

126705

**ÇÖREKOTU LİPAZ ENZİMİNİN
İMMOBİLİZASYONU VE TEKNOLOJİK
UYGULAMALARI**

DOKTORA TEZİ
Y. Müh. Aylin AKOVA
(506952002)

**TEZ YÖNETKÖĞÜZETİM KURULU
REKORDANTASYON**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26 Aralık 2001
Tezin Savunulduğu Tarih : 11 Nisan 2002

Tez Danışmanı :

Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN

Diğer Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ayşe AKSOY (İ.T.Ü.)

Prof. Dr. Nuran DEVECİ (İ.T.Ü.)

Doç. Dr. Dilek KAZAN (M.Ü.)

Prof. Dr. Bülent GÜRLER (İ.Ü.)

MAYIS 2002

126705

ÖNSÖZ

Çörekotu lipaz enziminin immobilizasyonunun incelendiği bu çalışmada, immobilize enzim preparatının hazırlanışı ve teknolojik uygulamaları test edilmiştir.

Çalışmamın her aşamasında, yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN'e ve tüm Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca yaşamımın her aşamasında bana emeği geçen ve beni her konuda destekleyen aileme şükranlarımı sunarım.

Mayıs 2002

Kim. Yük. Müh. Aylin AKOVA

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	ix
SEMBOL LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. TEORİK ÇALIŞMA	2
2.1. Enzim İmmobilizasyonunun Önemi	2
2.2. İmmobilizasyon Yöntemleri Hakkında Genel Bilgi	3
2.2.1. Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri	4
2.2.1.1. Taşıyıcılar Hakkında Genel Bilgi	5
2.2.1.2. Kovalent Bağlama	6
2.2.1.3. İyonik Bağlama	8
2.2.1.4. Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi	8
2.2.2. Çapraz Bağlama Yöntemleri	11
2.2.3. Tutuklama Yöntemleri	11
2.2.3.1. Polimer matrikste tutuklama	12
2.2.3.2. Mikrokapsülleme	12
2.3. Lipazların İmmobilizasyonu Üzerine Yapılmış Çalışmalar	13
2.3.1. Adsorpsiyon Yöntemi ile Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu	13
2.3.1.1. Hidrofilik Taşıyıcıya Lipaz Adsorpsiyonu	14
2.3.1.2. Hidrofobik Taşıyıcıya Lipaz Adsorpsiyonu	17
2.3.2. Diğer İmmobilizasyon Yöntemleri ile Lipaz İmmobilizasyonu	19
Üzerinde Yapılmış Çalışmalar	19
2.4. İmmobilize Lipaz Enzimlerinin Teknolojik Uygulamaları	20
2.4.1. GLA İçeren Yağlardan GLA'ın Zenginleştirilmesi Üzerinde	22
Yapılmış Çalışmalar	22
2.5. Çörekotu Bitkisi, Tohumları ve Lipazı Hakkında Genel Bilgi	25
2.5.1. Çörekotu Bitkisi ve Tohumları	25
2.5.2. Çörekotu Lipazı ile Yürütülmüş Enzimatik Reaksiyonlar	26
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	28
3.1. Kullanılan Hammaddeler	28
3.1.1. Çörekotu Tohumlarının Karakterizasyonu	28
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.2. Çalışma Yöntemi	30
3.2.1. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu	30
3.2.2. Lipaz Ekstraktlarının Protein İçeriklerinin Belirlenmesi	31
3.2.3. Lipaz Preparatlarının (Ekstrakt ve İmmobilize Örneklerin) Hidroliz	33
Aktivitelerinin Belirlenmesi	33

