for microfluidic applications, *Carbohydrate Polymers* 161 (2017) 228–234
- Ali-Shtayeh M.S, Faidi, Y.R., Salem K, Al-Nuri, M.A. and Yaghmour, R.M.**, 1998, Antimicrobial Activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *J Ethnopharmacol.* 60(3):265-71 pp.
- Allouche, J., Boissiere, M., Coradin, T. and Helary, C. Livage, J.**, 2006, Biomimetic core-shell gelatine/silica nanoparticles: a new example of biopolymer-based nanocomposites. *J. Mater. Chem.* 16, 3120–3125 pp.
- Amiri, A.**, 2016 Solid-phase microextraction-based sol–gel technique, *Trends in Analytical Chemistry* 75: 57–74 pp.
- Annenkov, V.V., Danilovtseva, E.N., Likhoshway, Y.V., Patwardhanb, S.V. and Perry, C.C.**, 2008, Controlled stabilisation of silicic acid below pH 9 using poly(1-vinylimidazole), *J. Mater. Chem.*, 18:553–559 pp.
- Augustin, J.M., Kuzina, V., Andersen, S.B. and Bak, S.**, 2011, Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins, *Phytochemistry* 72: 435–457 pp.
- Avato, P., Bucci, R., Tava, A. Vitali, C., Rosato, A., Bialy, Z. and Jurzysta, saM.**, 2006, Antimicrobial Activity of Saponins from *Medicago* sp.: Structure-Activity Relationship, *Phytother. Res.* 20:454–457 pp.
- Avnir, D., Braun, S., Lev, O. and Ottolenghi, M.**, 1994, Enzymes and other proteins entrapped in sol–gel materials., *Chemistry of Materials* 6, 1605–1614. pp.
- Baharudin L.**, 2008, Microfluidics: Fabrications and Applications, *Instrumentation Science & Technology* 36: 222–230 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Bardajee, G.R., Hooshyar, Z. and Rostami, I.**, 2011, Hydrophilic alginate based multidentate biopolymers for surface modification of CdS quantum dots, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88: 202– 207pp.
- Betancor, L. and Luckarift, H.R.**, 2008, Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis, *Trends in Biotechnology* Vol.26 No.10, doi:10.1016/j.tibtech.2008.06.009
- Bruneton, J.**, 1995, Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. *Lavoisier Publishing*, Paris, 538–544 pp.
- Bornscheuer, U.**, 2005, Trends and Challenges in Enzyme Technology, *Adv Biochem Engin/Biotechnol* 100: 181–203 pp.
- Byron, D.**, 1991, editor. Biomaterials: novel materials from biological sources. New York: *Stockton Press*; 309–331 pp.
- Carturan, G., Toso, R.D., Boninsegnab, S. and Monte, R.D.**, 2004, Encapsulation of functional cells by sol–gel silica: actual progress and perspectives for cell therapy, *J. Mater. Chem.*, 14: 2087 – 2098 pp.
- Cao, L.Q., Langen, L.V. and Sheldon R.A.**, 2003, Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free, *Curr Opin Biotechnol*, 14:387-394 pp.
- Ciriminna, R., Fidalgo, A., Pandarus, V., Béland, F., Ilharco, L.M. and Pagliaro, M.**, 2013, The Sol–Gel Route to Advanced Silica-Based Materials and Recent Applications, *Chem. Rev.* 113:6592–6620 pp.
- Chang, K.H., Jo, M.N., Kim, K.T. and Paik, H.D.**, 2012, Purification and Characterization of a Ginsenoside Rb1-Hydrolyzing β -Glucosidase from *Aspergillus niger* KCCM 11239, *Int. J. Mol. Sci.*, 13:12140-12152 pp.
- Chen X., Hu, T., Shen, J. and Z., Li.**, 2016, Fractal design of microfluidics and nanofluidics—A review, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 155: 19–25 pp.
- Chernev, G.E., Samuneva, B.I., Salvado Djambaski and I.M.M., P.R.**, 2006, Silica hybrid nanocomposites, *CEJC* 4(1) :81–91 pp.
- Combarieu, E.D., Falzoni, M., Fuzzati, N., Gattesco, F., Giori, A., Lovati, M. and Pace, R.**, 2002, Identification of *Ruscus* steroidal saponins by HPLC-MS analysis, *Fitoterapia* 73: 583–596 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Coradin, T., and Livage, J.**, 2001, Effect of some amino acids and peptides on silicic acid polymerization, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 21:329–336 pp.
