

127129

**BORAJ YAĞININ ÇÖREKOTU (NİGELLA SATİVA L.)
LİPAZI İLE HİDROLİZİ VE γ -LİNOLENİK ASİDİN
ZENGİNLEŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Serhat İPEKLER
(506981026)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 1 Mayıs 2002
Tezin Savunulduğu Tarih : 30 Mayıs 2002

127129
İ.T. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Güldem ÜSTÜN
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Ayşe AKSOY
Prof.Dr. Artemis KARAALI

G.Üstün
A. Aksoy
Artemis Karaali

MAYIS 2002

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, boraj yağının çörekotu bitkisel lipazı katalizörlüğünde hidrolizi ve γ – linolenik asidin zenginleştirilmesi incelenmiştir.

Çalışmalarımın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini gördüğüm değerli hocam Sayın Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN' e, gaz kromatografi ve latroscan TLC analiz cihazlarını kullanmama imkan tanımasından ve her türlü yardımlarından ötürü değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ayşe AKSOY' a sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmama değerli katkılarından ötürü hocam Sayın Doç. Dr. Melek TÜTER' e ve Sayın Dr. Sevil ÖZGÜL-YÜCEL' e teşekkür ederim.

Hayatımın tüm kritik evrelerinde daima yanımda olan ve karşılıksız destek veren sevgili aileme de şükranlarımı sunarım.

Mayıs 2002

SERHAT İPEKLER

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. TEORİK ÇALIŞMA	2
2.1. γ -Linolenik Asit Hakkında Genel Bilgi	2
2.1.1. γ -Linolenik Asidin Besin Değeri ve Sağlık Açısından Önemi	2
2.1.2. γ -Linolenik Asit (GLA) Kaynakları	3
2.1.3. GLA İçeren Yağlardan GLA'nın Zenginleştirilmesi Üzerine Yapılmış Çalışmalar	8
2.2. Çörekotu Bitkisi, Tohumları ve Lipazı Hakkında Genel Bilgi	11
2.2.1. Çörekotu Bitkisi ve Tohumları	11
2.2.2. Çörekotu Lipazı ile Yürütülmüş Enzimatik Reaksiyonlar	11
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	14
3.1. Kullanılan Hammaddeler	14
3.1.1. Çörekotu Tohumlarının Karakterizasyonu	14
3.1.2. Boraj Yağının Karakterizasyonu	15
3.1.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
3.2. Çalışma Yöntemi	17
3.2.1. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu	17
3.2.2. Amonyum Sülfat ile Çöktürme Yoluyla Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması	17
3.2.3. Lipaz Ekstraktının veya Lipaz Tozunun Protein İçeriklerinin Belirlenmesi	18
3.2.4. Lipaz Ekstraktının veya Lipaz Tozunun Hidroliz Aktivitesinin Belirlenmesi	18
3.2.5. Boraj Yağının Hidrolizinde Uygulanan Çalışma Yöntemi	19
3.2.6. Hidroliz Ürünü Bileşiminin TLC-FID İatroscan Cihazı ile Belirlenmesi	19
3.2.7. Hidroliz Ürününün Kolon Kromatografisi ile Fraksiyonlanması	20
3.2.8. Hidroliz Ürünü Fraksiyonlarının Yağ Asitleri Bileşimlerinin Gaz Kromatografisi ile Belirlenmesi	21

3.3. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonunda Optimum Koşulların Saptanması	21
3.4. Lipaz Tozu Eldesi İçin Optimum Amonyum Sülfat Doygunluk Derecesinin Saptanması	22
3.5. Boraj Yağının Çörekotu Lipazı ile Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne Enzim Miktarının Etkisi	24
3.6. Boraj Yağının Çörekotu Lipazı ile Hidrolizinde Optimum Enzim Miktarının Belirlenmesi	36
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	39
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	47

KISALTMALAR

TG	: Triglicerid
DG	: Diglicerid
MG	: Monoglicerid
YA	: Yağ Asidi
GLA	: γ -Linolenik Asit
TAG	: Triaçilgliserol
DHA	: Dokosahekzanoik Asit
PUFA	: Polidoymamış Yağ Asidi
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
AOCS	: American Oil Chemists' Society
FID	: Flame Ionization Detector
TLC	: Thin Layer Chromatography



TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Evening primrose yağının yağ asitleri bileşimi.....	4
Tablo 2.2. Evening primrose yağı yağ asitlerinin trigliseridlerin 1, 2 ve 3 pozisyonlarındaki dağılımı.....	4
Tablo 2.3. Boraj yağı yağ asitlerinin bileşimi.....	5
Tablo 2.4. Boraj yağı yağ asitlerinin trigliseridlerin 1, 2 ve 3 pozisyonlarındaki dağılımı.....	6
Tablo 2.5. Frenk üzümü yağı yağ asitlerinin bileşimi.....	7
Tablo 2.6. Frenk üzümü yağı yağ asitlerinin trigliseridlerin 1, 2 ve 3 pozisyonlarındaki dağılımı.....	7
Tablo 3.1. Denizli yöresi çörekotu tohumlarının kimyasal bileşimi.....	15
Tablo 3.2. Boraj yağı yağ asitlerinin bileşimi.....	16
Tablo 3.3. Çörekotu tohumlarından farklı çözücü sistemleriyle elde edilmiş lipaz ekstraktlarının özellikleri.....	22
Tablo 3.4. Lipaz tozlarının aktivitelerinin ve protein içeriklerinin amonyum sülfat doygunluk derecesi ile değişimi.....	23
Tablo 3.5. Boraj yağının hekzan ortamında 1965 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.....	24
Tablo 3.6. Boraj yağının hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40 °C, 1965 U/g yağ, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5mL:50 mL)	25
Tablo 3.7. Boraj yağının hekzan ortamında 980 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.....	27
Tablo 3.8. Boraj yağının hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40°C, 980 U/g yağ, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5 mL:50 mL).....	28
Tablo 3.9. Boraj yağının hekzan ortamında 490 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.....	28
Tablo 3.10. Boraj yağının 490 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40°C, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5 mL:50 mL).....	29
Tablo 3.11. Boraj yağının 490 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40°C, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5mL:50mL).....	30
Tablo 3.12. Boraj yağının hekzan ortamında 326 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.....	30
Tablo 3.13. Boraj yağının hekzan ortamında 247 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.....	31

Tablo 3.14.	Boraj yağının hekzan ortamında 163 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.....	31
Tablo 3.15.	Boraj yağının 326 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40°C, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5 mL:50 mL.....	34
Tablo 3.16.	Boraj yağının 247 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40°C, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5 mL:50 mL.....	35
Tablo 3.17.	Boraj yağının 163 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40°C, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5 mL:50 mL.....	36
Tablo 3.18.	Boraj yağının çörekotu lipazı ile enzimatik hidrolizinde, ürün bileşenlerinde GLA içeriğinin enzim miktarına göre değişimi.....	37
Tablo 3.19.	Boraj yağının çörekotu lipazı ile enzimatik hidrolizinde, gliserid karışımı ile YA' da bulunan GLA' nın enzim miktarına göre değişimi.....	37

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1 : Boraj yağının hekzan ortamında, 40°C da ve 1965 U/g yağ enzim miktarında yürütölmüş hidrolizinde, ürün bileşiminin zamanla değışimi.....	25
Şekil 3.2 : Boraj yağının hekzan ortamında, 40°C da ve 980 U/g yağ enzim miktarında yürütölmüş hidrolizinde, ürün bileşiminin zamanla değışimi.....	27
Şekil 3.3 : Boraj yağının hidrolizinde, hidroliz ürününün TG içeriğine enzim miktarının etkisi.....	32
Şekil 3.4 : Boraj yağının hidrolizinde, hidroliz ürününün DG içeriğine enzim miktarının etkisi.....	32
Şekil 3.5 : Boraj yağının hidrolizinde, hidroliz ürününün MG içeriğine enzim miktarının etkisi.....	32
Şekil 3.6 : Boraj yağının hidrolizinde, hidroliz ürününün YA içeriğine enzim miktarının etkisi.....	33

BORAJ YAĞININ ÇÖREKOTU (*NIGELLA SATIVA* L.) LİPAZI İLE HİDROLİZİ VE γ -LİNOLENİK ASİTİN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ

ÖZET

γ - linolenik asit (18:3 n-6; cis, cis, cis-6, 9, 12-oktadekatrienoik asit) (GLA), insanlar ve diğer memeli hayvanlarda, linolenik asidin $\Delta 6$ -desaturaz enzimi ile desaturasyonu sonucunda oluşan ve daha sonra prostaglandin, tromboksan ve lökotrien sınıfı bağışıklık sağlayan ve iltihaplanmayı önleyici hormonlara dönüşen önemli bir ara metabolittir. GLA' nın direkt olarak kullanılmasıyla egzama gibi deri hastalıklarının, romatizmal eklem iltihablarının ve şeker hastalığında gözlenen nöropati şikayetlerinin tedavisinde etkili sonuçlar alınmıştır. Ayrıca GLA 'nın kolesterol metabolizmasını düzenlediği, tansiyon düşürücü etkisinin bulunduğu ve bazı kanser türlerinde tümör gelişimini de durdurduğu sonucuna varılmıştır. Bu özelliklerinden dolayı GLA sağlık ve gıda alanlarında kullanımı ve önemi giderek artan bir asit olmuştur. Günümüzde bu değerli yağ asidinin kaynaklarından saflaştırılarak zengin konsantreler halinde elde edilmesi üzerine olan çalışmaların sayısının hızla arttığı gözlenmektedir. GLA' nın boraj, evening primrose gibi yağlardan konsantre edilmesi için çeşitli yöntemler denenmektedir. Bu yöntemler arasında ön sırada yağların lipaz enzimi katalizörlüğünde seçimli hidroliz, seçimli esterleşme veya alkaliz reaksiyonları yer almaktadır. Enzimatik reaksiyonlarda esas olarak mikrobiyal enzimler kullanılmakta olup bitkisel lipazlar ile sayılı çalışmaya rastlanmıştır.

Bu çalışmada, boraj yağından çörekotu bitkisel lipazı katalizörlüğünde enzimatik hidrolizi yoluyla GLA' ca zengin ürünler eldesi amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk bölümünde, hidroliz reaksiyonlarında kullanılan enzimin çörekotu tohumlarından ekstraksiyonu ve amonyum sülfat ile çöktürme yoluyla kısmen saflaştırılması üzerinde çalışılmıştır. İçerisinde % 1 triton bulunan distile suyun en uygun ekstraksiyon çözücüsü olduğu ve bu çözücü sistemiyle elde edilmiş lipaz ekstraktından enzimin çöktürülmesinde %35 amonyum sülfat doygunluk derecesinde çalışılmasının uygun olacağı belirlenmiştir. Daha sonra, belirlenen bu optimum koşullarda hazırlanmış enzim boraj yağının hidroliz reaksiyonlarında kullanılmıştır. Proses parametrelerinin (hidroliz süresi ve enzim konsantrasyonu) hidroliz reaksiyonunun yürüyüşüne ve hidroliz ürünlerinde GLA zenginleşmesine olan etkileri incelenerek optimum koşullar saptanmıştır.

Boraj yağının çörekotu lipazı ile seçimli hidroliz reaksiyonlarında, lipazın GLA' ya karşı negatif seçicilik gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle 163 - 490 U/g yağ enzim konsantrasyonlarında yürütülmüş hidroliz reaksiyonlarında, GLA 'nın hidroliz ürünlerinden Digliserid (DG) ve Trigliserid (TG) fraksiyonlarında zenginleştiği saptanmıştır. En iyi sonuçlar 326 U/g yağ enzim miktarında elde edilmiş olup, 8 saat sonunda, orijinal boraj yağında % 21,9 oranında bulunan GLA' nın TG ve DG fraksiyonlarındaki yüzdesi sırasıyla % 29,6 ve % 41,8 'e yükselmiştir. Bu değerler, GLA' nın TG' de % 35, DG' de ise % 91 zenginleşebildiğini göstermektedir.

THE HYDROLYSIS OF BORAGE OIL BY BLACK CUMIN (*NIGELLA SATIVA* L.) LIPASE AND CONCENTRATION OF γ -LINOLENIC ACID

SUMMARY

γ - linolenic acid (18:3 n-6; cis, cis, cis-6, 9, 12-octadecatrienoic acid) (GLA) is an important intermediate precursor formed by desaturation of linoleic acid with $\Delta 6$ desaturase enzyme and then converted into local hormones like prostaglandins, tromboxanes, and leukotrienes enabling immunological and inflammatory response in humans and other mammals. It has been observed that direct use of GLA was effective in curing of eczema, rheumatoid arthritis and neuropatic complaints seen in diabetes. In addition, it has also been proved that GLA played an important role in the regulation of cholesterol metabolism and hypertension, and inhibition effect on the tumor development in some cancer cases. Therefore, GLA has become one of the important polyunsaturated fatty acids in health and food industry. Nowadays the large number of studies has been performed on the concentration of this valuable fatty acid from its known sources. Several methods has been used to concentrate GLA from the oils like borage and evening primrose oils. Lipase-catalysed enzymatic reactions of oils, such as selective hydrolysis, selective esterification or alcoholysis rank first among the methods. Generally, microbial enzymes are used in enzymatic reactions. However, only a limited number of studies conducted with plant lipases has been encountered in the scientific literature.

In this study, to obtain the GLA- rich products by the enzymatic hydrolysis of borage oil with black cumin (*Nigella sativa* L.) seed lipase was aimed. At the first part of the study, the extraction of lipase from seeds and its subsequent partial purification by the precipitation with ammonium sulphate were studied. Distilled water with 1 % triton was found to be the most suitable solvent for extraction. Optimum ammonium sulphate saturation level was established as 35 % for the precipitation of the extracted enzyme. The enzyme samples prepared at optimum conditions have been later used in hydrolysis reactions of borage oil. The effects of process parameters (hydrolysis time and enzyme concentration) on the course of hydrolysis reaction and on the enrichment of GLA in the hydrolysis products were investigated and the results were optimized.

In the selective hydrolysis reactions of borage oil with *Nigella sativa* lipase, lipase apparently exhibited a negative specificity toward GLA. GLA was concentrated in the Diglyceride (DG) and Triglyceride (TG) fractions of the hydrolysis products, particularly at 163 – 490 U/g oil enzyme concentrations. Best results were obtained at 326 U/g oil enzyme concentration. After 8 h, the level of GLA was raised from 21.9 % in the original borage oil to 29.6 % and 41.8 % in the TG and DG fractions, respectively. These values indicated that GLA was enriched 35 % and 91 % in TG and DG fractions, respectively.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akşam sefası veya Çuha çiçeği (Evening Primrose), boraj (Borage), Frenk üzümü (Blackcurrant) bitkileri tohumlarında doğal olarak bulunan gamma-linolenik asidin (18:3 n-6; GLA), insan vücudunun bağışıklık sistemini ve kolesterol metabolizmasını olumlu etkilemesi, kan basıncını düşürücü etki yapması yönüyle yüksek tansiyon hastalarının tedavisinde kullanılabilmesi, bazı kanser türlerinde tümör gelişimini durdurması, egzama ve benzeri deri hastalıklarının tedavisinde etkili olmasından dolayı tıp ve gıda alanında önemi gittikçe artan yağ asitleri sınıfına dahil olmuştur.