3.2.4. Çörekotu Lipazının Selit Üzerine İmmobilize Edilmesinde Uygulanan Yöntemler	33
3.2.5. İmmobilize Çörekotu Lipazının İnaktivasyon Kinetiğinin İncelenme Yöntemi	35
3.2.6. İmmobilize Çörekotu Lipazının Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesinde Uygulanan Yöntem	37
3.2.7. İmmobilize Çörekotu Lipazının Hidroliz Aktivasyon Enerjisinin Belirlenme Yöntemi	38
3.2.8. İmmobilize Çörekotu Lipazının Tekrarlı Kullanımı ile Solvent Ortamında Kullanılabilirliğinin İncelenme Yöntemi	39
3.2.9. İmmobilize Çörekotu Lipazının Substrat ve Yağ Asiti Seçiciliğinin Belirlenme Yöntemleri	40
3.3. Çörekotu Lipaz Enziminin Selit Üzerine İmmobilizasyonuna Ortam pH'nın ve Çözücü Varlığının Etkisi	44
3.3.1. Çörekotu Lipaz Enziminin Selit Üzerine Adsorpsiyonla İmmobilizasyonuna Ortam pH'nın ve Protein Miktarının Etkisi	44
3.3.2. İmmobilize Çörekotu Lipaz Enziminin Aktivitesine Adsorpsiyon Ortamı pH'nın Etkisi	51
3.3.3. Çörekotu Lipaz Enziminin İmmobilizasyonunda, Optimum Adsorpsiyon pH Değerinde Optimum Başlangıç Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	56
3.3.4. Çörekotu Lipaz Enziminin Adsorpsiyon İzotermelerinin Langmuir ve/veya Freundlich Modellerine Uygunluğunun Tespiti	58
3.3.5. Çörekotu Lipaz Enzimin Selit Üzerine İmmobilizasyonuna Çözücü Etkisi	60
3.4. İmmobilize Çörekotu Lipaz Preparatlarının İnaktivasyon Kinetik Değerlerinin İncelenmesi	66
3.5. İmmobilize Çörekotu Lipaz Preparatlarının Km ve Vmax Kinetik Değerlerinin İncelenmesi	75
3.6. İmmobilize Çörekotu Lipaz Preparatlarının Hidroliz Aktivasyon Enerjisi Değerlerinin İncelenmesi	78
3.7. İmmobilize Çörekotu Lipaz Enziminin Tekrarlı Kullanımı ve Solvent Ortamında Kullanılabilirliğinin İncelenmesi	81
3.8. İmmobilize Çörekotu Lipaz Enziminin Substrat Seçiciliğinin İncelenmesi	83
3.9. İmmobilize Çörekotu Lipaz Enziminin Yağ Asiti Seçiciliğinin İncelenmesi	88
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	100
KAYNAKLAR	105
ÖZGEÇMİŞ	120

KISALTMALAR

PMMA	: Polimetilmetakrilat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra-Asetik Asit
EPA	: Eikosapentaneoik Asit
DHA	: Dokosahekzaneoik Asit
GLA	: Gamma-Linolenik Asit
TAG	: Triaçilgliserol
AOCS	: American Oil Chemist's Society
TLC	: Thin Layer Chromatography
FID	: Flame Ionization Detector
TG	: Trigliserit
DG	: Digliserit
MG	: Monogliserit
YA	: Yağ Asitleri
SF	: Stabilizasyon Faktörü

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1.	Denizli yöresi çörekotu tohumlarının kimyasal bileşimi.	29
Tablo 3.2.	Protein tayininde absorbans değerleri 0,03-0,006 arasında olan numuneler için kullanılması gereken düzeltme faktörleri.	32
Tablo 3.3.	pH 5’de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 1). (Lipaz ekstratının protein içeriği : 11.21 mg/mL)	45
Tablo 3.4.	pH 5’de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 2). (Lipaz ekstratının protein içeriği : 14.94 mg/mL)	45
Tablo 3.5.	pH 6’da, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 3). (Lipaz ekstratının protein içeriği : 15.07 mg/mL)	47
Tablo 3.6.	pH 6’da, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 4). (Lipaz ekstratının protein içeriği : 13.97 mg/mL)	48
Tablo 3.7.	pH 7’de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 5). (Lipaz ekstratının protein içeriği : 9.82 mg/mL)	48
Tablo 3.8.	pH 7’de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 6). (Lipaz ekstratının protein içeriği : 13.34 mg/mL)	49
Tablo 3.9.	pH 7’de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 7). (Lipaz ekstratının protein içeriği : 16.35 mg/mL)	49
Tablo 3.10.	pH 7’de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 8). (Lipaz ekstratının protein içeriği : 13.94 mg/mL)	50
Tablo 3.11.	pH 5, 6, 7 ve 8’de hazırlanmış immobilize enzimlerde, adsorplanmış enzim miktarının ve immobilizasyon verimlerinin başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Lipaz ekstraktı protein içeriği= 12,3 mg/mL).	52
Tablo 3.12.	pH 5, 6, 7 ve 8’de hazırlanmış immobilize enzimlerde, aktivitenin ve aktivite kazanımının başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Lipaz ekstraktının aktivitesi: 0,42 U/mg protein).....	53
Tablo 3.13.	pH 6’ da elde edilen immobilize enzimlerde, aktivite, aktivite kazanımı ve immobilizasyon verimlerinin başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi.....	58
Tablo 3.14.	Çörekotu lipazının selit üzerine adsorpsiyonun da, saptanan Langmuir parametreleri.	58