- Coradin, T., Livage, J. and Roux, C.**, 2001, Encapsulation of biomolecules in silica gels, *J. Phys.: Condens. Matter* 13:673–691 pp.
- Coradin, T., Lisnard L., Livage, J., and Mercey, E.**, 2001, Design of silica-coated microcapsules for bioencapsulation, *Chem. Commun.*, , 7:2496–2497 pp.
- Coradin, T., Nassif, N., Livage, J.**, 2003, Silica–alginate composites for microencapsulation, *Appl Microbiol Biotechnol* 61:429–434 pp.,
- Costa, S. A., Azevedo, H. S. and Reis, R. L.**, Enzyme Immobilization in Biodegradable Polymers for Biomedical Applications, *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* Edited by Rui L . Reis and Julio San Román CRC Press Print ISBN: 978-0-8493-1936-5,eBook ISBN: 978-0-203-49123-2, DOI: 10.1201/9780203491232.ch17
- 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, *Eng. Life Sci.* 14:170–179 pp.
- Demirel G.,Ozçetin, G., Sahin, F., Tümtürk, H., Aksoy, S. and Hasirci, N.**, 2006, Semi-interpenetrating polymer networks (IPNs) for entrapment of glucose isomerase, *Reactive & Functional Polymers* 66:389–394 pp.
- Desmet, J., Meunier, C.F., Thomas, D., Cambier, P., Danloy, E.P., Duprez, M.E., Hantson, A.L., Rooke, J.C., and Su, B.L.** 2014, Green and sustainable production of high value compounds via a microalgae encapsulation technology that relies on CO₂ as a principle reactant, *J. Mater. Chem. A*, 2: 20560–20569 pp.
- Desmet, J., Meunier, C., Danloy, E., Duprez, M.E., Hantson, A., Crine, M., Lox, F., Thomas, D. and Toye, Rooke, J., D., Su, B.L.** 2015, Highly efficient, long life, reusable and robust photosynthetic hybrid core–shell beads for the sustainable production of high value compounds, *Journal of Colloid and Interface Science* 448 : 79–87 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Di Lazzaro, A., Morana, A., Schiraldi, C., Martino, A., Ponzone, C., De Rosa, M.** 2001, An enzymatic process for the production of the pharmacologically active glycoside desglucodesrhamnoruscin from *Ruscus aculeatus* L., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11: 307–314 pp.
- Draget, K.I. and Taylor, C.,** 2011, Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications, *Food Hydrocolloids*, 25:251–256 pp.
- Draget, K.I. Smidrod, O. and Skjak-Braek G.,** 2005, Polysaccharides and Polyamines in the Food Industry. Properties, Production, and Patents. Edited by A. S teinbüchel and S.K. Rhee
- Francis, G., Kerem, Makkar, Z., H. P. S. and Becker, K.,** 2002, The biological action of saponins in animal systems: a review, *British Journal of Nutrition*, 88:587–605 pp.
- Fukushima, Y., Okamura, K., Imai K. and Motai, H.,** 1988, A new immobilization technique of whole cells and enzymes with colloidal silica and alginate, *Biotechnol. Bioeng.*, 32: 584 pp.
- Fumes, B.H., Silva, M.R., Andrade, F.N., Nazario, C.E.D. and Lanças, F.M.,** 2015, Recent advances and future trends in new materials for sample preparation, *Trends in Analytical Chemistry* 71: 9–25 pp.
- George, M.,** The origins and the future of microfluidics, Whitesides, *Nature*|Vol 442|27 July 2006|doi:10.1038/nature05058
- Gill, I.,** Bio-doped Nanocomposite Polymers: Sol-Gel Bioencapsulates, *Chem. Mater.* 13:3404-3421 pp.
- Gill, I., Pastor, E. and Ballesteros, A.,** 1999, Lipase–silicone biocomposites: efficient and versatile immobilized biocatalysts., *Journal of the American Chemical Society*, 121:9487–9496 pp.
- Grubhofer, N. and Schleith, L.,** 1954. Die Spaltung von Racemischer Mandelsäure mit einem optisch aktiven Anionenaustauscher. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 296, 262–266 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Guisán, J.M., Rodriguez, V., Rosell, C.M., Soler, G., Bastida, A., Blanco, R.M., Fernandez-Lafuente, R., Garcia Junceda, E.,** 1997, Stabilization of immobilized enzymes by chemical modification with polyfunctional macromolecules, in: Bickerstaff, G. (Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells. Methods Biotechnol*, The Humana Press Enc., Totowa, NJ, pp. 289–298 pp.