Besin ve tıbbi açıdan yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı öneminin artması, GLA' nın kaynaklarından saflaştırılması, zenginleştirilmesi üzerine olan çalışmaları da hızlandırmıştır. Literatürde, bu konuda çok sayıda yöntemin teklif edildiği ve uygulandığı görülmektedir. Belirtilen yöntemler arasında en iyi sonuçlar alınan ve endüstriyel üretimde de ümit vadeden yöntem enzimatik yol takip edilerek GLA' nın zenginleştirilmesidir. Bu yöntemlerde, yağlar lipaz enzimi varlığında seçimli hidroliz, seçimli esterleşme, alkoliz gibi reaksiyonlara tabi tutulmaktadır. Ancak bu çalışmalarda ticari mikrobiyal enzimlerin kullanıldığı ve bu alanda bitkisel lipazlar ile detaylı bir çalışmanın yürütülmediği gözlenmiştir.

Bu nedenle bu çalışmada, ilk kez boraj yağının bitkisel bir lipaz ile hidrolizi sistematik olarak incelenmesi ve GLA' ca zengin ürünler eldesi amaçlanmıştır. Çalışmada bitkisel lipaz olarak çörekotu (*Nigella sativa* L.)tohumlarından elde edilmiş ve kısmi saflaştırılmış lipaz örnekleri kullanılmıştır. Tezimizde önce tohumlardan lipazın ekstraksiyonu ve amonyum sülfat ile çöktürülmesi detaylı olarak incelenmiştir. Daha sonra optimum koşullarda hazırlanmış enzim preparatları ile hidroliz deneyleri yürütülmüş, mümkün olduğu kadar yüksek verimle ve yüksek yüzdede GLA içeren ürünler eldesi için uygulanması gereken optimum reaksiyon koşulları belirlenmiştir.

2. TEORİK ÇALIŞMA

2.1 γ -Linolenik Asit Hakkında Genel Bilgi

2.1.1 γ -Linolenik Asidin Besin Değeri ve Sağlık Açısından Önemi

γ - linolenik asit (18:3 n-6; cis,cis,cis-6,9,12-oktadekatrienoik asit) (GLA) insanlar ve diğer memeli hayvanlarda, linoleik asidin (18:2 n-6) Δ 6-desaturaz enzimi ile desaturasyonu sonucunda oluşan ve daha sonra prostaglandin, tromboksan ve lökotrien sınıfı bağışıklık sağlayan ve iltihaplanmayı önleyici hormonlara dönüşen önemli bir ara metabolittir. Desaturaz enzimi yüksek kolesterolü ve alkol içeren ortamlarda, kanserli yada virüs bulaşmış hücrelerde bozulmaya uğrayabilir, GLA ve GLA' dan oluşan bu hormonların eksikliği önemli derece de bağışıklık sistemini etkiler ve bu asidin diyet yoluyla organizmaya verilmesi gerekir. GLA bu açıdan gerek gıda, gerek sağlık sektöründe oldukça önemi olan bir polidoymamış yağ asitidir [1-5].

GLA' nın insan sağlığına olan direkt etkileri üzerine yapılmış çalışmalarda bu asidin deri ile ilgili çeşitli hastalıkların tedavisinde oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. Örneğin, egzama hastalarında Δ 6-desaturaz enzimi eksikliğinden ötürü yüksek seviye linoleik asit ve düşük seviye GLA varlığı saptanmış olup bu hastalara GLA diyetinin uygulanması ile kaşıntının ve antihistamin kullanım ihtiyacının azaldığı saptanmıştır. Dahası, GLA içeren yağ ile romatizmal eklem iltihabının ve eklem katılaşmasının ve şeker hastalığında gözlenen nöropati şikayetinin de tedavisi mümkün olabilmektedir [5].

Yapılan bir grup çalışmalarda, GLA' nın kolesterol metabolizmasını düzenlediği, toplam kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein konsantrasyonunu düşürecek ve yüksek yoğunluklu lipoprotein konsantrasyonunu arttıracak şekilde etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda, GLA' nın kan basıncını düşücü etki gösterdiği görüldüğünden yüksek tansiyon hastalarına GLA' ca zengin diyet uygulanması tavsiye edilmektedir [6-8].

GLA' nın ayrıca bazı kanser türlerinde tümör gelişimini durdurduğu belirlenmiştir. GLA' ca zengin evening primrose bitkisi yağı ile beslenen fare ve memeli hayvanlarda, özellikle deri ve meme kanseri oluşumuna karşı GLA' nın etkin bir koruma sağladığı sonucuna varılmıştır [9-11]. Bu konuda çalışmalar devam etmekte olup, GLA' ca zenginleştirilmiş ürünlerin gıda ve ilaç sanayiinde kullanımının önümüzdeki günlerde hızla artacağı beklenmektedir.

2.1.2 γ -Linolenik Asit (GLA) Kaynakları

GLA, Akşam sefası veya Çuha çiçeği (Evening primrose) (*Oenothera biennis*), Boraj (Borage) (*Borago officinalis*), Frenk üzümü (Blackcurrant) (*Ribes nigrum* L.) bitkileri ile çilekçiller ailesine mensup bazı bitkilerinin tohumlarında doğal olarak bulunmaktadır [12,13]. Son yıllarda bazı kültür küflerinden (*Mucor*, *Mortierella* spp.) GLA içeren yağlar üretilmiş olup bu konuda çalışmalar devam etmektedir [14-18]. Aşağıda sadece doğal olarak en fazla GLA içeren bitkiler hakkında bilgi verilmiştir:

Evening primrose bitkisi, tohumları ve yağı:

Evening primrose bitkisi ılıman iklim kuşağında özellikle Amerika ve Avrupa' da doğal olarak yetişmektedir. Son yıllarda tarımı da yapılmakta olup hektar başına tohum verimi 18 ton civarındadır. Türüne bağlı olarak uzunluğu 1,2-2,2 mm ve genişliği 0,5-1,0 mm arasında değişen prizmatik tohumları bir embriyoludur ve yağ bunun içerisinde bulunmaktadır. Şimdiye kadar 25 türünün analizi yapılmış olup, tüm türlerinde GLA bulunduğu ve tohumların % 24,0– % 33,1 arasında yağ içerdiği; tohumların % 2,0-% 3,7 oranında GLA taşıdıkları ve tohum yağlarında ise GLA yüzdesinin 8,5-12,1 arasında değiştiği belirlenmiştir. Ortalama olarak hektar başına yağ verimi 4,8 ton ve ortalama GLA veriminin ise 47,7 kg olduğu da saptanmıştır [19].

Genellikle tohumlardan yağ eldesinde, önce presleme ile yağ sızdırılır ve daha sonra küspede kalan yağ hekzan kullanılarak ekstrakte edilir. Süper kritik koşullarda karbon dioksit kullanarak evening primrose tohumlarından yağ ekstrakte edilebileceği de gösterilmiştir [20]. Tablo 2.1' de evening primrose yağının yağ asitleri bileşimi, Tablo 2.2' de ise bu yağ asitlerinin trigliseridlerin 1, 2 ve 3 pozisyonlarındaki dağılımı görülmektedir [19]:

Tablo 2.1. Evening primrose yağının yağ asitleri bileşimi [19].

Yağ Asitleri	% Bileşimi
14:0	< 0,1
16:0	5-9
16:1	< 0,1
18:0	1-2
18:1	8-12
18:2	70-79
18:3	< 0,1
18:3 (n-6)	8-13
20:0	< 0,3
20:1	< 0,1
22:0	< 0,1

Tablo 2.2. Evening primrose yağı yağ asitlerinin trigliseridlerin 1, 2 ve 3 pozisyonlarındaki dağılımı [19].

Yağ asitleri	2 pozisyonundaki yağ asitlerinin % bileşimi	1 pozisyonundaki yağ asitlerinin % bileşimi	3 pozisyonundaki yağ asitlerinin % bileşimi
16:0	1,8	9,6	6,8
18:0	1,5	4,4	0,3
18:1	7,6	8,0	7,1
18:2	78,9	73,3	74,2
18:3	--	--	--
18:3 (n-6)	10,7	3,6	13,5

Boraj bitkisi, tohumları ve yağı :

Avrupa' da özellikle Akdeniz yöresinde doğal olarak yetişen bu bitki, çok eski zamanlardan beri tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. γ -linolenik asidin sağlık açısından değerinin anlaşılmasıyla, GLA içeren bitkiler arasında en yüksek yüzdede GLA içermesinden dolayı bu bitkiye karşı ilgi de artmıştır. Bu yüzden, boraj yağı GLA'

nın konsantre edilmesi için en uygun hammadde olma özelliğini taşımaktadır. Dolayısıyla, birçok ülkede, özellikle Fransa'da tarımının yapılmasına başlanmıştır [19]. Yaklaşık 6 mm uzunluğunda ve 3 mm genişliğinde oval yapıda tohumlarının ortalama ağırlığı 15-20 mg dır. Tohumların yağ içeriği, türlerine ve tohumların olgunluk derecelerine göre değişim gösterir. Olgun tohumlarda % 28-33 arasında yağ bulunurken, olgunlaşmamış tohumlarda ise yağ yüzdesinin 13-18 arasında değiştiği belirlenmiştir. Kalıtsal özellikler bakımından, mavi çiçekli kuzey Avrupa Boraj bitkisi genotiplerinin İspanya' da yetişen beyaz çiçekli kültür genotiplerinden daha fazla GLA içerdikleri görülmüştür [21,22].

Tohumlardan yağ eldesinde, sıcakta veya soğukta preslemeyi müteakiben hekzan ile pres bakiyesinin ekstraksiyonu uygulanmaktadır. Pilot ölçekte süper kritik koşullarda karbon dioksit ile yağ ekstraksiyonu da incelenmiştir [23]. Tablo 2.3' de boraj yağı yağ asitlerinin bileşimi, Tablo 2.4' de ise bu yağ asitlerinin gliseridlerin 1, 2 ve 3 pozisyonundaki yüzde dağılımı verilmiştir:

Tablo 2.3. Boraj yağı yağ asitlerinin bileşimi [19].

Yağ asitleri	% Bileşimi
16:0	9-15
16:1	< 0,4
18:0	3,7
18:1	15-19
18:2	32-38
18:3	< 1,0
18:3 (n-6)	18-25
20:0	< 0,4
20:1	2-4
22:1	2-4

Tablo 2.4. Boraj yağı yağ asitlerinin trigliseridlerin 1, 2 ve 3 pozisyonlarındaki dağılımı [19].

Yağ asitleri	2 pozisyonundaki yağ asitlerinin % bileşimi	1 pozisyonundaki yağ asitlerinin % bileşimi	3 pozisyonundaki yağ asitlerinin % bileşimi
16:0	2,3	16,9	13,1
18:0	1,3	5,3	3,1
18:1	13,7	13,8	18,7
18:2	42,5	54,3	17,6
18:3 (n-6)	40,4	4,0	30,1
20:1	0,8	3,7	7,7
22:1	0,4	0,3	5,4

Ucciani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, cüce boraj bitkisi diye adlandırılan *Borago pygmaea* incelenmeye alınmıştır. Bu bitkinin tohum yağında % 25- % 28 oranında GLA bulunduğu saptanmıştır. Yukarıda bahsedilen boraj yağının ise % 19- % 25 oranında GLA içerdiği dikkate alınırsa *Borago pygmaea* bitkisi daha zengin bir GLA kaynağıdır [24].

Frenk üzümü bitkisi, tohumları ve yağı :

Doğal olarak Avrupa ve Asya' da pek çok yörede yetişen frenk üzümü bitkisi, özellikle meyve olarak tüketilmek amacıyla Fransa' da yaygın olarak yetiştirilmektedir. Tohumlar yuvarlak siyah renklidir. Kabuklarının kendine has bir aromatik, etli kısmının ise ekşi tadı vardır. Direkt olarak tohumlardan hekzan ile ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen yağın yağ asitleri bileşimi Tablo 2.5, yine bu yağ asitlerinin trigliseridlerin 1, 2 ve 3 pozisyonlarındaki dağılım yüzdesi Tablo 2.6' da verilmiştir [19].

Tablo 2.5. Frenk üzümü yağı yağ asitlerinin bileşimi [19].

Yağ asitleri	% Bileşimi
16:0	6-8
16:1	< 0,2
18:0	1-2
18:1	9-13
18:2	44-51
18:3 (n-3)	12-14
18:3 (n-6)	15-19
18:4 (n-3)	2-4
20:1	< 0,5

Tablo 2.6. Frenk üzümü yağı yağ asitlerinin trigliseridlerin 1, 2 ve 3 pozisyonlarındaki dağılımı [19].

Yağ asitleri	2 pozisyonundaki yağ asitlerinin % bileşimi	1 pozisyonundaki yağ asitlerinin % bileşimi	3 pozisyonundaki yağ asitlerinin % bileşimi
16:0	2,0	14,2	4,4
18:0	1,5	4,9	--
18:1	14,1	12,6	5,1
18:2	53,1	42,7	43,8
18:3 (n-3)	8,1	17,2	14,1
18:3 (n-6)	17,4	4,1	25,8
18:4 (n-3)	2,6	0,7	--

Yukarıda bahsedilen önemli GLA kaynaklarının dışında, doğada çilekçiller [25] ve *Symphytum officinale* [26] familyasına mensup bazı bitkilerin tohumlarında ve Çin' de yaygın olarak yetişen *Microula* bitkisi [27] tohumunda GLA bulunduğu da yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır.

2.1.3 GLA İçeren Yağlardan GLA' nın Zenginleştirilmesi Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Günümüzde, γ -linolenik asidin besin ve tıbbi açıdan değerinin anlaşılması bu asidin kaynaklarından saflaştırılması, zenginleştirilmesi üzerine olan çalışmaları da hızlandırmıştır. Bu amaçla, GLA içeren yağlara değişik yöntemler uygulanarak GLA' ca zengin ürünler elde edilmeye çalışılmaktadır. Uygulanan yöntemlere örnek olarak üre fraksiyonlaması [28,29], Y-zeolitleri [30] veya silikajel [31] üzerinde ayrılma, yağ vinterizasyonu [32] ve enzimatik reaksiyonlar sayılabilir. Bunlar arasında en iyi sonuçlar alınan ve endüstriyel üretimde de ümit vadeden yöntem enzimatik yolla zenginleştirmedir. Bu yöntemde, yağlar lipaz enzimi katalizörlüğünde seçimli hidroliz, seçimli esterleşme veya alkoliz reaksiyonlarına tabi tutulmaktadır. Aşağıda, bu konuda literatürde yer almış çalışmalar hakkında bilgi verilmeye çalışılmıştır:

Rahmatullah ve arkadaşları [33], *Candida cylindracea* lipazı kullanarak Evening primrose ve boraj tohum yağlarını hidroliz ettiklerinde, reaksiyon sonucunda hidroliz olmamış açilgliserollerde GLA zenginleşmesi olduğunu gözlenmişlerdir. Evening primrose tohum yağında başlangıçta % 9.4 oranında mevcut olan GLA' nın hidroliz olmadan kalan TAG' lerde % 46.5' e yükseldiğini; boraj yağının aynı koşullarda kısmi hidrolizinde ise başlangıçta boraj yağında % 20.4 oranında mevcut olan GLA' nın reaksiyon sonunda TAG' lerde % 47.8 değerine eriştiğini belirlemişlerdir.