Tablo 3.15.	pH 6' da ve aseton/tampon ortamında hazırlanmış immobilize enzimlerde, bağlanmış protein miktarlarının ve immobilizasyon verimlerinin başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi. (Lipaz ekstraktı protein içeriği = 14,68 mg/mL).	61
Tablo 3.16.	pH 6' da ve aseton/tampon ortamından hazırlanmış immobilize enzimlerde, aktivitelerin ve aktivite kazanımının başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Lipaz ekstraktının aktivitesi 0,41 U/mg protein).	61
Tablo 3.17.	pH 6' da direkt tampon çözeltiden ve solvent /tampon çözeltilerinden hazırlanmış immobilize enzimlerin özelliklerinin karşılaştırılması. (Lipaz ekstraktının protein içeriği: 15,22 mg/mL ve aktivitesi 0,39 U/mg protein; başlangıç protein konsantrasyonu: 5 mg/mL).	65
Tablo 3.18.	Çörekotu lipaz ekstraktının (serbest enzimin) inaktivasyonu.	67
Tablo 3.19.	Tampon çözeltiden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının inaktivasyonu.	68
Tablo 3.20.	Aseton/Tampon çözeltilerinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının inaktivasyonu.	69
Tablo 3.21.	Hekzan/Tampon çözeltilerinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının inaktivasyonu.	70
Tablo 3.22.	Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzimlerine ait inaktivasyon kinetik değerleri.	73
Tablo 3.23.	Serbest ve immobilize çörekotu lipazının inaktivasyon aktivasyon enerjisi.	74
Tablo 3.24.	Zeytinyağının serbest ve immobilize çörekotu lipaz örnekleri ile hidrolizinde, başlangıç hidroliz hızlarının zeytinyağı konsantrasyonu ile değişimi.	76
Tablo 3.25.	Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzimi örneklerinin Km ve Vmax Değerleri.	77
Tablo 3.26.	Zeytinyağının serbest ve immobilize çörekotu lipaz örnekleri ile hidrolizinde, başlangıç hidroliz hızlarının sıcaklık ile değişimi.	78
Tablo 3.27.	Serbest ve immobilize çörekotu lipazının hidroliz aktivasyon enerjisi.	80
Tablo 3.28.	Hekzan-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının hidroliz reaksiyonunda tekrarlı kullanımı.	81
Tablo 3.29.	Hekzan ortamında zeytin yağının immobilize çörekotu enzimi ile hidrolizinde enzim aktivitesine suyun etkisi.	82
Tablo 3.30.	Ayçiçek, boraj, soya, pamuk ve zeytin yağı yağ asitlerinin bileşimleri.	83
Tablo 3.31.	Menhaden balık yağı yağ asitleri bileşimi.	84
Tablo 3.32.	Domuz yağı (lard oil) ve hint tohumu yağı yağ asitlerinin bileşimleri.	85
Tablo 3.33.	Serbest ve immobilize çörekotu lipazı ile çeşitli yağların hidrolizleri sonucunda açığa çıkan yağ asitleri miktarları.	86
Tablo 3.34.	Ayçiçek, pamuk, zeytin, soya, hint tohumu, boraj, menhaden ve domuz yağı yağ asitlerinin çift bağına göre sınıflandırılması.	87

Tablo 3.35.	Boraj yağının sulu ortamda serbest enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.....	89
Tablo 3.36.	Boraj yağının hekzan ortamında 168 U/g yağ immobilize enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.....	90
Tablo 3.37.	Boraj yağının serbest ve immobilize enzim ile hidrolizinde, DG ürünü bileşiminin zamanla değişimi.	91
Tablo 3.38.	Boraj yağının serbest enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.	92
Tablo 3.39.	Boraj yağının serbest enzim ile hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.	93
Tablo 3.40.	Boraj yağının serbest enzim ile hidrolizinde, 77 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.	94
Tablo 3.41.	Boraj yağının immobilize enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.....	95
Tablo 3.42.	Boraj yağının immobilize enzim ile hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.....	96
Tablo 3.43.	Boraj yağının immobilize enzim ile hidrolizinde, 77 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.....	97
Tablo 3.44.	Boraj yağının serbest ve immobilize enzim ile enzimatik hidrolizinde,ürün bileşenlerinde GLA içeriğinin zamana göre değişimi.....	98
Tablo 3.45.	Boraj yağının serbest ve immobilize enzim ile enzimatik hidrolizinde, Gliserid karışımı ile YA de bulunan GLA ‘in zamana göre değişimi.	98