- Gurikov, P., Raman, S. P., Weinrich, D., Fricke, M., & Smirnova, I.** 2015, A novel approach to alginate aerogels: carbon dioxide induced gelation? *RSC Advances*, 5(11): 7812–7818 pp.
- Gutberlet, T.M., and Geue, T.** 2014, Effect of hydration of sugar groups on adsorption of Quillaja bark saponin at air/water and Si/water interfaces, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 117: 60–67 pp.
- Han, Y.-H., Taylor, A., Mantle, M. D., Knowles, K. M.,** 2007, Sol–gel-derived organic–inorganic hybrid materials, *Journal of Non-Crystalline Solids* 353:313–320 pp.
- Hartmann, M., and Jung, D.** 2010, Biocatalysis with enzymes immobilized on mesoporous hosts: the status quo and future trends, *J. Mater. Chem.*, 20:844–857 pp.
- He, P., Greenway, G., Haswell, S. J.,** 2010, Development of enzyme immobilized monolith micro-reactors integrated with microfluidic electrochemical cell for the evaluation of enzyme kinetics, *Microfluid Nanofluid* 8:565–573, DOI 10.1007/s10404-009-0476-8
- Hobbs, H.R. and Thomas, N.R.,** Biocatalysis in Supercritical Fluids, in Fluorous Solvents, and under Solvent-Free Conditions, *Chem. Rev.* 107: 2786-2820 pp.
- Holte, H. H., and Karlsen, T.J.,** 2006, Measurement of diffusion through calcium alginate gel matrices, *Pharmazie* 61: 30–34 pp.
- Homaei, A.A., Sariri, R., Stevanato, R. and Vianello, F.,** 2013, Enzyme immobilization: an update, *J Chem Biol* 6:185–205 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Huang, Y., Kou, J.P., Ma, L., Song, J.X. and Yu, B.Y.**, 2008, Possible Mechanism of the Anti-inflammatory Activity of Ruscogenin: Role of Intercellular Adhesion Molecule-1 and Nuclear Factor- κ B, *J Pharmacol Sci* 108, 198 – 205 pp.
- Hwang, E.T. and Bock Gu, M.**, 2013, Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials, *Eng. Life Sci.*, 13: 49–61 pp.
- Hwang, E.T., Lee, H. Kim, J.H., and Tatavarty, R.**, 2011, Highly stable magnetically-separable organic-inorganic hybrid microspheres for enzyme entrapment. *J.Mater. Chem.*, 21:6491–6493 pp.
- Hwang, E.T. and Bock Gu, M.**, 2013, Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials, *Eng. Life Sci.*, 13: 49–61 pp.
- Jeon, N. L., Chiu, Daniel T., Wargo, C. J., Wu, Hongkai, Choi, I. S., Anderson, J.R. and Whitesides G. M.**, 2002, Design and Fabrication Of Integrated Passive Valves And Pumps for Flexible Polymer 3-Dimensional Microfluidic Systems, *Biomedical Microdevices*, 4:2,117-121 pp.
- Jiang, Y. J., Jiang, Z.Y., Li, J., Shi, J.F., Sun, X. H. and Zhang, L.**, 2008, Biomimetic polymer-inorganic hybrid microcapsules for yeast alcohol dehydrogenase encapsulation. *React. Funct. Polym.* 68:1507–1515 pp.
- Kara, F., Demirel, G. and Tümtürk, H.**, 2006, Immobilization of urease by using chitosan–alginate, *Bioprocess Biosyst Eng*, 29:207–211 pp.
- Karabulut, D.**, 2015, Mikroakışkan Sistemde Sol-Jel Yöntemi Kullanılarak İmmobilize Edilmiş Enzim İle Model Bir Saponinin Aglikonuna Biyokatalizi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 102 s (yayınlanmamış)
- Kim, J. Grate, J.W. and Wang, P.**, 2006, Nanostructures for enzyme stabilization, *Chemical Engineering Science* 61, : 1017 – 1026 pp.
- Kite, G.C., Porter, E.A. and Simmonds, M.S.J.**, 2007, Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1148:177–183 pp.
- Koebel M.M. and Zhao, S.** 2012, Aerogels From Sodium Silicate Towards Cost-Effective Mass Production Technologies, Eidgenössisches Departement für Umwelt, Verkehr, Energie und Kommunikation UVEK