Rahmatullah ve arkadaşlarının yapmış oldukları diğer bir çalışmada ise [34], Lipozim (*Rhizomucor miehei*) lipazı kullanılarak GLA' nın boraj ve evening primrose yağı yağ asitlerinden konsantre edilmesinde esterleşme reaksiyonu denenmiştir. Boraj ve evening primrose yağlarından kimyasal hidroliz ile elde edilen yağ asitleri, n-hekzan çözücü ortamında n-butanol ile esterleştirilmiştir. Araştırmacılar, enzimin öncelikle 16:0 (palmitik), 18:0 (stearik), 18:1 (oleik) ve 18:2 (linoleik) yağ asitlerini esterleştirdiğini dolayısıyla GLA' nın esterleşmeyen yağ asitleri kısmında konsantre hale geldiğini saptamışlardır. Boraj ve evening primrose yağları ile yürüttükleri bu deneyler sonucunda, içerisinde sırasıyla % 93 ve % 75 GLA bulunan esterleşmeyen yağ asitleri fraksiyonları elde etmişlerdir.

Foglia ve arkadaşları da [35], benzer çalışmada silikajel üzerine immobilize ve cis- δ -9 çift bağlı doymamış yağ asitlerine karşı seçiciliği bilinen *Geotrichum candidum*

lipazı ile boraj yağı yağ asitlerinin esterleştirilmesi üzerinde çalışmışlardır. Bu yolla, başlangıçta boraj yağında % 25 oranında GLA mevcut iken, esterleşme sonunda esterleşmeden kalan yağ asitlerinde GLA miktarı % 70 üzerine çıkartılmıştır. Elde edilen GLA' ca zengin karışımda, GLA yanında C-20 ve daha uzun zincirli monodoymamış yağ asitlerinin bulunduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile bu enzimin özellikle uzun zincirli yağ asitlerine karşı seçicilik gösterdiği de ortaya konmuştur.

Schmitt ve arkadaşlarının yürüttükleri benzer esterleşme reaksiyonunda ise [36], boraj yağı yağ asitlerinin bu kez immobilize *Candida rugosa* lipazı ile GLA' ce zenginleştirilmesi incelenmiştir. Bu çalışmada, *Candida rugosa* lipazının Amberlit IRC50, IRA35 ve IRA93 ve Duolit A7, A368 ve A568 iyon değiştirici reçineleri üzerine immobilizasyonları yapılmış ve immobilizasyonda kullanılan taşıyıcının lipaz enziminin seçiciliğine olan etkisi de araştırılmıştır. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, taşıyıcının enzim seçiciliğini bir miktar değiştirdiği ancak her bir immobilize enzim örneğinin kesinlikle GLA' ya negatif seçicilik gösterdiği belirlenmiştir. Esterleşme reaksiyonunu sonunda ortamdaki palmitik, stearik, oleik ve linoleik asitlerinin kolaylıkla esterleşmiş olduğu ve esterleşmemiş yağ asitleri fraksiyonunda GLA' nın orijinal yağa göre 3 katı kadar konsantre hale gelmiş olduğu tespit edilmiştir.

Aggelis ve çalışma grubu, direkt olarak boraj yağı metil esterlerinin anyon değiştirici reçine üzerine immobilize edilmiş *Mucor miehei* lipazı ile hidrolizinde de GLA' nın zor hidrolize olduğunu ve hidroliz olmayan ester fraksiyonunda bu asidin derişikleştğini göstermişlerdir [37].

GLA' ca zengin ürünlerin elde edilmesi üzerinde çalışan diğer bir çalışma grubu ise Shimada ve arkadaşlarıdır. Shimada ve arkadaşları, boraj yağından GLA konsantre edilmesinde, immobilize *Rhizopus delemar* enziminin etkinliğini incelemişlerdir. Araştırmacılar önce boraj yağını *Candida rugosa* [38] veya *Pseudomonas* sp.[39] enzimi ile hidroliz ederek içerisinde % 46 GLA bulunan yağ asitlerini elde ettikten sonra, bu asit fraksiyonunu *Rhizopus delemar* enzimi kullanarak lauril alkol ile esterleştirmişlerdir. Esterleştirme reaksiyonunu müteakiben ürüne uyguladıkları distilasyon ve üre fraksiyonlaması gibi saflaştırma işlemleri sonucunda % 98,6 GLA içerikli yağ asitleri ürününü elde edebilmişlerdir [39,40].

Huang ve çalışma arkadaşlarının yürüttükleri çalışmalarda ise, yine önce boraj yağının hidroliziyle serbest yağ asitleri elde ettikleri daha sonra bu asitleri n-butanol ile esterleştirdikleri görülmektedir. Yukarıda açıklanan çalışmalardan farklı olarak araştırmacıların izo-oktanlı ortamda tüm reaksiyonları yürüttükleri, hidrolizde propilen üzerine immobilize *Candida rugosa* lipazı [41], esterleşmede ise Lipozim IM-20 ve IM-60 enzimlerini (*Rhizomucor miehei*)[42,43] kullandıkları ve esterleşme sonucu % 75 GLA içerikli yağ asitleri fraksiyonu elde ettikleri anlaşılmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, balık yağının içindeki eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksanoik asit (DHA) gibi n-3 yağ asitlerinin özellikle kalp hastalıklarına, kansere ve iltihaplanmaya tedavi edici ve koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur. Ayrıca, özellikle DHA' nın, beyin gelişmesini, öğrenmeyi, hafızayı ve görsel fonksiyonları geliştirdiği de saptanmıştır. Genel olarak polidoymamış yağ asitleri (PUFA) olarak adlandırılan EPA ve DHA' nın insan sağlığına faydalarının anlaşılmasıyla, bu asitlerin gıda ve farmasötik alanda kullanımı önem kazanmış ve kullanımı artmıştır. Dolayısıyla, bu asitlerce zengin ürünlerin eldesi üzerinde çalışmalar da önem kazanmıştır. Literatürde bu konuda yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır [44,45]. Son yıllarda n-3 ve n-6 polidoymamış yağ asitlerinin sağlık açısından öneminin anlaşılması, her iki sınıf yağ asitlerince zengin ürünlerin eldesi üzerine çalışmaları başlatmıştır. Literatürde, evening primrose ve boraj yağlarına enzimatik transesterifikasyon reaksiyonları ile EPA ve DHA asitlerinin katıldığı ve böylece n-3 polidoymamış yağ asitlerinin n-6 polidoymamış yağ asitlerine oranı 0,42-0,62 arasında değişen, besin değeri çok yüksek yağlar oluşturulduğu görülmektedir [46-50].

Yukarıda açıklanan çalışmalarının hepsinde ticari mikrobiyal enzimler ve evening primrose ile boraj yağı kullanılmıştır. Diğer kaynaklardan GLA zenginleştirilmesi üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır. Frenk üzümü yağı [51] ve küflerden elde edilen yağlardan [52,53] GLA derişikleştirilmesi rastlanan çalışmalardır. Bitkisel lipazlar ucuz, kolay elde edilebilen ve seçicilik gösteren alternatif lipazlar olmasına rağmen, bitkisel lipazlar kullanılarak GLA derişikleştirilmesi üzerine literatürde sayılı çalışmaya rastlanmıştır. Çimlenmiş rapiska [54,55] ve Vernonia [56] tohumlarından elde edilmiş lipazların GLA' ya negatif seçicilik gösterdiği tespit edilmiştir.

2.2 Çörekotu Bitkisi, Tohumları ve Lipazı Hakkında Genel Bilgi

2.2.1 Çörekotu Bitkisi ve Tohumları

Latince Semen Nigella, Almanca Schwarzkuemmel, Fransızca Semen Nigelle ve İngilizce Black Cumin (Fennel Flower) olarak adlandırılan çörekotu (*Nigella sativa* L.) bitkisi, Ranunculacea ailesine mensuptur. Doğal olarak Doğu Akdeniz ülkelerinde yetişen bu bitkinin Hindistan' da ve Türkiye' de tarımı da yapılmaktadır. Tohumlarının ve yağının antibakteriyel ve terapik etkilerinden dolayı, idrar söktürücü, gaz giderici olarak kullanımı yaygındır. Yakın doğu ve Hindistan'da baharat olarak da tüketilmektedir [57].

Çörekotu, Haziran-Temmuz ayları arasında yeşil-açık mavi renkli çiçekler açan, 20-40 cm boyunda bir yıllık otsu bir bitkidir. Gövdesi dik ve kısa tüylüdür. Yaprakları gövdeye, alttakiler saplı, üsttekiler ise sapsız olarak alternant düzende bağlanmışlardır. Yaprakları çok parçalıdır ve her parça lineer-lanseolat şeklinde sivri uçlu ve tüylüdür. Bitkinin çiçekleri uzun saplı, kaliks oval şekilli, beş petalsit parçadan oluşmuştur. Korolla 2 loplu olup, nektarium 5 tanedir. Dişi organ 5 karpelden yapılmıştır. Ovarium üstte ve karpellerin hemen hemen uca kadar birleşmesinden ötürü 5 gözlü gözüktür. Stilus 5 tane ve uzunca gaga görünümündedir. Meyve, içi tohum dolu şişkin bir kapsül şeklindedir. Tohumlar siyah renkli, oval şekilli ve 3 yüzlüdür. Kumlu toprakları seven bitkinin tohum hasatı Ekim ayında yapılır, dekar başına tohum verimi 170-240 kg dır. Türkiye'de *Nigella sativa* L., *Nigella damascena* L. ve *Nigella arvensis* L. türleri bulunur ve en çok Afyon, Burdur, Denizli ve Isparta yöresinde yetişir [57].

2.2.2 Çörekotu Lipazı ile Yürütülmüş Enzimatik Reaksiyonlar

Çörekotu tohumlarının yüksek lipaz aktivitesine sahip olduğu ve bu lipazın biyokatalizör olarak yağların hidroliz ve esterleşme reaksiyonlarında kullanılabilirliği İTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalında yürütülmüş çalışmalarla saptanmıştır [58-69]. Son 10 yılda yapılmış bu çalışmalar hakkında aşağıda özet bilgi verilmiştir:

Çörekotu tohumlarının çimlenme koşulları dışında da yüksek lipaz aktivitesi gösterdiği, öğütülmüş tohumlarda otohrolizin etkisiyle serbest yağ asitleri miktarının % 50' lere ulaştığı Üstün ve arkadaşları tarafından ilk kez belirlenmiştir

[58]. Daha sonra bu enzimin tohumlardan ekstraksiyonunda optimum ekstraksiyon koşulları belirlenmiş [59], karakterizasyonu ve şekerler ile polietilen bileşikleri ortamında stabilizasyonu incelenmiştir [60,61]. Çörekotu lipazının immobilizasyonu üzerinde yürütülmüş çalışmalarda ise enzimin selit üzerine adsorpsiyonda ortam pH'ının etkisi ve adsorpsiyon mekanizması açıklığa kavuşturulmuştur [62].

Dandik ve Aksoy, çörekotu lipazının hidroliz etkinliğini inceledikleri çalışmalarda, tohumlarda çörekotu yağının hidrolizinin 20-40 °C arası 1. mertebe, 50-70 °C' larda ise 2. mertebe reaksiyon mekanizmasına göre gerçekleştiğini [63], kullanılmış yağ hidrolizinde ise enzim olarak öğütülmüş veya preslenmiş çörekotu tohumlarının direkt olarak kullanımının veya aseton tozu olarak çökertilmiş enzimin ilavesinin fark etmediğini, her üç formda lipaz enzimiyle % 95 gibi yüksek hidroliz derecesine ulaşıldığını tespit etmişlerdir [64-66].

Oleik asit ile metanolün esterleştirilmesinde, 45 °C' da metanol:yağ oranının 1:1,5 olması durumunda, toplam ağırlığın % 50' si kadar preslenmiş çörekotu tohumlarının kullanılması ile % 50 verimle ester elde edilebilmiştir [65]. Preslenmiş tohumlar, gliserin ile oleik asidin esterleştirilmesinde de etkin katalizör etkisi göstermiştir. Gliserin:oleik asit oranının 4:1 olması durumunda, 45 °C' da ve % 45 tohum kullanımında, elde edilen ester karışımında % 16 triolein, % 37 diolein ve % 31 monoolein oluştuğu belirlenmiştir. Reaksiyonda sıcaklığın 55 °C' a çıkarılması ve reaktanların stokiometrik oranda kullanılmasıyla triolein miktarının % 82' ye yükseldiği de araştırmacılar tarafından belirlenmiştir [67].

Gliserin ile ayçiçeği yağı yağ asitleri arasındaki esterleşme reaksiyonunda 55 °C ve stokiometrik reaktan oranında, % 45 preslenmiş çörekotu tohumları kullanılarak % 78' lik trigliserid oluşumu sağlanabilmiştir [67].

Dandik ve Aksoy [68], çörekotu lipazını aseton tozu formunda kullanarak da kızartma yağının gliseroliz reaksiyonunu gerçekleştirmeye muvaffak olmuşlardır.

TÜBİTAK ile CNR (İtalya Ulusal Araştırma Kurumu) arasında yürütülen ve halen devam eden ortak projede ise, çörekotu tohumlarından lipaz ekstraksiyonunda optimum koşulların belirlenmesi; enzimin amonyum sülfat ile çöktürülmesiyle kısmi saflaştırılması; kısmen saflaştırılmış olan bu enzimin müteakiben çeşitli kolonlarda daha ileri derecede saflaştırılması ve enzimin yapısal karakterizasyonu; saflaştırılmış enzimin enantioseçiciliği ile yağ asitlerine olan seçiciliğinin araştırılması

hedeflenmiştir [69]. Söz konusu bu ortak projede yer alan çörekotu lipazının yağ asidi seçiciliğinin incelenmesinde, yağ asidi olarak GLA seçilmiş ve bu değerli aside karşı çörekotu lipazının seçiciliğinin incelenmeye alınmasına karar verilmiştir. Bu yüksek lisans tezinde, sözü edilen projenin bu bölümü üzerinde çalışılmıştır. Bu amaçla, amonyum sülfatla kısmi saflaştırılmış çörekotu lipazı kullanılarak GLA' ca zengin boraj yağının hidrolizi üzerinde çalışmalar yürütülmüştür. Enzimin GLA spesifikliğınden faydalanarak boraj yağından GLA' ca zengin ürün elde edebilmek için optimum koşullar belirlenmiştir.