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1	Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması [18,19].....	4
Şekil 2.2	CNBr vasıtasıyla selüloz, dekstran ve benzeri polisakkaritlere enzimin serbest amino gruplarının kovalent bağlanması	7
Şekil 3.1	pH 5’de, adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının (C_{ad}), başlangıç protein konsantrasyonu (C_i) ile değişimi.....	46
Şekil 3.2	Farklı pH’larda, adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi	47
Şekil 3.3	İmmobilize enzim aktivitelerinin pH ve adsorbe protein miktarına göre değişimi	54
Şekil 3.5	İmmobilize çörekotu lipaz enzimlerinin aktivitelerinin pH ve başlangıç protein konsantrasyonuna göre değişimi	57
Şekil 3.6	Çörekotu lipaz enziminin Langmuir adsorpsiyon izotermelerinin pH ile değişimi	59
Şekil 3.7	Çörekotu lipaz enziminin Freundlich adsorpsiyon izotermelerinin pH ile değişimi	60
Şekil 3.8	Tampon çözeltiden ve aseton / tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipaz enzimlerinin protein içeriklerinin başlangıç protein konsantrasyonuna göre değişimi.....	62
Şekil 3.9	Tampon çözeltiden ve aseton/tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipaz enzimlerinin aktivitelerinin başlangıç protein konsantrasyonuna göre değişimi.....	63
Şekil 3.10	Tampon çözeltiden ve aseton/tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu enzimlerinin aktivitelerinin selite bağlanan protein miktarına göre değişimi	64
Şekil 3.11	Çörekotu lipaz ekstraktının inaktivasyonu	71
Şekil 3.12	Tampon çözeltiden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazını inaktivasyonu	71
Şekil 3.13	Aseton/Tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının inaktivasyonu	72
Şekil 3.14	Hekzan/Tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının inaktivasyonu	72
Şekil 3.15	Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzimlerinin inaktivasyon hız sabitlerinin sıcaklıkla değişimi	75
Şekil 3.16	Zeytinyağının serbest ve immobilize çörekotu lipaz örnekleri ile hidrolizinde, başlangıç hidroliz hızlarının zeytinyağı konsantrasyonu ile değişimi.....	76

Şekil 3.18	Zeytinyağının serbest ve immobilize çörekotu lipaz örnekleri ile hidrolizinde, relatif başlangıç hidroliz hızlarının sıcaklık ile değişimi.....	79
Şekil 3. 19	Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzim örneklerinin Arrhenius eşitliğine göre başlangıç hidroliz hızlarının sıcaklık ile değişimi.....	80
Şekil 3.20	Boraj yağının serbest ve immobilize enzimle 40 °C da ve 185 U/g yağ enzim miktarında yürütölmüş hidrolizinde, ürün bileşiminin zamanla değişimi	90



SEMBOL LİSTESİ

C_e	:Dengedeki lipaz çözeltisinin protein konsantrasyonu (mg protein/mL)
C_{ad}	:Adsorplanan Protein konsantrasyonu (mg protein/g selit)
C_{max}	:Adsorplanabilecek en fazla lipaz miktarı (mg potein/gselit)
K_p	:Adsorpsiyon denge sabiti (mL/mg protein)
K	:Taşıyıcının adsorpsiyon kaabiliyetini ifade eden sabit
n	:Adsorpsiyon etkinliğini ifade eden sabit
A_t	:Enzimin ısıl işlem sonrası aktivitesi (U/mg)
A_o	:Enzimin başlangıç aktivitesi
k_i	:İnaktivasyon hız sabiti (dak ⁻¹)
E_i	:İnaktivasyon enerjisi (J/mol)
R	:Gaz sabiti (8.314 J/K)
T	:Mutlak sıcaklık (K)

ÇÖREKOTU LİPAZININ İMMOBİLİZASYONU VE TEKNOLOJİK UYGULAMALARI

ÖZET

Lipaz enzimleri deterjan sanayiinde, süt, ilaç meyve, suyu, tekstil, yağ ve margarin endüstrisinde, yem sanayiinde kimyasal maddelerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimlerin reaksiyon ortamından aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır ve dolayısıyla reaksiyon kontrolü çok güçtür. Bu amaçla immobilizasyonla enzimler ısıya denature olmaya karşı stabilize edilirler.