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Krajevská, B.**, 2004, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review *Enzyme and Microbial Technology* 35: 126–139 pp.
- Kuo, C.K. and Ma, P.X.**, 2001, Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties, *Biomaterials* 22:511-521 pp.
- Laurenti, E., Vianna Jr., A.S.**, 2015, Enzymatic microreactors in biocatalysis: history, features, and future perspectives, *Biocatalysis*; 1: 148–165 pp.
- Lee, J. N., Park, C. and Whitesides, G. M.**, 2003, Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices, *Anal. Chem.*, 75:6544-6554 pp.
- Li, J., Jiang, Wu, H., Y.J., Jiang, Z.Y., Liang, Y. P., and Zhang, L.** 2013, Facile fabrication of organic-inorganic hybrid beads by aminated alginate enabled gelation and biomimetic mineralization. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, 24, 119–134 pp.
- Light, M.E., Sparg, S.G. and Staden, J. V.**, 2004, Biological activities and distribution of plant saponins, *Journal of Ethnopharmacology* 94:219–243 pp.
- Lazzaro, A.D., Morana, A., Schiraldi, C., Martino, A., Ponzone, C. and Rosa, M.D.**, 2001, An enzymatic process for the production of the pharmacologically active glycoside desglucodesrhamnoscin from *Ruscus aculeatus* L., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11: 307–314 pp.
- Light, M.E., Sparg, S.G. and Staden, J. V.**, 2004, Biological activities and distribution of plant saponins, *Journal of Ethnopharmacology* 94:219–243 pp.
- Liu, X., Guana, Y., Shen R. and Huizhou Liu**, 2005, Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads, *Journal of Chromatography B*, 822:91–97 pp.
- Lu, Y., Jiang, Z., Xu, S., Wu, H., 2006**, Efficient conversion of CO₂ to formic acid by formate dehydrogenase immobilized in a novel alginate–silica hybrid gel, *Catalysis Today* 115:263–268 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Meyer, M., Fischer A., Hoffmann, H., 2002**, Novel Ringing Silica Gels That Do Not Shrink, *J. Phys. Chem. B*, 106: 1528-1533 pp.
- Ma, J., Liang, Z., Qiao, X., Deng, Q., Tao, D., Zhang, L. and Zhang, Y., 2008**, Organic-Inorganic Hybrid Silica Monolith Based Immobilized Trypsin Reactor with High Enzymatic Activity, *Anal. Chem.*, 80: 2949-2956 pp.
- Macario, A., Moliner, M., Corma, A. and Giordano, G., 2009**, Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. *Microporous Mesoporous Mater.* , 118, 334–340 pp.
- Man, S., Gao, W., Huang, L., Zhang, Y., Liu, C., and 2010**, Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents, *Fitoterapia* 81:703–714 pp.
- Mangas, S., Bonfill, M., Osuna, L., Moyano, E., Tortoriello J., Cusido, M., Rosa M. Pinol, T., and Palazo'n, J., 2006**, The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants, *Phytochemistry* 67:2041–2049 pp.
- Mari, A., Napolitano, A., Perrone, A., Piacente, S. and Pizza, C., 2012**, An analytical approach to profile steroidal saponins in food supplements: The case of *Ruscus aculeatus*, *Food Chemistry* 134:461–468 pp.
- Mason, B.P., Price, K.E., Steinbacher, J.L., and Bogdan, A.R. and McQuade, D.T., 2007**, Greener Approaches to Organic Synthesis Using Microreactor Technology *Chem. Rev.* 107:2300-2318 pp.
- Miletic, N., Nastasovic', A. and Loos, K., 2012**, Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications, *Bioresource Technology* 115:126–135 pp.
- Meléndez-Ortiz, H.I., Mercado-Silva, A. García-Cerda, L.A., Castruita, G., and Perera-Mercado, Y.A., 2013**, Hydrothermal Synthesis of Mesoporous Silica MCM-41 Using Commercial Sodium Silicate, *J. Mex. Chem. Soc.* 57(2): 73-79 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Mohamada, N.R., Marzukia, N.H.C. Buanga, N.A., Huyopb, F., and AbdulWahab, R.,** 2015, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29 (2): 205-220 pp.
- Miyazaki, M. and Maeda, H.,** 2006 Microchannel enzyme reactors and their applications for processing, *Trends in Biotechnology* Vol.24 No.10, doi:10.1016/j.tibtech.2006.08.002
- Morant, A.V, Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, Sanchez-Pérez, R., S.M. Møller, B.L. and Bak, S.,** 2008, β -Glucosidases as detonators of plant chemical defense, *Phytochemistry* 69: 1795–1813 pp.
- Morosanova, E.I.,** 2012, Silica andsilica–titania sol–gel materials: Synthesis and analytical application, *Talanta*, 102:114–122 pp.
- Negi, J.S., Negi, P.S., Pant, G.J. Rawat, M.S.M. and Negi, S.K.,** (2013) Naturally occurring saponins: Chemistry and biology, *Journal of Poisonous and Medicinal Plant Research* Vol. 1(1), 001-006 pp.
- Nisha, S., Arun, S.K. and Gobi, N.,** 2012, A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme, *Che Sci Rev Lett*, 2012, 1(3):, 148-155 pp.
- Oleszek, W.A.,** 2002 Chromatographic determination of plant saponins, *Journal of Chromatography A*, 967:147–162 pp.