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Hammaddeler

3.1.1 Çörekotu Tohumlarının Karakterizasyonu

Bu çalışmada kullanılan çörekotu tohumları Denizli yöresine ait olup, İstanbul Mısır Çarşısı'ndan temin edilmiştir. Tohum kahve değirmeninde öğütüldükten sonra elenmiş ve 425 µm ile 850 µm arası fraksiyon, tohum karakteristiklerinin saptanmasında ve lipaz ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Tohumların kimyasal bileşimi (yağ, protein, nem, kül ve ham elyaf içeriği) standart AOCS (American Oil Chemists' Society) yöntemlerine göre belirlenmiştir. Aşağıda uygulanan bu yöntemler hakkında açıklayıcı özet bilgiler verilmiştir:

Çörekotu tohumlarının nemi 105 °C' da sabit tartıma kadar kurutma sonrası kütle kaybından; kül yüzdesi ise tohumların 600 °C' da 16 saat yakılması sonucu elde edilen bakiye üzerinden hesaplanmıştır. Kül bileşenlerinin analizi yapılmamıştır.

Tohumların yağ ve protein içeriklerinin belirlenmesinde standart Soxhlet ve Kjeldahl cihazları kullanılmıştır. Soxhlet cihazında hekzan ile 6 saat süre içinde ekstrakte edilen yağ miktarından yağ yüzdesine geçilmiştir. Kjeldahl cihazında belirlenen % N değerinin ise 6.25 dönüşüm faktörü ile çarpımından protein yüzdesi hesaplanmıştır.

Ham elyaf yüzdesinin bulunmasında, önce yağı giderilmiş tohumlardan 0.25 M H₂SO₄ ve 0.6 M NaOH ile kül ve elyaf dışı tüm komponentler ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sonucu geriye kalan, sadece kül ve elyaf içeren, bakiyenin daha sonra kül içeriği saptanmıştır. Bakiye tartımı ile kül miktarı arasındaki fark, ham elyaf yüzdesinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

Çörekotu tohumlarının karbonhidrat içeriği ise: 100- % (nem+yağ+protein+kül) eşitliğine göre hesaplama yoluyla belirlenmiştir.

Çörekotu tohumlarının açıklaması yapılan yöntemlere göre belirlenen kimyasal bileşimi Tablo 3.1' de verilmiştir:

Tablo 3.1. Denizli yöresi çörekotu tohumlarının kimyasal bileşimi.

Bileşen	Bileşim (%)
Nem	9,4
Yağ	35,4
Protein	23,3
Kül	4,0
Ham elyaf	6,7
Karbonhidrat	27,9

3.1.2 Boraj Yağının Karakterizasyonu

Çalışmalarımızda kullandığımız boraj yağı Sigma Chemical Company (Buchs, İsviçre)' den temin edilmiştir. Boraj yağının yağ asitleri bileşimi kapiler gaz kromatografisi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, boraj yağından BF₃ ile yağ asitlerinin metil esterleri hazırlanmış ve Hewlett-Packard 5890 Seri II (Hewlett-Packard, Waldron, Almanya) cihazına beslenmiştir. Uygulanan kromatografik analiz yönteminin özel ayrıntısı aşağıda açıklanmıştır:

Dedektör tipi	: FID
Kolon	: Ultra 2 (25m x 0,32 mm), 0,52 µm film kalınlığında %5 difenil, %95 dimetil polisilokzan
Dedektör sıcaklığı	: 250 °C
Enjektör sıcaklığı	: 200 °C
Kolon Sıcaklık Prog.	: 150 °C'da 5 dak; 150-225°C (5 °C/dak); 225°C'da 30 dak
Taşıyıcı gaz hızı (N ₂)	: 1,72 mL/dak
Hava hızı	: 450 mL/dak
H ₂ hızı	: 69 mL/dak
Split oranı	: 50:1
Enjeksiyon	: 0,5 µl.

Kromatogramlarda yer alan piklerin tanımlanmasında, 8:0, 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 ve 20:0 yağ asitlerinden ibaret standart yağ asitlerinin metil esterlerinin aynı koşullarda cihazdan elde edilmiş kromatogramları kullanılmıştır.

Deneylerimizde kullanılan boraj yağı yağ asitlerinin bileşimi Tablo 3.2' de verilmiştir:

Tablo 3.2. Boraj yağı yağ asitlerinin bileşimi.

Yağ asidi	% Bileşim
14:0	0,1
16:1	0,2
16:0	10,8
18:3	21,9
18:2	38,1
18:1	15,2
18:0	3,8
20:1	4,5
20:0	0,3
22:1	3,0
22:0	0,1
24:1	1,9
24:0	0,1

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Boraj yağının hidroliz reaksiyonlarında çörekotu (*Nigella sativa*) lipazı kullanılmış olup, enzim tohumlardan ekstrakte edilmiş, amonyum sülfat ile çöktürüldükten sonra bu formda deneylerde kullanılmıştır. Enzimin aktivitesinin tayini ile hidroliz ürünlerinin fraksiyonlanması ve tanınmasında kullanılan tüm çözücüler ve kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2 Çalışma Yöntemi

3.2.1 Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu

Tohumlardan lipaz eldesinde önce, tohumların içerdiği yağ hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Yağ giderilmesi esnasında lipazın aktivite kaybını önlemek amacıyla, bu ekstraksiyon soğukta ve bu amaç için özel olarak yaptırılmış Soxhlet cihazlarında gerçekleştirilmiştir. Soğutma ceketli ekstraksiyon haznesine yaklaşık 100 gram öğütülmüş çörekotu tohumlarını içeren kartuş yerleştirildikten sonra hekzan ile 6 saat ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. 6 saat sonunda yağı giderilmiş tohumlar cihazdan alınarak kurutma kağıdı üzerine yayılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Yaklaşık 1 saat sonra tamamen desolventize olmuş tohumlar cam kavanoza alınmış ve buzdolabında saklanmıştır.

Yağı giderilmiş tohumlardan mümkün olan en yüksek verimle ve en yüksek aktivitede enzim ekstrakte edebilmek amacıyla, bir seri ekstraksiyon deneyleri yürütülmüştür. Bu amaçla, önce 16 gram civarı yağı giderilmiş tohum ayrı ayrı 70 mL %1 triton içeren fosfat tamponu (10 mM, pH 7), %1 triton ve %10 etilen glikol içeren fosfat tamponu, %1 triton içeren distile su ve %1 triton ve %10 etilen glikol içeren distile su ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon çalkalayıcıya yerleştirilmiş 500 mL'lik plastik bidonlar içerisinde yapılmıştır. Ekstraksiyon 6 saat sürdürülmüş ve süre sonunda bu karışım olduğu gibi buzdolabında bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün, elde edilen homojenat katı partiküllerin uzaklaştırılması için önce iki katlı tülbentten süzölmüş, daha sonra bu süzöntü 10 000 devirde 30 dakika santrifüjlenmiştir. Böylece elde edilen bu çözelti, çalışmalarımızda "Lipaz ekstraktı" olarak adlandırılmıştır. Lipaz ekstraktının hacmi ölçülmüş, protein içeriği ile lipaz aktivitesi tayin edilmiştir. 4 farklı çözücü sisteminde elde edilen bu lipaz ekstraktlarının mukayesesi ile optimum ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir.

3.2.2. Amonyum Sülfat ile Çöktürme Yoluyla Lipaz Enziminin Kısmi Saflaştırılması

Yöntemin esası, enzim çözeltisine elektrolit katılarak proteinlerin sudaki çözünürlüğünün azaltılması ve bu yolla enzim proteinlerinin çökmesini sağlamaktır. Elektrolit olarak her iyonik tuz bu amaçla kullanılabilirse de amonyum sülfat ucuz ve suda yüksek çözünürlük göstermesinden dolayı en fazla kullanılan tuzdur. Çörekotu lipazının bu yöntemle kısmen saflaştırılmasında amonyum sülfat kullanılmış ve

optimum amonyum sülfat konsantrasyonunun tespiti için 3 ayrı amonyum sülfat doygunluk derecesinde çöktürme işlemleri yürütülmüştür. Bu amaçla, lipaz ekstraktlarına amonyum sülfat konsantrasyonu % 35, % 40 ve % 50 olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilmiştir. Katı amonyum sülfat yavaş yavaş 500 devir/dakika hızla karıştırılan ekstrakta katılmış, daha sonra bu karışım 3 saat 4 °C' da bekletilmiştir. Bu esnada çöken enzim 10 000 devirde 20 dakika santrifüjlenerek çözültiden ayrılmış ve kullanılabilecek kadar buzdolabında saklanmıştır. Enzim çökeleğinin aktivitesi ve protein içeriği saptanmıştır.

3.2.3. Lipaz Ekstraktının veya Lipaz Tozunun Protein İçeriklerinin Belirlenmesi

Lipaz numunelerinin protein içeriği, Biüret yöntemine göre Randox Total Protein Reaktifi (Randox Lab. Ltd., Antrim, İngiltere) kullanımı ile spektrometrik olarak belirlenmiştir.

3.2.4. Lipaz Ekstraktının veya Lipaz Tozunun Hidroliz Aktivitesinin Belirlenmesi

Lipaz preparatlarının spesifik aktivitesi, 1 mL lipaz ekstraktı veya 1 gram enzim tozu tarafından 1 dakika içerisinde trigliseridlerden açığa çıkarılan yağ asitlerinin µmol cinsinden miktarı olarak tarif edilmiştir.

Aktivite tayininde, trigliserid substratı olarak zeytinyağı (Riviera tipi) kullanılmıştır. 0,5 mL zeytinyağı, 0,5 mL 0,1 M CaCl₂ çözeltisi, 2 mL fosfat tampon çözeltisi (0,06 M; pH 7) ve 6 mL distile su karışımı önce, çalkalayıcı su banyosunda 10 dak. 37 °C' da karıştırılmıştır. Böylece reaktanların sıcaklığı 37 °C' a getirilmiştir. Daha sonra bu karışıma, 1mL serbest enzim (lipaz ekstraktı) veya enzim tozu (10-20 mg) ilave edilmiş ve 20 dakika daha aynı sıcaklıkta karışım çalkalanmıştır. Süre sonunda, bu karışıma 20 mL aseton-etil alkol karışımı (1:1, hacmen) katılarak enzim inaktive edilmiş ve hidroliz reaksiyonu sonucu zeytinyağından açığa çıkan yağ asitlerinin miktarı 0,01 N NaOH ile timolftalein indikatörüne karşı pH 10 kadar titre edilerek belirlenmiştir. Paralel olarak, aynı koşullarda şahit denemeler de yapılmıştır.

Reaksiyon sonunda enzimin 1 dakikalık zaman içerisinde açığa çıkardığı yağ asitleri miktarı, µmol olarak, aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

Spesifik aktivite (U/mL veya g) ($\mu\text{mol} / \text{dak. mL veya g}$) = $(V_1 - V_2) \cdot C \cdot 1000 / 20 \cdot E$

Burada:

V_1 = Numune için sarf edilen NaOH hacmi (mL)

V_2 = Şahit için sarf edilen NaOH hacmi (mL)

C = NaOH konsantrasyonu (mol/L)

E = Numunenin miktarı (mL veya g)' dir.

3.2.5. Boraj Yağının Hidrolizinde Uygulanan Çalışma Yöntemi

Çörekotu lipazının γ -linolenik aside karşı bir seçiciliğinin olup olmadığını ve hidroliz yoluyla bu asidin konsantre edilmesinin mümkün olup olamayacağını belirlenmesi için, çörekotu lipazı ile boraj yağının hidrolizi detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Hidroliz reaksiyonu 250 mL' lik cam balonda yürütülmüştür. Balon, sıcaklığı ayarlanabilen su banyosuna yerleştirilmiş, banyonun sıcaklığı 40 °C' a ayarlanmış ve özel bir ısıtma ünitesi (Framo-Geraetetechnik M22/1 5655, Franz Morat K G, Eisenbach, Almanya) ile $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle sabit tutulmuştur. Balona 2 gram boraj yağı, 5 mL su, 50 mL hekzan ve belirli Unit enzim konulmuştur. Karışım manyetik karıştırıcı ile 400 devir/dak hızında karıştırılarak reaksiyon başlatılmıştır. Hidroliz reaksiyonunun yürüyüşü, karışımdan belirli zaman aralıklarında alınan numunelerin TLC-FID (Thin Layer Chromatography-Flame Ionization Dedector) Iatroscan cihazında (Iatron Lab., Inc., Tokyo) trigliserid (TG), digliserid (DG), monogliserid (MG) ve serbest yağ asitleri (YA) yüzde bileşimi saptanarak takip edilmiştir. Bu amaçla alınan numuneler, önce 90-100 °C' lık bir su banyosunda 15 dakika ısıtılmış, böylece lipaz enziminin inaktive edilmesi sağlanmıştır. Enzim inaktive edildikten sonra numunelere 2 mL hekzan ve 2 mL su ilave edilerek 10 000 devir/dak hızda santrifüjlenmiştir. Daha sonra santrifüj tüpünden alınan hekzan fazı üzerine yeterli miktarda sodyum sülfat ilave edilerek susuz hale getirilmiş ve TLC-FID analizi için saklanmıştır.

3.2.6. Hidroliz Ürünü Bileşiminin TLC-FID Iatroscan Cihazı ile Belirlenmesi

Yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan numunelerin bileşimleri Iatroscan cihazında S III çubukları (rodları) kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre belirlenmiştir:

0,1 gram numunenin 10 mL kloroform içindeki çözeltisinden alınan 1 µL' lik örnek, rodrlara enjekte edildikten sonra rodrlar, içerisinde Petrol eteri (40 – 60°C) : Dietil eter : Asetik asit (35:20:1, hacmen) çözücü karışımı bulunan küvetlerde 20 dakika tutulmuştur. 10 dakika havada, 10 dakika 110°C' lik etüvde kurutulan rodrlar daha sonra cihaza yerleştirilmiş ve otomatik olarak aşağıdaki koşullarda taraması yapılmıştır :

Dedektör : FID
Hidrojen akım hızı : 160 mL/dak
Hava akım hızı : 2000 mL/dak
Tarama hızı : 30 s/scan

Otomatik yazıcıdan elde edilen piklerin tanımlanması ve kantitatif değerlendirilmesi, standard TG (Trigliserid), 1,3- DG (1,3-Digliserid), 1,2-DG (1,2-Digliserid), 1-MG (1-Monogliserid), 2-MG (2-Monogliserid), ve YA (Yağ Asitleri) karışımı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.7. Hidroliz Ürününün Kolon Kromatografisi ile Fraksiyonlanması :

Boraj yağının hidrolizinde elde edilen hidroliz ürününde hangi fraksiyonda γ-linolenik asidin zenginleştiğini belirlemek için, hidroliz ürünü kolon kromatografisi ile TG, DG ve MG fraksiyonlarına ayrılmıştır. Bu amaçla, (30x1,9 cm iç çapı) boyutlarındaki bir cam kolona, 25 gram Florisil (100-200 mesh; % 7 su içeren) hekzan ile karıştırıldıktan sonra doldurulmuştur. Hassas olarak tartılan 1 gram numune, 10 mL hekzanda çözüldükten sonra kolona beslenmiş ve kolona TG fraksiyonunu elüye etmek için 200 mL hekzan:dietil eter (85:15, hacmen); DG fraksiyonunu ayırmak için 250 mL hekzan:dietil eter (50:50, hacmen) ve MG fraksiyonunu almak için 200 mL dietil eter sırayla beslenmiştir. Solvent beslemeleri dakikada 2 mL sabit hızda yapılmıştır. Kolondan alınan elüatlar 10' ar mL' lik porsiyonlar halinde toplanmış ve içerikleri TLC yöntemi ile kontrol edilmiştir. Silica gel G (Merck) kaplanmış tabakalara, kolondan çekilmiş her elüattan alınmış örnekler tatbik edildikten sonra, tabakalar hekzan:dietil eter:asetik asit (70:30:1, hacmen) çözücü sisteminde developpe edilmiştir. Daha sonra tabakalar içerisinde iyot kristalleri bulunan tanka yerleştirilmiş ve tabakalardaki TG, DG ve MG spotlarının renklenmesi sağlanmıştır . Kolondan toplanmış tüm fraksiyonların bu şekilde TLC incelemesi yapıldıktan sonra saf olarak TG, DG veya MG içeren fraksiyonlar

birleştirilmiş, solventleri döner evaporatörde uçurulmuş ve böylece saf gliserid bileşikleri elde edilmiştir.