Bu çalışmada, çörekotu lipazı selit üzerine adsorpsiyon yöntemiyle ve adsorpsiyonla çöktürme yoluyla immobilize edilmiştir. Adsorpsiyonun Langmiur izotermine uygun olduğu tespit edilmiştir. Adsorpsiyona pH etkisi ve başlangıç protein konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. Selit üzerine adsorbe olan lipaz enzimi miktarının pH 5' de en yüksek olduğu tespit edilmiştir. İmmobilizasyon ortamının aktiviteye etkisi incelenmiş, pH 6' da hazırlanmış immobilize enzim örneklerinin en yüksek aktivite değerine sahip olduğu bulunmuştur.

Çörekotu lipaz enziminin aseton ve hekzan varlığında selit üzerine immobilizasyonu incelenmiş, hekzan varlığında aktivite kazanımının % 82 olduğu bulunmuştur. Hekzan varlığında hazırlanan immobilize enzim örneklerinin ısıl stabilitelerinin ve aktivasyon enerjisinin doğal enzime oranla yüksek olduğu, K_m ve V_m değerlerinin ise bir miktar azaldığı tespit edilmiştir. Aseton ve hekzan ile adsorpsiyon-çöktürme yöntemlerine göre hazırlanmış immobilize enzim örneklerinin sulu ortamda ve hekzan ortamda tekrarlı olarak 4 kez kullanılabildiği ve orijinal aktivite değerinin % 70'i kadar aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

İmmobilize çörekotu lipazının substrat ve yağ asiti seçiciliği incelenmiştir. Substrat seçiciliğini incelemek amacıyla 8 farklı yağ (zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, boraj yağı, pamuk çekirdeği yağı, Hint çekirdeği yağı, Hint tohumu yağı, domuz yağı, balık yağı) kullanılmıştır. İmmobilize çörekotu enziminin doymuş yağ asiti içeren yağlara seçicilik gösterdiği bulunmuştur. Yağ asiti seçiciliğini incelemek amacıyla serbest ve immobilize enzim ile boraj yağı hidrolizi incelenmiştir. Çörekotu lipazının her iki formuyla γ - linolenik asite karşı negatif seçicilik gösterdiği bulunmuştur. Orijinal boraj yağında % 23 olan γ - linolenik asit içeriği hidrolizlenmemiş olan TG fraksiyonunda % 38 olduğu bulunmuştur.

IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM NIGELLA SATIVA SEED AND TECNOLOGICAL APPLICATIONS

SUMMARY

Lipases one of the most important classes of industrial enzymes, which are used in detergent, food, textile industry. Since most of the industrial applications carried out in aqueous medium, regaining of lipases from reaction medium without losing activity is impossible and controlling of the reaction is difficult. For this reason lipases are stabilized by immobilization.

In this study lipase from *Nigella sativa* seeds was immobilized on celite by adsorption and by adsorption-precipitation method. It was found that adsorption is well fitted with Langmuir isotherm. Effect on pH and initial protein concentration on immobilization yield and activity of immobilized enzymes were investigated. It was found that highest adsorption value was obtained at pH 5 where as highest activity of immobilized lipase was obtained at pH 6.

Immobilization of lipase from *Nigella sativa* seeds was investigated in the presence of acetone and hexane. It was found that in the presence of hexane activity yield reached at % 82 respectively. Thermostability of lipases immobilized by adsorption and adsorption precipitation method were investigated. Lipases immobilized in the presence of hexane showed high thermal stability and activation energy with respect to native enzyme. On the other hand K_m and V_m constants of lipases decreases slightly after immobilization. Activity yield of immobilized lipases were investigated when was used for hydrolyzation of olive oil four times. Retention of enzymatic activities for immobilized lipase in the presence of hexane was % 70 of the original free lipase.