- Osbourn, A.,** 1996, Saponins and plant defence-a soap story, *Trends in plant science*, vol. 1, No. 1
- Pannier, A., Soltmann, U., Soltmann, B., Altenburger, R., and Schmitt-Jansen, M.,** 2014, Alginate/silica hybrid materials for immobilization of green microalgae *Chlorella vulgaris* for cellbased sensor arrays, *J. Mater. Chem. B*, 2, 7896 pp.
- Shao, J., Huang, L.L., and Yang, Y.M.,** 2009, Immobilization of polyphenol oxidase on alginate-SiO₂ hybrid gel: stability and preliminary applications in the removal of aqueous phenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 84:633–635 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Song, Y.A., Batista, C., Sarpeshkar, R. and Han, J.,** 2008, Rapid fabrication of microfluidic polymer electrolyte membrane fuel cell in PDMS by surface patterning of perfluorinated ion-exchange resin, *Journal of Power Sources* 183:674–677 pp.
- Song, H., Tice, J.D. and Ismagilov, R.F,** 2003, A Microfluidic System for Controlling Reaction Networks in Time, *Angew. Chem.* 115, Nr. 7
- Park, D., Haam, S., Jang, K., Ahn, I.S. and Kim, W.S.,** 2005, Immobilization of starch-converting enzymes on surface modified carriers using single and co-immobilized systems: properties and application to starch hydrolysis. *Process Biochemistry*, 40: 53-61 pp.
- Rooke, J.C., Léonard, A., Sarmento, H., Meunier, C.F., Descy, J.-P., Su, B.-L.,** 2011, Novel photosynthetic CO₂ bioconverter based on green algae entrapped in low-sodium silica gels *J. Mater. Chem.*, 21: 951–959 pp.
- Ruan, G., Wei, M., Chen, Z., Su, R., Du, F. and Zheng, Y.,** 2014, Novel regenerative large-volume immobilized enzyme reactor: Preparation, *characterization and application*, *J. Chromatogr. B* 967:13–20 pp.
- Qasaimeh M. A., Ricoultb S. and Juncker D.,** 2013, Microfluidic probes for use in life sciences and medicine, *Lab Chip*, 13: 40–50 pp.
- Sakai, S., Ono, T., Ijima, H., and Kawakami, K.,** 2001, Synthesis and transport characterization of alginate/aminopropylsilicate/alginate microcapsule: application to bioartificial pancreas, *Biomaterials* 22 :2827-2834 pp.
- Sakai, S., Ono, T., Ijima, H., and Kawakami, K.,** 2002, Permeability of alginate/sol-gel synthesized aminopropyl-silicate/alginate membrane templated by calcium-alginate gel, *Journal of Membrane Science* 205: 183–189 pp.
- Sakai, S., Ono, T. Ijima, H., and Kawakami, K.,** 2002, Aminopropyl-silicate membrane for microcapsule-shaped bioartificial organs: control of molecular permeability, *Journal of Membrane Science* 202: 73–80 pp.
- Sakai, S., Ono, T., Ijima H., and Kawakami, K.,** 2003, Proliferation and Insulin Secretion Function of Mouse Insulinoma Cells Encapsulated in Alginate/Sol-Gel Synthesized Aminopropyl-Silicate/Alginate Microcapsule, *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 28: 267–272 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Schmid, A., Dordick, J.S., Hauer, B., Kiener, A., Witholt, B. and Wubbolts, M.**, 2001, Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature / Vol 409*
- Sheldon, R.A., Schoevaart, R. and Langen, L.M.V.** 2005, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review), *Biocatalysis and Biotransformation*; 23(3/4): 141-147 pp., doi: 10.1080/10242420500183378
- Sheridan, M.H., Shea, L.D. Peters, M.C. and Mooney, D.J.**, 2000, Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery., *J Control Release*, 64:91–102 pp.
- Shewale, J.G.**, 1982, Beta-Glucosidase - its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *Int. J. Biochem.*,14,: 435–443 pp., doi:10.1016/0020-711X(82)90109-4
- Skjåk-Bræk, G. Grasdalen., H. and Smidsrød, O.**, 1989, Inhomogeneous polysaccharide ionic gels., *Carbohydr Polym.*:31-54 pp.
- Sheridan, M.H., Shea, L.D. Peters, M.C. and Mooney, D.J.**, 2000, Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery., *J Control Release*, 64:91–102 pp.
- Shewale, J.G.**, 1982, Beta-Glucosidase - its role in cellulase synthesis and hydrolysis of cellulose. *Int. J. Biochem.*,14,: 435–443 pp., doi:10.1016/0020-711X(82)90109-4
- Skjåk-Bræk, G. Grasdalen., H. and Smidsrød, O.**, 1989, Inhomogeneous polysaccharide ionic gels., *Carbohydr Polym.*:31-54 pp.
- Studer, V., Hang, G., Pandolfi, A., Ortiz, M., Anderson, W.F. and Quake, S.R.**, 2004, Scaling properties of a low-actuation pressure microfluidic valve, *Jurnal of Applied Physics Volume 95*
- Stone H.A. and Kim, S.**, 2001, Vol. 47: 1250-1254 No. 6 AIChE Journal
- Sumper, M.**, 2004, Biomimetic Patterning of Silica by Long-Chain Polyamines, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43: 2251 –2254 pp.
- Tang, L., and Lee, N. Y.**, 2010, A facile route for irreversible bonding of plastic PDMS hybrid microdevices at room temperature, *Lab Chip*, 10:1274–1280 pp.
- Tuzlacı, E., Eryaşar-Aymaz, P.**, 2001, Turkish folk medicinal plants, Part IV: Gönen (Balıkesir) *Fitoterapia*, 72(4):323–343