Hidroliz ürününden yağ asitlerini de saf olarak ayırmak için, üründen alınmış diğer bir örnek 0,5 N NaOH ile titre edilerek üründe bulunan serbest yağ asitlerinin sodyum tuzları oluşturulmuştur. Yağ asitleri sodyum sabunlarını içeren sulu faz titrasyon ortamından ayrılmış ve üzerine 0,5 N HCl ilave edilerek sabun halindeki yağ asitleri tekrar serbest hale geçirilmiştir. Daha sonra bu serbest yağ asitleri ortamdan ekstrakte edilmiş ve analiz için saklanmıştır.

Saf olarak elde edilen bu bileşiklerin daha sonra gaz kromatografisi ile yağ asitleri bileşenleri belirlenmiştir.

3.2.8. Hidroliz Ürünü Fraksiyonlarının Yağ Asitleri Bileşimlerinin Gaz Kromatografisi ile Belirlenmesi :

Elde edilen TG, DG, MG ve TA fraksiyonları BF_3 ile metil esterlerine dönüştürülüp, Hewlett-Packard 5890 Seri 2 (Hewlett-Packard, Waldron, Almanya) kapiler gaz kromatografisi cihazına beslenmiştir. Uygulanan kromatografik analiz yöntemi Bölüm 3.1.2' de açıklanmıştır.

3.3 Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonunda Optimum

Koşulların Saptanması

Yağı giderilmiş çörekotu tohumlarından lipaz enziminin ekstraksiyonunda, Bölüm 3.2.1' de açıklanan yöntemle göre, çözücü olarak Fosfat tamponu + % 1 triton, Fosfat tamponu + % 1 triton + % 10 etilen glikol, Distile su + % 1 triton ve Distile su + % 1 triton + % 10 etilen glikol karışımları kullanılarak bir seri ekstraksiyon deneyi yürütülmüştür. Elde edilen lipaz ekstraktlarının aktiviteleriyle ilgili sonuçlar Tablo 3.3' de verilmiştir:

Tablo 3.3 Çörekotu tohumlarından farklı çözücü sistemleriyle elde edilmiş lipaz ekstraktlarının özellikleri [69].

Çözücü sistemi	Ekstraktın Aktivitesi* U/mL	Küspenin Aktivitesi* U/mg katı	Ekstrakt Hacmi mL	Ekstraktın Total Aktivitesi U
Fosfat tamponu + % 1 triton	57,5	0,02	47,5	2731
Fosfat tamponu + % 1 triton + % 10 etilen glikol	63,9	0,02	47,5	3035
Distile su + % 1 triton + % 10 etilen glikol	99,5	0,03	48,5	4826
Distile su + % 1 triton	93,9	0,02	49	4599

* Aktivite tayininde substrakt olarak tributirin kullanılmıştır.

Tablo 3.3' ün incelenmesiyle, denenen çözücüler arasında en yüksek aktivitede enzim ekstraktlarının distile su bazlı çözücü sistemleriyle elde edildiği, suya triton' a ilaveten etilen glikolün katılmasının sonuçları çok fazla değiştirmedeği de anlaşılmaktadır. Ekstraksiyon ortamında mümkün olduğu kadar az kimyasal madde bulunması tercih edildiğinden, içerisinde % 1 triton bulunan distile su en uygun ekstraksiyon çözücüsü olarak seçilmiştir.

3.4 Lipaz Tozu Eldesi İçin Optimum Amonyum Sülfat Doygunluk Derecesinin Saptanması

Bilindiği üzere enzimler, su ile minimum temas yüzeyi gösterecek şekilde organize olmuş globüler protein yapıları sayesinde su aktivitesi düşük doğal ortamlarında enzimatik faaliyetlerini mükemmel olarak yürütürler. Enzimler doğal ortamlarından uzaklaştırıldıklarında ise, mikro çevrelerinin değişmesi sonucu kısa zamanda aktivite kaybederler. Enzimlerin aktivite kaybı yani inaktivasyonu basit bir olay olmayıp, inaktivasyonun ilk aşamasında, enzim moleküllerinin kompakt küresel yapısının su molekülleri etkisiyle kısmen gevşeyip açılması (unfolding) olayının gerçekleştiği saptanmıştır. Bu aşamada henüz protein moleküllerinde kimyasal değişme görülmez. Bu kademede, sıcaklığın düşürülmesi ve enzimin kısa zamanda susuz hale getirilmesi (liyofilizasyon, aseton veya amonyum sülfat ile çöktürme) işlemleri ile enzimlere kısa vadede depolanma stabilitesi kazandırılabilir.

Yukarıda açıklanan nedenlerden dolayı, çalışmanın bu aşamasında lipaz ekstraktından enzim çöktürülerek susuz katı fazda elde edilmiştir. Böylece enzimin hem kısmi saflaştırılması sağlanmış hem de daha stabil hale getirilmiştir. Çöktürme işlemi amonyum sülfat ilavesiyle yapılmıştır. Çöktürülmüş enzim çalışmada “Lipaz tozu” olarak adlandırılmıştır.

Çöktürme işleminde, mümkün olan en yüksek aktivitede lipaz tozu elde etmek için kullanılan amonyum sülfatın ortamdaki konsantrasyonu (doygunluk derecesi) değiştirilmiştir. Bu deneylere ait sonuçların mukayese edilebilir olması için aynı ekstrakt ile çalışılmıştır. 250 gram yağı giderilmiş tohumlar, içerisinde % 1 triton bulunan 1100 mL su ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu ekstrakt üçe bölünmüş ve her birine amonyum sülfat doygunluk derecesi % 35, % 40 ve % 50 olacak şekilde amonyum sülfat ilave edilmiştir. Bu deneyler sonucunda elde edilen lipaz tozlarının protein içerikleri ve lipaz aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.4’ de verilmiştir:

Tablo 3.4 Lipaz tozlarının aktivitelerinin ve protein içeriklerinin amonyum sülfat doygunluk derecesi ile değişimi [69].

Doygunluk Derecesi	Örnek	Aktivite (U/mg katı) ^x	Toplam Aktivite (U)	Toplam Protein (mg)	Spesifik Aktivite (U/mg protein)
-	Ekstrakt	61,24 ^{xx}	3797	583	7,0
% 35	Lipaz tozu	101,48	1015	73	13,9
% 40	Lipaz tozu	136,60	1364	78	17,4
% 50	Lipaz tozu	134,19	1342	69	19,6

x) Aktivite tayininde substrat olarak tributirin kullanılmıştır.

xx) Aktivite birimi U/mL dir. Aktivite tayininde substrat yine tributirindir.

Tablo 3.4’ de, farklı amonyum sülfat doygunluk derecelerinde elde edilen lipaz tozlarının aktivitelerinin ve protein içeriklerinin birbirlerine yakın değerlerde olduğu, en iyi sonuçların % 40 doygunluk derecesinde çalışıldığında elde edildiği görülmektedir. Ancak, deneysel çalışma esnasında % 40 ve % 50 doygunluk derecelerinde lipaz tozları çok uzun zamanda çöktürülebilmıştır. Çöktürme zorluğu ve değerler arasındaki farkın çok fazla olmaması göz önüne alınarak, lipaz tozlarının eldesinde % 35 amonyum sülfat doygunluk derecesinde çalışılmaya karar verilmiştir.

3.5 Boraj Yağının Çörekotu Lipazı ile Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne

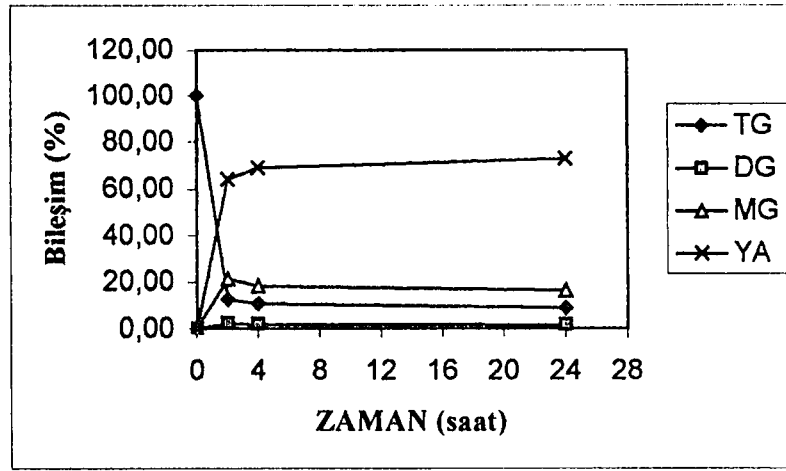
Enzim Miktarının Etkisi

Boraj yağının hidroliz reaksiyonunda yüksek verimle GLA' ca zengin ürünler elde edebilmek amacıyla, önce kullanılması gereken optimum çörekotu lipaz enziminin miktarı saptanmıştır. Bu amaçla, enzim miktarının hidroliz reaksiyonu yürüyüşüne olan etkisi incelenmiştir. 2 gram boraj yağı, 5 mL su ve 50 mL hekzan karışımına 1965 U/g yağ enzim ilave edilmiş ve reaksiyon 40 °C' da 24 saat sürdürülmüştür. Reaksiyon esnasında 2., 4. ve 24. saat sonunda alınmış numunelerin bileşimleri, içerdiği TG (trigliserid), DG (digliserid), MG (monogliserid) ve YA (yağ asitleri) fraksiyonlarının miktarları, TLC-FID İatroscan cihazıyla belirlenmiştir. Boraj yağının çörekotu lipazı ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi Tablo 3.5' de verilmiştir:

Tablo 3.5 Boraj yağının hekzan ortamında 1965 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.

Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
2	12,40	2,05	21,48	64,07
4	10,61	1,79	18,37	69,23
24	8,87	1,65	16,41	73,07

Tablo 3.5' in incelenmesiyle, 1965 U/g yağ enzim miktarında yağın çok hızlı hidroliz olduğu, 2 saat sonunda boraj yağı trigliserid moleküllerinin % 87,6' sının hidrolizlenmiş olduğu görülmektedir. Reaksiyon karışımında, çok az TG ve DG bulunurken MG fraksiyonu miktarı % 20 seviyesine erişmiş olup ana ürün ise YA fraksiyonudur. Hidroliz reaksiyonunun yürüyüşünü daha iyi yorumlamak için, hidroliz sonucu oluşan her bir ürünün zamanla değişim eğrileri çizilmiş ve Şekil 3.1' de topluca gösterilmiştir:



Şekil 3.1 Boraj yağının hekzan ortamında, 40 °C da ve 1965 U/g yağ enzim miktarında yürütülmüş hidrolizinde, ürün bileşiminin zamanla değişimi.

Şekil 3.1' den, hidroliz süresinin 2 saatten 24 saate uzatılmasıyla bileşimde pratik olarak bir değişiklik olmadığı gözlenmektedir. Bundan dolayı, hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen üründe herhangi bir fraksiyonda GLA zenginleşmesi olup olmadığını belirleyebilmek için, sadece 24 saat sonunda alınmış örneğin yağ asitleri bileşimine bakılması kararlaştırılmıştır. Bu amaçla, karışımdan 24 saat sonunda alınmış örnek, Bölüm 3.2.7' de açıklanan prosedüre göre TG, DG, DG ve YA asitleri fraksiyonlarına ayrılmış ve saf olarak elde edilen bu fraksiyonların yağ asitleri bileşimleri saptanmıştır. Sözü edilen bu fraksiyonların yağ asitleri bileşimleri Tablo 3.6' da verilmiştir:

Tablo 3.6 Boraj yağının hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40 °C, 1965 U/g yağ, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5ml.:50 ml.).

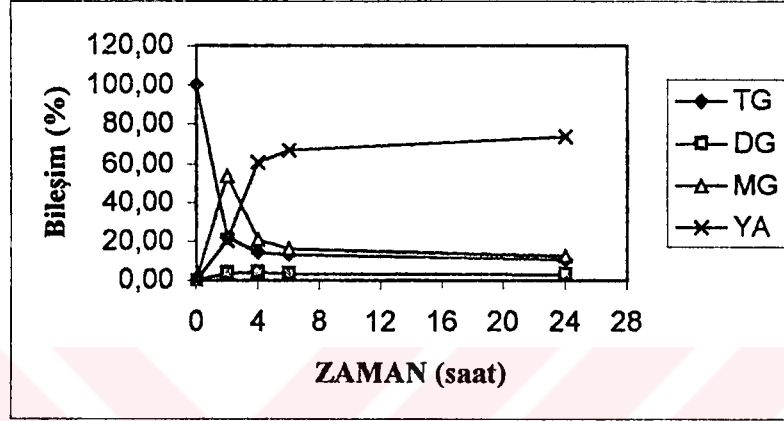
Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	2,9	2,9	1,9	0,5
16:1	0,4	-	-	-
16:0	22,7	23,7	17,1	13,9
18:3	13,7	17,4	17,7	20,0
18:2	28,4	20,1	19,7	38,9
18:1	20,1	23,1	33,9	20,9
18:0	5,8	8,6	5,5	3,6
20:1	3,4	4,2	2,3	2,2
20:0	-	-	-	-
22:1	2,6	-	1,9	-

Tablo 3.6' da yer alan verilere göre, ürün bileşenlerinden hiç birinde GLA zenginleşmesi gerçekleşmemiştir. Ancak bu deney sonuçlarının değerlendirilmesinde göze çarpan önemli bulgu, hidroliz ürünlerinde TG ve DG moleküllerinin az, buna karşılık MG moleküllerinin ortamda oldukça yüksek yüzdede olmasıdır. Bu sonuç, boraj yağının hidroliz reaksiyonunda ilk kez denenen çörekotu lipazının 1,3-spesifik enzim davranışı gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bilindiği üzere 1,3-spesifik enzimlerin uygulandığı hidroliz reaksiyonlarında ana ürün MG, özellikle 2-MG' dir. Bizim sonuçlarımızda ise MG moleküllerinin 1-MG ve 2-MG molekülleri karışımı olduğu belirlenmiştir. Ortamdaki 1-MG moleküllerinin varlığı iki şekilde açıklanabilir. Birinci açıklama şeklinde, numunelerin analizi esnasında, ortamda bulunan suyun etkisiyle 2-MG' lerin 1-MG' e dönüşmesidir ki bu dönüşüm çok hızlıdır ve 1-MG molekülleri ile 2-MG molekülleri arasında denge oluşana kadar devam eder. İkinci açıklamada ise enzimin bazı yağ asitlerine karşı negatif spesiflik göstermesi sebep gösterilmektedir. Enzim, gliserinin 1 pozisyonunda yer alan bu asitleri kolay hidrolizleyemediğinden ortamda 1-MG molekülleri bulunur. Literatürde bir çok lipazın bazı yağ asitlerine karşı spesiflik gösterdiği de bilinmektedir. Bu lipazlar ile yürütülmüş hidroliz reaksiyonlarında hidroliz derecesinin % 50- % 60 civarında olduğu, kısmi hidroliz sonucunda bazı hidroliz ürünlerinde bu yağ asitlerinin zenginleştiği saptanmıştır. Bu literatür verilerinden hareketle, çörekotu lipazının da boraj yağında bulunan bazı asitlere karşı yağ asitliği spesifliği gösterip göstermediğini belirlemek için, hidroliz reaksiyonunun hidroliz derecesini düşürmek hedeflenmiş ve kullanılan enzim miktarı tedricen düşürülerek bir seri hidroliz deneyi yürütülmüştür.