To examine substrate specificity of free and immobilized lipase, eight different oil (olive oil, sunflower oil, borage oil, cotton seed oil, castor oil, castor seed oil, lard oil, fish oil) were used. It was found that immobilized lipase from *Nigella sativa* seed shown specificity, oils contains saturated fatty acids showed negative specificity to oils containing polyunsaturated fatty acids. Borage oil, containing % 23 γ -linolenic acid, was used to determine fatty acid specificity of free and immobilized lipase. It was found that free and immobilized lipase showed negative specificity to gamma linolenic acid. and γ -linolenic acid was enriched in unhydrolyzed TG fraction to % 38.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Lipaz enzimleri deterjan sanayiinde, yağların modifikasyonunda ve özellikle farmasötik öneme sahip kimyasal maddelerin sentezinde kullanılan önemli endüstriyel enzimleridir. Diğer taraftan endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimlerin reaksiyon ortamından, aktivitesini yitirmeden geri kazanılması olanak dışıdır ve dolayısıyla çok güçtür. Enzimlerin tekrarlı olarak kullanımını sağlamak ve reaksiyon ortamından reaksiyon ürünlerinin kirlenmeden uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla enzimlerin immobilizasyonu üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Bu çalışmada çörekotu tohumlarından elde edilen lipaz enziminin selit üzerine adsorpsiyonu, immobilize enzimin kinetik parametreleri , sulu ortamında ve çözücü ortamında tekrarlı kullanımı incelenmiştir. İmmobilize çörekotu lipazının substrat seçiciliği ve yağ asiti seçiliği incelenmiştir.

2. TEORİK ÇALIŞMA

2.1 Enzim İmmobilizasyonunun Önemi

Günümüzde enzimler, özellikle immobilize formda, deterjan, süt, ilaç, meyva suyu, tekstil, yağ ve margarin endüstrilerinde; biracılıkta, şarap ve diğer içkilerin üretiminde; tıpta kimyasal ve klinik analizlerde; yem sanayiinde ve kimyasal maddeler üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır [1-17]. İmmobilize enzimlerin teknolojik uygulamalarda tercih edilmesinin birçok nedenleri vardır. Bir kere enzimlerin endüstriyel kullanılması esas olarak çalışma koşullarında uzun süre stabil olmasına bağlıdır. Bilindiği üzere, enzimler su ile minimum temas yüzeyi gösterecek şekilde organize olmuş globüler yapıları sayesinde su aktivitesi düşük doğal ortamlarında enzimatik faaliyetlerini mükemmel olarak yürütürler. Enzimler, mikrobiyal, hayvansal veya bitkisel kaynaklı olsun, doğal çevrelerinden izole edildiklerinde, mikro çevrelerinin değişmesi sonucu genellikle çok kısa zamanda aktivitelerini kaybederler. Aktivite kaybı yani enzim proteinlerinin denatürasyonu, sıcaklığın, ortam pH'ının ve denatüre edici maddelerin mevcudiyeti gibi birçok faktörün etkisiyle enzim karakteristیکlerine bağlı olarak belli bir zaman içinde gerçekleşir. Dolayısıyla serbest enzimlerle endüstriyel proseslerin yürütülmesinde zaman faktörü büyük önem taşır.

Diğer taraftan, endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan bu serbest enzimlerin reaksiyon ortamından, aktivitesini yitirmeden, geri kazanılması olanak dışıdır ve dolayısıyla reaksiyonun kontrolü da çok güçtür. Reaksiyonun istenilen anda durdurulması için, enzimin yüksek sıcaklıkta kısa zamanda tamamiyle denatüre edilmesi veya ortama inhibitör katılması gerekir ki her iki işlemde ürünler için istenilmeyen sonuçlar doğurabilir. Ürünlerin ısı etkisiyle bozunması söz konusu olabilir. Ayrıca, reaksiyon ürünlerinin bu inaktive edilmiş enzimden de arıtılması gerekir ki bu işlemde reaksiyon maliyetini artırır. Yukarıda belirtildiği gibi yapılan her işlem ve enzimin

ömrü, enzimi tek kullanışlı yapmaktadır. Kendisinin yeniden kullanılması söz konusu değildir. Enzimlerin henüz pahalı katalizörler olmaları dikkate alındığında bu unsur da maliyeti yükselten önemli bir etmendir. Ayrıca serbest enzimler sürekli üretim sistemlerine de uygulanamazlar.