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Vilkner T, Janasek D, Manz A.,** 2004, Micro total analysis systems Recent developments. *Anal Chem*;76:3373– 86 pp.
- Vincken, J.P., Heng, L., Groot, A.D. and Gruppen, H.,**2007, Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom, *Phytochemistry* 68: 275–297 pp.
- Yang, S. Jia, W.Z., Qian, Q.Y., Xia, X.H., and Zhou, Y.G.,** 2009, Simple Approach for Efficient Encapsulation of Enzyme in Silica Matrix with Retained Bioactivity *Anal. Chem.* 81, 3478–3484 pp.
- Weigla, B.H., Bardella, R.L. and Cabrerab, C.R.,** 2003, Ab-On-A-Chip For Drug Development, *Advanced Drug Delivery Reviews* 55:349–377 pp.
- Wohlgemuth, R., Plazl, I., Plazl, P.Z., Gernaey, K.V. and Woodley, J.M.,** 2015, Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis, *Trends in Biotechnology*, Vol. 33, No. 5
- Wojciechowska, K., Orczyka, M., Marcinkowska, K., Kobiela, T., Trappb,**
- Xu, L. and Lee, H.K.,** 2008, Preparation, characterization and analytical application of a hybrid organic–inorganic silica-based monolith, *Journal of Chromatography A*, 1195: 78–84 pp.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Aydın'da doğan Rabia Önbaş ilk ve ortaöğrenimini Aydın'da tamamladı. 2014 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden mezun oldu ve 2015 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Teknolojiler ABD'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