Boraj yağının ikinci hidroliz deneyinde, ortama 980 U/g yağ enzim ilave edilmiş ve aynı koşullarda reaksiyon yürütülmüştür. Bu deneye ait hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişim değerleri Tablo 3.7' de verilmiştir. Hidroliz reaksiyonunun yürüyüşünü daha iyi görebilmek için Tablo 3.7' deki veriler kullanılarak TG, DG, MG ve YA ürün bileşen yüzdelerinin zamanla değişimi Şekil 3.2' de sunulmuştur:

Tablo 3.7 Boraj yağının hekzan ortamında 980 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.

Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
2	22,10	3,74	53,75	20,41
4	14,32	3,93	21,00	60,75
6	13,14	3,52	16,31	67,03
24	10,87	2,97	12,63	73,53



Şekil 3.2 Boraj yağının hekzan ortamında, 40 °C da ve 980 U/g yağ enzim miktarında yürütülmüş hidrolizinde, ürün bileşiminin zamanla değişimi.

Şekil 3.2’ den görüldüğü gibi, enzim miktarının yarıya indirilmesiyle ilk 6 saatte reaksiyon bir miktar yavaşlamış, fakat reaksiyon sürenin 24 saate uzatılmasıyla ürün bileşiminde pratik olarak değişiklik meydana gelmemiştir. Reaksiyonun 2. saatinde yüksek miktarda (% 54) MG oluşmuş, zamanla MG miktarında da azalma olmuştur. Enzim miktarının 1965 U/g yağ değerinden 980 U/g yağ değerine düşürülmesiyle, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşiminde sadece % 2 kadar daha fazla TG ve DG ve % 4 daha az MG bulunduğu belirlenmiştir.

Hidroliz reaksiyonunun 24. saatinde alınmış örneğin TG, DG, MG ve YA fraksiyonlarında yağ asitleri bileşiminde farklılık olup olmadığını saptayabilmek için, bu örnek komponentlerine ayrılmış ve her bir komponentin gaz kromatografik analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.8’ de verilmiştir. Tablo 3.8’ den, TG ve MG moleküllerinde GLA yüzdesinin sırasıyla % 20 ve % 19 seviyelerine yükseldiği, DG fraksiyonunda ise GLA’ ca % 2 gibi çok az miktarda zenginleşme gerçekleştiği

anlaşılmaktadır. Bu sonuç bize hidroliz derecesinin düşürülmesi ile hidroliz ürünlerinde daha yüksek mertebede zenginleşme olabileceğinin işaretini vermiştir:

Tablo 3.8 Boraj yağının hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40 °C, 980 U/g yağ, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5mL:50 mL).

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	3,8	2,3	1,3	0,3
16:1	0,9	-	-	-
16:0	19,1	21,1	20,0	10,4
18:3	19,7	22,4	18,7	20,3
18:2	32,3	21,2	23,9	30,6
18:1	17,5	25,8	25,7	27,0
18:0	3,4	2,9	5,3	8,4
20:1	2,2	4,3	3,4	2,0
20:0	-	-	-	-
22:1	1,1	-	1,7	1,0

Müteakip deneyimizde, ortama 490 U/g yağ enzim ilave edilmiş ve aynı koşullarda hidroliz deneyi tekrarlanmıştır. Hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi Tablo 3.9' da görülmektedir. 8 saat sonunda ortamdaki trigliserid moleküllerinin % 70' inin hidroliz olduğu, sürenin 24 saate çıkarılması ile hidrolizlenmenin % 85 gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Reaksiyon oldukça hızlı cereyan etmiştir:

Tablo 3.9 Boraj yağının hekzan ortamında 490 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.

Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
1	79,34	4,87	4,87	10,92
2	65,97	5,28	11,33	17,42
4	42,22	6,65	17,01	34,12
6	34,34	4,61	19,60	41,45
8	28,28	3,41	15,96	52,35
24	14,66	4,29	14,77	66,28

Hidroliz reaksiyonu esnasında karışımdan 8. ve 24. saatte alınmış örneklerin içerdiği TG, DG, MG ve YA fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimleri ise sırası ile Tablo 3.10 ve 3.11’ de verilmiştir. 8 saat sonunda, reaksiyon ürünlerinden TG ve MG fraksiyonlarında % 20- % 21 GLA bulunduğu belirlenmiştir. Bu değer orijinal boraj yağında bulunan GLA yüzdesine çok yakındır. DG fraksiyonunda ise GLA yüzdesi 25,5’ e yükselmiştir. Bu üründe % 16 oranında GLA zenginleşmesi olmuştur. Reaksiyon süresinin 24 saate çıkarılması ile hidroliz ürün bileşenlerinin hepsinde GLA yüzdesinde artış olduğu gözlenmiştir. TG, DG ve MG fraksiyonlarında sırası ile % 16, % 23 ve % 15 GLA asit zenginleşmesi gerçekleşmiştir. Yalnız TG , DG ve MG fraksiyonlarının ürün içerisinde toplam olarak % 32 kadar bulunduğu dikkate alındığında, elde edilebilecek ürün miktarının henüz çok az olduğu görülmektedir. Sürenin 3 kat daha artırılması pratik olarak bir kazanç sağlamamıştır:

Tablo 3.10 Boraj yağının 490 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40 °C, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5mL:50 mL).

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0,1	-	0,2	0,2
16:1	0,2	-	0,1	0,1
16:0	11,0	12,5	20,0	8,9
18:3	21,3	25,5	19,7	21,7
18:2	36,8	35,2	27,3	40,3
18:1	15,2	14,1	19,5	14,5
18:0	4,2	3,8	4,8	4,3
20:1	4,9	4,3	4,2	5,0
20:0	0,3	0,5	-	-
22:1	3,2	2,3	2,6	2,0
22:0	0,3	0,2	-	-
24:1	2,3	1,5	1,6	1,0
24:0	0,2	0,1	-	-

Tablo 3.11 Boraj yağının 490 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40 °C, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5mL:50 mL).

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	-	-	0,3	0,3
16:1	0,1	-	0,2	0,1
16:0	12,0	11,7	18,6	10,8
18:3	25,4	27,0	25,1	21,9
18:2	32,4	36,6	28,8	38,7
18:1	13,7	12,7	17,4	16,6
18:0	4,7	3,2	3,4	3,7
20:1	5,6	4,6	3,6	4,3
20:0	0,4	0,9	0,1	0,1
22:1	3,4	3,0	1,3	1,3
22:0	0,1	0,1	-	0,2
24:1	2,1	0,2	1,2	1,8
24:0	0,1	-	-	0,2

Hem fraksiyonlardaki GLA zenginleşme oranını, hem de bu fraksiyonların ürün verimini arttırabilmek için, enzim miktarını kademeli olarak azaltarak 3 deney serisi daha yürütülmesine karar verilmiştir. Bu deneylerde boraj yağının gramı başına 326 U, 247 U ve 163 U enzim kullanılmış ve reaksiyonlar 8 saat sürdürülmüştür. Bu deneylere ait hidroliz ürün bileşimlerinin zamanla değişim değerleri Tablo 3.12-3.14' de verilmiştir:

Tablo 3.12 Boraj yağının hekzan ortamında 326 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.

Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
1	81,21	5,17	5,09	8,53
2	71,42	5,24	7,07	16,27
4	59,97	5,57	7,70	26,76
6	55,90	5,07	8,92	30,11
8	48,05	6,18	8,22	37,55

Tablo 3.13 Boraj yağının hekzan ortamında 247 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.

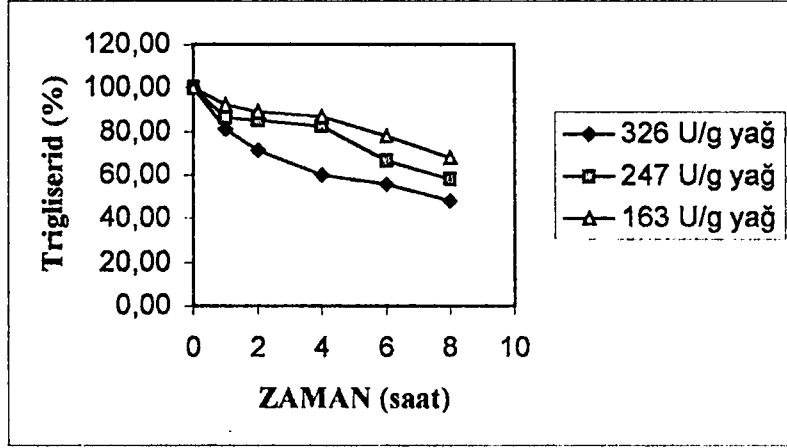
Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
1	86,29	3,74	3,07	6,90
2	85,32	3,66	3,78	7,24
4	82,58	3,86	3,92	9,64
6	66,58	4,32	4,24	24,86
8	57,95	5,22	6,54	30,29

Tablo 3.14 Boraj yağının hekzan ortamında 163 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.

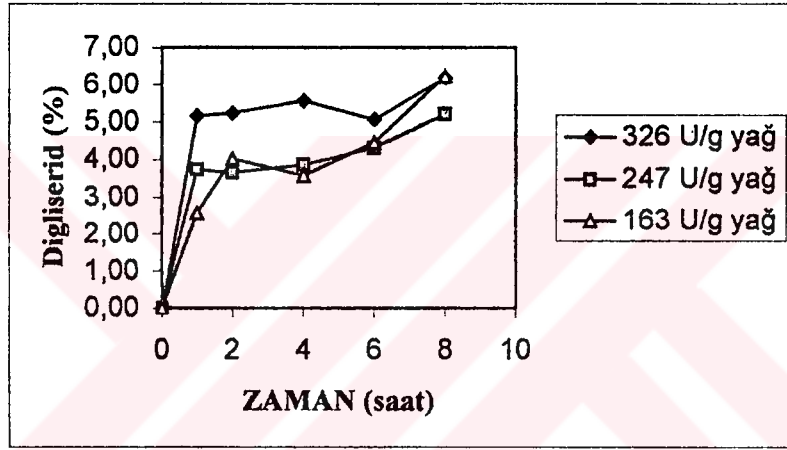
Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
1	92,28	2,56	1,30	3,86
2	89,25	4,03	1,35	5,37
4	86,89	3,58	2,46	7,07
6	78,15	4,45	2,64	14,76
8	67,95	6,22	4,51	21,32

Boraj yağının enzimatik hidrolizinde, hidroliz reaksiyonunun yürüyüşüne enzim miktarının etkisini daha iyi görebilmek için, TG, DG, MG ve YA bileşenlerinin her birinin zamanla değişim eğrileri, enzim miktarının fonksiyonu olarak aynı grafik altında toplanmış ve Şekil 3.3-3.6' da sunulmuştur.

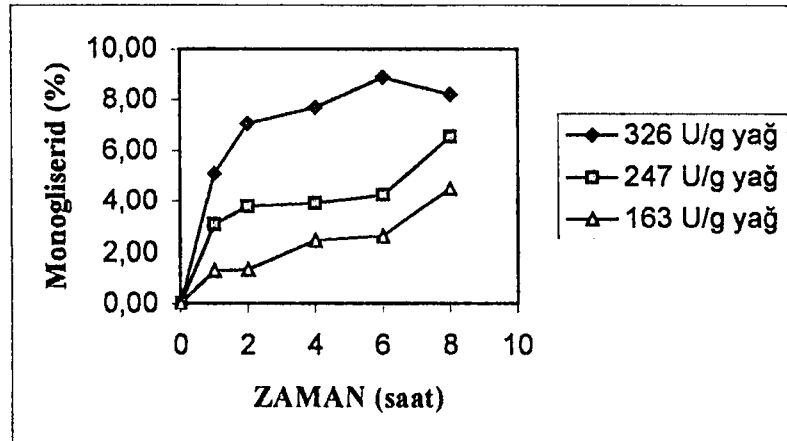
Şekil 3.3' ün incelenmesiyle, 163 U enzim miktarında yürütülmüş deneyde ortamdaki trigliserid moleküllerinin % 32' si hidroliz olurken, enzimin % 50 artırılmasıyla TG' lerin % 42' sinin hidrolizlendiği anlaşılmaktadır. Enzimin 1 katına ve 3 katına çıkarılması ile hidrolizlenen TG' lerin sırasıyla % 52 ve % 72 değerlerine ulaştığı saptanmıştır:



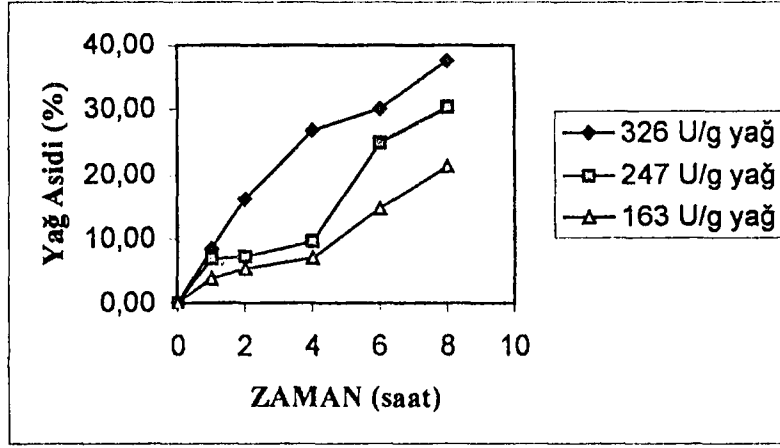
Şekil 3.3 Boraj yağının hidrolizinde, hidroliz ürününün TG içeriğine enzim miktarının etkisi.



Şekil 3.4 Boraj yağının hidrolizinde, hidroliz ürününün DG içeriğine enzim miktarının etkisi.



Şekil 3.5 Boraj yağının hidrolizinde, hidroliz ürününün MG içeriğine enzim miktarının etkisi.



Şekil 3.6 Boraj yağının hidrolizinde, hidroliz ürününün YA içeriğine enzim miktarının etkisi.

Hidroliz esnasında oluşan DG moleküllerinin miktarlarında ise, Şekil 3.4' den de görüleceği gibi, pratik olarak enzim miktarıyla bir değişimin olmadığı anlaşılmaktadır.