Tüm bu sorunları olumlu yönde çözümleyebilmek, enzimleri endüstri için daha çekici hale getirebilmek için özellikle son otuz yılda enzim immobilizasyonu üzerinde araştırmalar yoğunlaşmıştır. Enzimler, doğrudan doğruya suda çözünmeyen inert bir taşıyıcıya fiziksel veya kimyasal olarak bağlanarak; yine bir taşıyıcı matrikse diğer bir protein veya bifonksiyonel kimyasal maddeler aracılığı ile yapısında çapraz bağlar oluşturulmuş olarak bağlanarak yada bir matriks veya mikrokapsül içerisinde tutuklamakla immobilize edilirler [18-31]. Bu şekilde immobile edilmiş enzimlerin, serbest enzimlere kıyasen kazandıkları üstünlükler, aşağıdaki gibi sıralanabilir:

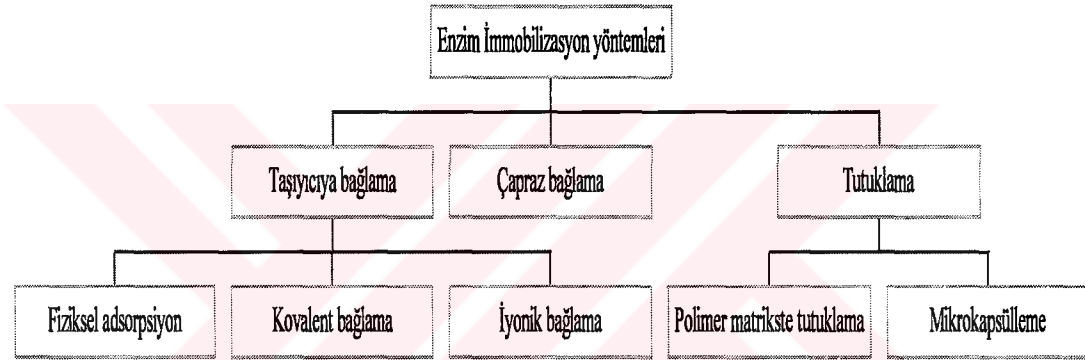
- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir.
- Çevre koşullarına (pH, sıcaklık v.b.) karşı daha dayanıklıdır.
- Bir çok kez ve uzun süre kullanılabilir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilir.
- Serbest enzime kıyasla daha kararlıdır.
- Ürün oluşumu kontrol altında tutulabilir.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek aktivite gösterebilir.
- Enzimin kendini parçalaması (autolysis, self digestion) olasılığı azalır.
- Mekanik etkilere serbest enzimlere oranla daha dayanıklıdır.

2.2 İmmobilizasyon Yöntemleri Hakkında Genel Bilgi

Bu bölümde, immobilizasyon yöntemleri üzerinde 1993-2000 yılları arasında yayınlanmış derlemeler (review) ve kitaplardan faydalanılarak immobilizasyon yöntemleri hakkında genel bilgiler verilmiştir [18-31]. Yöntemlerin açıklanmasında, çalışmamızın amacına uygun olarak, fiziksel adsorpsiyon ile immobilizasyon üzerinde daha fazla durulmuş ve diğer yöntemlere kısaca değinilmiştir.

Genel olarak, her yöntemde enzim immobilizasyonunda dikkat edilmesi gereken husus, işlem esnasında enzim aktif merkezinin bu işlemten minimum etkilenmesini sağlamaktır. Aktif merkezde farklı fonksiyonlara sahip iki bölge vardır. Bunlardan biri katalitik merkez diğeri ise substrata spesifikliğı sağlayan merkezdir. Aktif merkezdeki aminoasitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değışirse katalitik aktivite düşer ve substrat spesifikliğı değışir. İmmobilizasyon işlemi yumuşak koşullarda gerçekleştirilmelidir. Yüksek sıcaklık, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözügenler veya yüksek tuz konsantrasyonu ile muamele proteinlerin denaturasyona sebep olur dolayısıyla aktivite kaybına neden olur.

Enzim immobilizasyon yöntemlerini Şekil 2.1’ de gösterildiğı şekilde üç grup altında toplamak mümkündür :



Şekil 2.1. Enzim immobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması [18,19].

Aşağıdaki bölümlerde Şekil 2.1’ de verilen sınıflandırmaya uyularak yöntemlerin ana prensipleri açıklanmaya çalışılacaktır.