Yayınlar

Onbas, R., Kazan, A., Nalbantsoy, A. And Yesil-Çeliktaş Ö., 2016, Cytotoxic and Nitric Oxide Inhibition Activities of Propolis Extract along with Microencapsulation by Complex Coacervation, Plant Foods Hum Nutr (2016) 71:286–293 DOI 10.1007/s11130-016-0558-1

Bildiriler

Önbaş R., Yeşil-Çeliktaş, Ö. Propolisin Kompleks Koaservasyon Yöntemi ile Enkapsülasyonu, II. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi ve 11. Biyomühendislik Günleri, 15-16 Mart 2014, İzmir/ TÜRKİYE (Poster sunumu)

Önbaş, R., Kazan, A., Nalbantsoy, A., Yeşil-Çeliktaş, Ö. Fabrication of a gelatin-alginate microcarrier for propolis and its therapeutic effects, VII. Uluslararası Biyomühendislik Kongresi, 19-21 Kasım 2015, İzmir/TÜRKİYE (Poster Sunumu)

Müderrişoğlu, C., Önbaş, R., Çetin, B., Sargın, S., Yeşil-Çeliktaş, O. Design, fabrication and testing of PDMS microchips for enzymatic hydrolysis of saponins, VII. Uluslararası Biyomühendislik Kongresi, 19-21 Kasım 2015 İzmir/TÜRKİYE (Poster Sunumu)

Kazan, A., Önbaş, R., Tağ, O., Sargın, S., Yeşil-Çeliktaş, O., Enzymatic hydrolysis of Ginseng (Panax ginseng) saponins in

microfluidic systems, Lab-on-a-Chip&Microfluidics 2016, 15-16 Mart 2016, Madrid/İspanya (Poster sunumu)

Önbaş, R., Kazan, A., Yeşil-Çelikaş, Ö. Fabrication of a novel hybrid alginate-silica gel for microfluidic applications, Lab-on-a-Chip&Microfluidics 2016, 15-16 Mart 2016, Madrid/İspanya (Poster sunumu)

Görev Alınan Organizasyonlar

2nd Novel Fluidic Technologies and Applications Workshop, 9 –10 April, 2015, Ege University, Izmir, Turkey

Araştırma Projeleri,

TÜBİTAK, 113M050, Mikroakışkan sistemlerde sol-gel teknolojisi odaklı enzimatik tepkimeler: deneysel çalışma ve model geliştirme, Bursiyer, 2015-2016.

BAP, 15-FBE-012. *Ruscus* bitkisi saponin molekülünün mikroakışkan sistemde enzimatik hidrolizi, Araştırmacı, 2015-2016

Kazanılan Burslar,

TÜBİTAK Öncelikli Alanlar 2210-C BİDEP Yüksek Lisans Bursu-2016