Şekil 3.5' de, MG fraksiyonunun oluşumuna enzim miktarının etkisi olduğu gözlenmektedir. Enzim miktarı yükseldikçe MG oluşumu hızlanmaktadır. 163 U ve 247 U gibi bağıl olarak az enzim kullanıldığı deneylerde hidroliz ürününde % 3 civarında MG bulunurken, enzimin 326 U ve özellikle 490 U olarak kullanılmasıyla MG oluşumunun ilk saatlerde bile % 10 seviyesine yükseldiği tespit edilmiştir. Daha yüksek miktarda enzim kullanılarak (1965 U ve 980 U) gerçekleştirilmiş reaksiyonlara ait hidroliz ürünlerinde bu etki daha kuvvetle izlenmişti (Bak. Şekil 3.1 ve Şekil 3.2). 1. saat sonunda üründe % 53 gibi çok yüksek oranda MG bulunmuştu. Bu sonuçlar enzim miktarına göre reaksiyon mekanizmasının farklılaşması ile alakalı olabilir.

Hidroliz ürünlerinde açığa çıkan yağ asitlerinin miktarı ise, Şekil 3.6' da izlendiği üzere, enzim miktarı ile artış göstermektedir.

Daha önce elde etmiş olduğumuz verilere göre, 490 U enzim miktarında gerçekleştirilmiş hidroliz deneyinde 8 saat sonunda DG fraksiyonunda % 16 gibi az oranda GLA zenginleşmesi elde edilmişti. Enzim miktarının kademeli olarak 163 U' e indirilerek yürütülmüş hidroliz reaksiyonlarında GLA' nın ürün fraksiyonlarında dağılımını görmek ve herhangi bir fraksiyonda zenginleşmenin olup olmadığını tespit edebilmek için, her enzim miktarında 8 saat sonunda elde edilmiş TG, DG, MG ve

YA fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimlerine bakılmıştır. Bu fraksiyonlara ait yağ asitleri bileşimleri Tablo 3.15- 3.17' de verilmiştir.

Tablo 3.15 incelendiğinde, enzim miktarının 326 U/g yağ olarak kullanılmasıyla hidroliz ürünlerinden TG ve DG fraksiyonlarında GLA' nın önemli derecede konsantre olduğu görülmektedir. Orijinal boraj yağında % 21,9 bulunan GLA, TG ve DG fraksiyonlarında sırasıyla % 29,6 ve % 41,8 değerlerine yükselmiştir. Bu değerler, GLA' nın TG' lerde % 35, DG' lerde ise % 91 zenginleştiğini göstermektedir:

Tablo 3.15 Boraj yağının 326 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40 °C, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5mL:50 mL).

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0,1	0,1	0,1	0,2
16:1	0,1	0,1	0,2	0,4
16:0	9,2	7,9	14,8	12,4
18:3	29,6	41,8	16,4	10,4
18:2	39,0	29,5	31,5	37,6
18:1	11,6	11,1	17,4	19,6
18:0	2,8	3,0	4,2	5,6
20:1	3,8	3,2	6,0	6,7
20:0	0,3	0,3	0,2	0,6
22:1	2,5	1,7	5,4	3,8
22:0	0,2	0,1	-	0,4
24:1	0,7	1,1	3,8	2,2
24:0	0,1	0,1	-	0,1

Çalışmalarımızda 247 U/g yağ enzim miktarı ile yürütülmüş deneylerimize ait ürün bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri Tablo 3.16' da görülmektedir. Bu deneylerde de TG ve DG fraksiyonlarında GLA yüzdesinin sırasıyla % 26,9 ve % 31,3' e yükseldiği görülmektedir. Ancak bir önceki deneye ait Tablo 3.15' de yer alan

değerlere göre bu artışlar daha düşük kalmaktadır. TG fraksiyonunda % 23, DG fraksiyonunda ise % 43 oranında zenginleşme söz konusudur:

Tablo 3.16 Boraj yağının 247 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40 °C, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5mL:50 mL).

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0,1	0,2	-	0,4
16:1	0,2	0,2	0,1	0,2
16:0	10,6	12,4	15,0	12,5
18:3	26,9	31,3	18,5	10,6
18:2	36,3	28,8	27,4	40,4
18:1	14,3	14,8	23,0	20,9
18:0	3,6	3,5	4,6	4,0
20:1	3,6	3,8	5,3	5,2
20:0	0,3	0,3	-	0,5
22:1	2,4	2,6	3,8	3,2
22:0	0,2	0,2	-	0,5
24:1	1,4	1,8	2,3	1,6
24:0	0,1	0,1	-	-

Boraj yağının gramı başına 163 U' lik enzim kullanılarak gerçekleştirilmiş deneylere ait sonuçların yer aldığı Tablo 3.17' deki yağ asitleri bileşimlerine bakıldığında, benzer şekilde, TG ve DG fraksiyonlarında bir miktar GLA' nın konsantre olduğu görülmektedir. TG fraksiyonunda GLA miktarı orijinal yağ bileşimine göre 1.12 kat , DG fraksiyonunda ise 1,34 kat artmıştır.

Tablo 3.17 Boraj yağının 163 U/g yağ enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri (40 °C, Yağ:Su:Hekzan, 2g:5mL:50 mL).

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0,1	0,1	-	0,1
16:1	0,2	0,2	-	0,1
16:0	10,7	11,7	17,8	11,2
18:3	24,6	29,3	17,6	11,0
18:2	37,4	34,9	17,2	37,3
18:1	13,8	13,2	30,3	22,4
18:0	3,8	3,6	6,1	5,3
20:1	4,2	3,5	5,1	6,3
20:0	0,3	0,3	-	0,5
22:1	2,8	1,9	3,5	3,9
22:0	0,2	0,1	-	0,7
24:1	1,8	1,2	2,4	1,2
24:0	0,1	-	-	-

Bu son seri deneylerimize ait sonuçlar, çörekotu lipazı ile boraj yağından GLA bakımından zenginleşmiş ürünler elde edilebileceğini göstermiştir. 163 U- 490 U arasında enzim miktarı kullanımı ile özellikle DG ve TG fraksiyonlarında GLA yüzdesi artırılabilir. Optimum enzim miktarının tespitinde, bu fraksiyonlarda belirlenen % zenginleşmelerin yanında DG ve TG fraksiyonlarının ortamdaki miktarları da dikkate alınarak sonuçlar sistematik olarak incelenmeye alınmıştır.

3.6 Boraj Yağının Çörekotu Lipazı ile Hidrolizinde Optimum Enzim Miktarının Belirlenmesi

Boraj yağının çörekotu lipaz enzimi ile hidrolizinde, enzim miktarı ile hidroliz ürünlerindeki GLA zenginleşmesinin değişimini daha görebilmek için 163-490 U enzim miktarlarında yürütülmüş deneylere ait veriler Tablo 3.18' de topluca gösterilmiştir:

Tablo 3.18 Boraj yağının çörekotu lipazı ile enzimatik hidrolizinde, ürün bileşenlerinde GLA içeriğinin enzim miktarına göre değişimi.

Enzim Miktarı (U)	% GLA			
	TG	DG	MG	YA
Orijinal Yağ	21,9	-	-	-
163	24,6	29,3	17,6	11,0
247	26,9	31,3	18,5	10,6
326	29,6	41,8	16,4	10,4
490	21,3	25,5	19,7	21,7

Tablo 3.18' den, boraj yağının hidrolizinde enzim miktarının 326 U değerine kadar artmasıyla TG ve DG fraksiyonlarında GLA miktarının yükseldiği, fakat enzim miktarının 490 U değerine çıkarılmasıyla aynı fraksiyonlarda GLA yüzdesinin düştüğü görülmektedir. Ancak elde edilen ürünün miktarı yani gliserid karışımında bulunan GLA' nın miktarı ile YA fraksiyonuna geçen kayıp olarak düşünebileceğimiz GLA miktarı da önemlidir. Her bir reaksiyonda elde edilmiş olan gliserid (toplam TG, DG ve MG miktarı) ve YA miktarı ile bu ürünlerdeki GLA yüzdeleri hesaplanarak sonuçlar Tablo 3.19' da birlikte verilmiştir:

Tablo 3.19 Boraj yağının çörekotu lipazı ile enzimatik hidrolizinde, gliserid karışımı ile YA' da bulunan GLA 'nın enzim miktarına göre değişimi.

Enzim Miktarı (U)	Gliserid karışımı		YA	
	Miktarı	% GLA	Miktarı	% GLA
Boraj yağı	100,0	21,9	-	-
163	78,7	25,3	21,3	11,0
247	69,7	27,6	30,3	10,6
326	62,4	30,2	37,6	10,4
490	47,6	22,1	52,4	21,7

Tablo 3.19' dan, 100 gram boraj yağının çörekotu lipazı ile hidrolizinde 8 saat sonunda enzim miktarının artışı ile elde edilebilecek gliserid karışımları miktarlarının azalacağı buna karşılık açığa çıkan yağ asitlerinin artacağı gözlenmektedir. 326 U

enzim miktarında çalışılma durumunda 62,4 g gliserid karışımı elde edilebilmektedir ve bu karışımın GLA içeriği de % 30,2 seviyesinde olmaktadır. Enzim miktarının azaltılmasıyla ele geçecek gliserid karışımı biraz artabilmekteyse de bunun GLA içeriğinde düşme olmaktadır. Enzim miktarının artırılması ile ise gliserid miktarı ile GLA içeriği epey azalacaktır. Tablo 3.19' dan optimum enzim miktarının 326 U/g yağ olarak alınmasının uygun olacağı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile, 326 U/g yağ enzim miktarı ile çalışıldığında 100 g boraj yağından hidroliz yolu ile 62 g gliserid elde edilebileceği ve bu ürünün % 30 GLA içerebileceği ortaya konulmuştur. Literatürde hidroliz reaksiyonu sonucunda boraj yağından içerisinde % 46 GLA bulunan ürünler elde edilebildiği kaydına rastlanmıştır. Ancak bu ürünlerin verimi % 10 civarındadır. Bu açıdan da çörekotu lipazı ile elde edilmiş bu sonuçlar kayda değerdir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

1. Bu çalışmanın ilk bölümünde, çörekotu tohumlarından lipaz enziminin ekstraksiyonunda kullanılması gereken çözücü sistemi optimize edilmiştir. İçerisinde % 1 triton bulunan distile su ile tohumların ekstrakte edilmesinin uygun olacağı saptanmıştır.
2. Lipaz enzimini, aktivitesini kaybetmeden saklayabilmek ve deneylerimizde kısmen saflaştırılmış enzim de kullanabilmek amacıyla, elde edilen lipaz ekstraktlarından enzimi çöktürmek için ortama amonyum sülfat ilave edilmiştir. Mümkün olan en yüksek aktivitede lipaz enzimini toz olarak çöktürmek için ortamın amonyum sülfat doygunluk derecesinin ne olması gerektiği belirlenmiştir. Yapılan seri çalışmaların sonucunda, % 35 amonyum doygunluk derecesinin optimum olduğu saptanmıştır.
3. Kısmen saflaştırılmış çörekotu lipaz enzimi ile boraj yağının bir seri hidroliz deneyleri sonucunda, çörekotu enziminin enzim konsantrasyonuna bağlı olarak GLA' ya karşı bir negatif seçicilik gösterdiği saptanmıştır.
4. Çörekotu lipazının yüksek konsantrasyonlarda kullanılması durumunda, GLA' ya karşı seçiciliğinin kaybolduğu, buna karşılık 490 U/g yağ konsantrasyonundan daha düşük enzim miktarında çalışıldığında ise oldukça yüksek yağ asidi seçiciliği gösterdiği tespit edilmiştir. Hidroliz ürünlerinden trigliserid ve özellikle digliserid fraksiyonlarında GLA zenginleşmesi olduğu gözlenmiştir.
5. Çalışmanın son bölümünde, hem elde edilecek gliserid ürünlerinin miktarını hem de GLA açısından bu ürünleri zenginleştirmek amacıyla, enzim miktarının değişimi ile istenen kriterlerinin değişimi etraflıca incelenmiştir. Çalışmaların sonucunda en uygun enzim miktarının 326 U/g yağ olarak seçilmesine karar verilmiştir. Bu enzim konsantrasyonunda, 8 saat sonunda orijinal boraj yağında % 21,9 oranında bulunan GLA 'nın ürün TG ve DG fraksiyonlarındaki yüzdesi sırasıyla % 29,6 ve % 41,8'e yükseltilmiştir. Böylece % 62 verimle içerisinde % 30 GLA bulunan gliserid karışımı elde edilebilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] **Wu, D., and Meydani, S. N.**, 1996. γ -Linolenic Acid and Immune Function. In γ -Linolenic Acid: Metabolism and Its Roles in Nutrition and Medicine, edited by Huang, Y.-S., and Mills, D. E., AOCS Press, Champaign, s. 106-117.
- [2] **Fan, Y.Y., Chapkin, R.S.**, 1998. Importance of Dietary Gamma-Linolenic Acid in human Health and Nutrition, *J. Nutr.*, **128** : 1411-4.
- [3] **Newton, I. S.**, 1997. Polyunsaturated Fatty Acids in Diet and Health, *Chem. & Ind.*, **8** : 302-305.
- [4] **Horrobin, D.F.**, 1995. Medical Roles of Metabolites of Precursor EPA, *Inform*, **6** : 428-435.
- [5] **Horribon, D.F.**, 1992. Nutritional and Medical Importance of Gamma-Linolenic Acid, *Prog. Lipid Res.*, **31**: 163-194.
- [6] **Fukuda, N., Hioki, K., Etoh, T., Hidaka, T., Ikeda, I., Sugano, M.**, 1992. Comparisons of the Effects of Dietary Fats on Serum and Liver Lipid Levels of Rats, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 816-817.
- [7] **Engler, M. M., Engler, M. B., Erickson, S. K., Paul, S. M.**, 1992. Dietary Gamma-Linolenic Acid Lowers Blood Pressure and Alters Aortic Reactivity and Cholesterol Metabolism in Hypertension, *J. Hypertens.*, **10**: 1197-1204.
- [8] **Engler, M. E., Engler, M. B.**, 1998. The Effects of Dietary Evening Primrose, Black Currant, Borage and Fungal Oils on Plasma, Hepatic and Vascular Tissue Fatty Acid Composition in the Spontaneously Hypertensive Rat, *Nutrition Research*, **18**: 1533-1544.
- [9] **Ramesh, G., Das, U. N.**, 1998. Effect of Evening Primrose and Fish Oils on Two Stage Skin Carcinogenesis in Mice, *Prostaglandins Leukot Essential Fatty Acids*, **59**: 155-161.
- [10] **Munoz, S. E., Lopez, C. B., Valentich, M. A., Eynard, A. R.**, 1998. Differential Modulation by Dietary n-6 or n-9 unsaturated Fatty Acids on the Development of Two Murine Mammary Gland Tumors Having Different Metastatic Capabilities, *Cancer Letters*, **126** : 149-155.

- [11] Munoz, S. E., Piegari, M., Guzman, C. A., Eynard, A. R., 1999. Differential Effects of Dietary Oenothera, Zizyphus Mistol and Corn Oils, and Essential Fatty Acid Deficiency on the Progression of a Murine Mammary Gland Adenocarcinoma, *Nutrition*, **15** : 208-212.
- [12] Gunstone, F. D., 1992. Gamma-Linolenic Acid-Occurrence and Physical and Chemical Properties, *Progress in Lipid Research*, **31**: 145-161.
- [13] Gunstone, F. D., 1997. The Availability of Polyunsaturated Fatty Acids, *Lipid Technology*, **9** : 91-94.
- [14] Kendrick, A., Radledge, C., 1990. Microbial Lipid Technology: Microbial Formation of Polyunsaturated Fatty Acids, *Lipid Technology*, **2** : 62-66.
- [15] Lindberg, A. M., Hansson, L., 1991. Production of Gamma-Linolenic Acid by the Fungus *Mucor rouxii* on Cheap Nitrogen and Carbon Sources, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**: 26-28.
- [16] Torlanova, B. O., Konova, I. V., Funtikova, N. S., Babanova, N. K., Katomina, A. A., Mysyakina, I. S., 1992. Influence of the Conditions of Culturing of a *Mucor* Fungus, Treatment of Biomass, and Extraction Ability on the Production of Lipids Containing Gamma-Linolenic Acid, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **28**: 461-468.
- [17] Ratledge, C., 1992. Tailor-Made Oils and Fats. Possibilities for Microbial Oils, *Revue Francaise Des Corps Gras*, **39** : 325-332.
- [18] Funtnikova, N. S., Kulakova, S. N., Medvedev, F. A., Konova, I. V., Levachev, M. M., 1992. Mucor 12 M- A Prospective Source of Gamma-Linolenic Acid, *Applied Biochemistry and Microbiology*, **28** : 110-113.
- [19] Karleskind, A., Wolff, J. -P., 1996. Oils and Fat Manual, A Comprehensive Treatise, Properties-Production-Applications, Volume I, in Evening Primrose, Borage, and Blackcurrant Seeds, ed. Helme, J. P., Intercept Limited, İngiltere, s. 168-179.
- [20] Favati, F., King, J. W., Mazzanti, M., 1991. Supercritical Carbon Dioxide Extraction Of Evening Primrose Oil, *J. American Oil Chemists Society*, **68** : 422-427.
- [21] Uzzan, A., Helme, J. P., Klein, J. M., 1992. Fatty Acid Composition and Quality Data For Oils Rich in GLA, *Revue Francaise des Corps Gras*, **39**: 339-343.
- [22] Rio, M., Fernandez-Martinez, J., Haro, A., 1993. Wild and Cultivated Borage Officinalis L: Sources of Gamma-Linolenic Acid, *Grasas y Aceitas*, **44** : 125-126.

- [23] Sensidoni, A., Bortolussi, G., Orlando, C., Lognay, G., Santi, R., Fantozzi, P., 1994. Borage Oil (*Borago officinalis* L): An Important Source of Gamma- Linolenic Acid. I. Compositive Characteristics and Oxidative Stability of Oils Extracted by Different Techniques and Mixed with Extra Virgin Olive Oil, *Industrie Alimentari*, **33**: 1121-1127.
- [24] Ucciani, E., Mallet, G., Gamisans, J., 1992. Borago pygmea: A new Source of Gamma-Linolenic Acid, *Revue Francaise de Corps Gras*, **39** : 135-138.
- [25] Zadernowski, R., Lossow, B., Nowak-Polakowska, H., Nesterowicz, J., 1995. Fruits of Berry Plants as a Source of Bio-Oils, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **4/45** : 55-69.
- [26] Hansen, C. E., Stoessel, P., Rossi, P., 1991. Distribution of Gamma-Linolenic Acid in the Cofrey (*Symphytum officinale*) Plant, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **54**: 309-312.
- [27] Gao, Y., Fan, T., 1998. Microula-A new Resource of Vegetable Oil Rich in Gamma-Linolenic Acid, *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, **13** : 22-24.
- [28] Traitler, H., Wille, H. J., Studer, A., 1988. Fractionation of Blackcurrant Seed Oil, *J. American Oil Chemists Society*, **65**: 755-758.
- [29] Hayes, D. G., Van Alstine, J. M., Setterwall, F., 2000. Urea-based Fractionation of Seed Oil Samples Containing Fatty Acids and Acylglycerols of Polyunsaturated and Hydroxy Fatty Acids, *J. American Oil Chemists Society*, **77**: 207-213.
- [30] Arai, M., Fukuta, H., Morikwa, H., 1987. Selective Separation of γ -Linolenic Acid Ether Ester Using Y-Zeolite, *J. Fermentation Technology*, **65**: 569-573.
- [31] Hayashi, K., 1993. Fractionation of alpha- and Gamma-Linolenic Acid – Enriched Triacylglycerols From Vegetable Oils by Column Chromatography on Silicic Acid, *J. Japan Oil Chemists Society*, **42**: 942-945.
- [32] Yokochi, T., Usita, M. T., Kamisaka, T., Nakahara, T., Suzuki, O., 1990. Increase in the γ -Linolenic Acid Content by Solvent Winterization of Fungal Oil Extracted from Mortioella genus, *J. American Oil Chemists Society*, **67**: 846-851.
- [33] Syed Rahmatullah, M. S. K., Shukla, V. K. S., Mukherjee, K. D., 1994. Enrichment of γ -Linolenic Acid from Evening Primrose Oil and Borage Oil via Lipase-Catalyzed Hydrolysis, *J. American Oil Chemists Society* , **71**: 569-573.

- [34] Syed Rahmatullah, M. S. K., Shukla, V. K. S., Mukherjee, K. D., 1994. γ -Linolenic Acid Concentrates from Evening Primrose Oil and Borage Oil via Lipase-Catalyzed Esterification, *J. American Oil Chemists Society*, **71**: 563-567.
- [35] Foglia, T. A., Sonnet, P. E., 1995. Fatty Acid Selectivity of Lipases-Gamma-Linolenic Acid from Borage Oil, *J. American Oil Chemists Society*, **72** : 417-420.
- [36] Schmitt-Rozieres, M., Vanot, G., Deyris, V., Comeau, L. C., 1999. *Borago officinalis* Oil: Fatty Acid Fractionation by Immobilized *Candida rugosa* Lipase. *J. American Oil Chemists Society*, **76** : 557-562.
- [37] Aggelis, G., Komaitis, M., Pina, M., Graille, J., 1993. Specificity of *Mucor miehei* Lipase on Methyl Ester Substrates, *Grasas y Aceites*, **44** : 331-334.
- [38] Shimada, Y., Fukushima, N., Fujita, H., Honda, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., 1998. Selective Hydrolysis of Borage Oil with *Candida rugosa* Lipase : Two Factors Affecting the Reaction, *J. American Oil Chemists Society*, **75** : 1581-1586.
- [39] Shimada, Y., Sugihara, A., Shibahiraki, M., Fujita, H., Nakano, H., Nagao, T., Terai, T., Tominaga, Y., 1997. Purification of γ -Linolenic Acid from Borage Oil by a Two-Step Enzymatic Method, *J. American Oil Chemists Society*, **74** : 1465-1470.
- [40] Shimada, Y., Sakai, N., Sugihara, A., Fujita, H., Honda, Y., Tominaga, Y., 1998. Large-Scale Purification of Gamma-Linolenic Acid by Selective Esterification using *Rhizopus delemar* Lipase, *J. American Oil Chemists Society*, **75**: 1539-1544.
- [41] Huang, F. C., Ju, Y. H., Huang, C. W., 1997. Enrichment in γ -Linolenic Acid of Acylglycerols by the Selective Hydrolysis of Borage Oil, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **67** : 227-236.
- [42] Huang, F. C., Ju, Y. H., Huang, C. W., 1997. Enrichment of γ -Linolenic Acid from Borage Oil via Lipase-Catalyzed Reactions, *J. American Oil Chemists Society*, **74** : 977-981.
- [43] Huang, F. C., Ju, Y. H., Chiang, J. C., 1999. Gamma-Linolenic Acid-Rich Triacylglycerols from Borage Oil via Lipase-Catalyzed Reactions, *J. American Oil Chemists Society*, **76**: 833-837.
- [44] Üstün, G., Güner, S., Arer, G., Türkay, S., Erciyes, A. T., 1997. Enzymatic Hydrolysis of Anchovy Oil : Production of Glycerides Enriched in Polyunsaturated Fatty Acids, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **68**: 171-186.

- [45] Gamsız, D. E., İnal, S., 2001. Çörekotu (*Nigella sativa* L) Lipaz Enzimi ile Menhaden Balık Yağından Enzimatik Hidroliz Yöntemiyle EPA ve DHA ca Zengin Ürün Eldesi, İTÜ Kimya Mühendisliği Lisans Bitirme Ödevi.
- [46] Akoh, C. C., Jennings, B. H., Lillard, D. A., 1996. Enzymatic Modification of Evening Primrose Oil : Incorporation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, *J. American Oil Chemists Society*, **73** : 1059-1062.
- [47] Akoh, C. C., Moussata, C. O., 1998. Lipase_Catalyzed Modification of Borage Oil : Incorporation of Capric and Eicosapentaenoic Acids to form Structured Lipids, *J. American Oil Chemists Society* , **75** : 697-701.
- [48] Ju, Y. H., Huang, F. C., Fang, C. H., 1998. The Incorporation of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids into Acylglycerols of Borage Oil via Lipase-Catalyzed Reactions, *J. American Oil Chemists Society*, **75** : 961-965.
- [49] Senanayake, S. P. J. N., Shahidi, F., 1999. Enzymatic Incorporation of Docosahexaenoic Acid into Borage Oil, *J. American Oil Chemists Society*, **76**: 1009-1015.
- [50] Senanayake, S. P. J. N., Shahidi, F., 1999. Enzyme- Assisted Acidolysis of Borage (*Borago officinalis* L.) and Evening Primrose (*Oenothera biennis* L.) Oils : Incorporation of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids, *J. Agricultural and Food Chemistry*, **47** : 3105-3112.
- [51] Vacek, M., Zarevucka, M., Wimmer, Z., Stransky, K., Koutek, B., Mackova, M., Demnerova, K., 2000. Lipase-Mediated Hydrolysis of Blackcurrant Oil, *Enzyme and Microbial Technology*, **27** : 531-536.
- [52] Mukherjee, K. D., Kiewitt, I., 1991. Enrichment of Gamma-Linolenic Acid from Fungal Oil by Lipase-Catalyzed Reactions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **35** : 579-584.
- [53] Calvalho, P. O., Pastore, G. M., 1998. Enrichment of Gamma-Linolenic Acid from Fungal Oil by Lipases, *Food Biotechnology*, **12** : 57-71.
- [54] Hills, M. J., Kiewitt, I., Mukherjee, K. D., 1989. Enzymatic Fractionation of Evening Primrose by Rape Lipase : Enrichment of γ -Linolenic, *Biotechnology Letters*, **11**: 629-632.
- [55] Jachmanian, I., Mukherjee, K. D., 1995. Germinating Rapeseed as Biocatalyst, Hydrolysis of Oils Containing Common and Unusual Fatty Acids, *J. Agricultural and Food Chemistry*, **43** : 2997-3000.
- [56] Adlercreutz, P., Gitlesen, T., Neube, I., Read, J. S., 1997. Vernonia Lipase : A Plant Lipase with Strong Fatty Acid Selectivity, *Methods in Enzymology*, **284** : 220-232.

- [57] Üstün, G., Türkay, S., Karaali, A., 1998. *Nigella sativa* Seeds : A Potential Source for Oil and Oleochemicals, in Proceedings of the World Conference on Oilseeds and Edible Oils Processings, Editors Koseoglu, S. S., Rhee, K. C., Wilson, R. F., Volume II, AOCS Press, Champaign, Illinois, 155-160.
- [58] Üstün, G., Kent, L., Çekin, N., Civelekoglu, H., 1990. Investigation of the Technological Properties of *Nigella sativa* (Black Cumin) Seed Oil, *J. American Oil Chemists Society*, **67** : 958-960.
- [59] Karakazan, S., 1997. Çörekotu (*Nigella sativa* L.) Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [60] Akın, A., 1998. Çörekotu (*Nigella sativa* L.) Lipaz Enziminin Stabilizasyonuna Şekerlerin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [61] Ünsal, Ş., 1999. Çörekotu (*Nigella sativa* L.) Lipaz Enziminin Stabilizasyonuna PEG Bileşiklerinin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [62] Akova, A., Üstün, G., 2000. Activity and Adsorption of Lipase from *Nigella sativa* Seeds on Celite at Different pH Values, *Biotechnology Letters*, **22** : 355-359.
- [63] Dandik, L., Aksoy, H. A., 1992. The Kinetics of Hydrolysis of *Nigella sativa* (Black Cumin) Seed Oil Catalyzed by Native Lipase in Ground Seed, *J. American Oil Chemists Society*, **69** : 1239-1241.
- [64] Dandik, L., Arıoğlu, G., Aksoy, H. A., 1993. Enzymatic Hydrolysis of Used Frying Oil by Native Lipase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **42** : 119-126.
- [65] Dandik, L., Aksoy, H. A., 1996. Application of *Nigella sativa* Lipase in Oleochemical Reactions, *Enzyme and Microbial Technology*, **19** : 277-281.
- [66] Dandik, L., Çerçioğlu, N., Aksoy, H. A., 1998. An Investigation of Enzymatic Oil Hydrolysis by *Nigella sativa* Seed Lipase, in Proceedings of the World Conference on Oilseeds and Edible Oils Processings, Editors Koseoglu, S. S., Rhee, K. C., Wilson, R. F., Volume II, AOCS Press, Champaign, Illinois, 350-353.
- [67] Mert, S., Dandik, L., Aksoy, H. A., 1995. Production of Glycerides from Glycerol and Fatty Acids by Nativ Lipase of *Nigella sativa* Seeds, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **50** : 333-342.
- [68] El, N., Dandik, L., Aksoy, H. A., 1998. Solvent-Free Glycerolysis Catalyzed by Acetone Powder of *Nigella sativa* Seed Lipase, *J. American Oil Chemists Society*, **75** : 1207-1211.

- [69] Aksoy, H. A., Riva, S., Secundo, F., Tüter, M., Türkay, S., Üstün, G., 2001.
Investigation of Enantioselectivity of *Nigella sativa* L. Seed Lipase,
Tübitak- İtalya Ulusal Araştırma Konseyi (Consiglio Nazionale delle
Ricerche-CNR) Ortak Projesi.



ÖZGEÇMİŞ

Serhat İpekler, 12/01/1975 tarihinde Konya’ da doğdu. İlkokul ve ortaokulu İstanbul’ da bitirdi. 1993 yılında, Üsküdar H. Avni Sözen Anadolu Lisesinden mezun oldu. 1994 yılında girdiği İ.T.Ü Kimya-Metalurji Fakültesi, Kimya Mühendisliği bölümünden Haziran 1998 döneminde Kimya Mühendisi olarak mezun oldu. Aynı yıl, aynı bölümde Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Teklas Kauçuk A.Ş., Karışım Tesisi, AR-GE bölümünde AR-GE mühendisi olarak görev yapmaktadır.