2.2.1 Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama en eski ve diğerlerine nazaran kolaylığından dolayı en fazla kullanılan immobilizasyon yöntemidir. Taşıyıcıya bağlanma kovalent, iyonik veya adsorpsiyon yolu ile gerçekleştirilir. Enzime göre taşıyıcı seçimi çok önemlidir. Bundan dolayı yöntemlerin açıklanmasından önce taşıyıcılar hakkında bilgi verilmiştir.

2.2.1.1 Taşıyıcılar Hakkında Genel Bilgi

İmmobilize enzim sisteminin performansını etkileyen en önemli komponent taşıyıcı yani matrikstir. Enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak düşünülecek her materyalde olması gereken özellikler aşağıdaki gibi özetlenebilir.

- Büyük yüzey alanı
- Geçirgenlik
- Çözünmezlik
- Kimyasal, mekanik ve ısı stabilite
- Yüksek rijidite
- Uygun biçim ve partikül büyüklüğü
- Mikrobiyal etkilere dayanıklılık
- Rejenere olabilme

Bağlanmış enzim miktarı ve enzimin immobilizasyondan sonraki aktivitesi taşıyıcının yapısına çok bağlıdır. Genel olarak taşıyıcının hidrofil karakteri ve yüzeyi arttıkça birim taşıyıcı başına bağlı enzim miktarı da artar. Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcılar reaktif değilse yardımcı bir reaktif ile aktive edilmeleri de gerekebilir.

Taşıyıcılar kimyasal yapılarına göre organik ve inorganik kökenli olmak üzere iki ana sınıfta incelenebilir.

Organik Taşıyıcılar: Organik taşıyıcılar esas olarak makromoleküller yapıda bileşikler olup, doğal ve sentetik polimerler olmak üzere kendi aralarında da ikiye ayrılırlar. İmmobilizasyonda en fazla kullanılan doğal polimerler polisakkaritlerdir. Polisakkarit moleküllerinin en belirgin üstünlüğü bağlanan enzimi koruyan ve yapıya hidrofilik karakter sağlayan çok sayıda hidroksil gruplarına sahip olmasıdır. Selüloz, enzimlerin kovalent bağlanması için taşıyıcı olarak kullanılabilen ilk malzemelerden biridir. Dekstranlar da enzim immobilizasyonunda kabul gören polisakkarit molekülleridir. Bu moleküller büyük ölçüde dallanma da gösterirler. Bunlar moleküler elek özelliğine sahip olduklarından jel filtrasyon kromatografisinde taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak Sephadex adı altında tanınmaktadırlar.

Dekstranların immobilizasyonda kullanılması için aktive edilmesi gerekir. Bu amaçla önce CNBr ile muamele edilir. Aktivasyon sonucunda dekstranın imidokarbonat türevi ile elde edilir. Özellikle kovalent bağlanmalar için uygunluk gösterir.

Alg ve agaroz polisakkaritleri biyokatalizörlerin immobilizasyonu için en sık kullanılan taşıyıcılardandır. Bu polisakkaritler, kürecik formunda olup, zon elektroforezinde destek materyali olarak da kullanılırlar. Kitin ve kitosan ise amino grubu içeren polisakkaritler olup enzim immobilizasyonu için son yıllarda tercih edilen pahalı olmayan taşıyıcılardandır.

Sentetik polimerler ise, doğal polimerlere göre gerek hazırlanma yöntemlerinin çeşitliliğinden gerekse kolaylıkla modifiye edilmelerinden dolayı günümüzde tercih edilen taşıyıcılardandır. Polistiren proteinlerin immobilizasyonu için kullanılan ilk sentetik polimerdir. Polipropilenler, poliakrilat ve poliakrilamidler günümüzde denenen ve başarılı sonuçlar alınmış sentetik polimerlerdir.

İnorganik Taşıyıcılar: İnorganik taşıyıcıların fiziksel özelliklerinden dolayı endüstriyel kullanım açısından organik taşıyıcılara kıyasla bazı üstünlükleri vardır. Yüksek mekanik dayanıklılık, ısıl dayanıklılık, organik çözücülere direnç, mikrobiyal etkilere karşı dayanıklılık, kolay işlenme, uzun raf ömrü ve kolay bir piroliz işlemiyle kolay rejenere edilebilme en belirgin üstünlüklerindendir. Ayrıca inorganik maddelerin yapısında geniş pH aralığı, basınç ve sıcaklık nedeniyle bir değişiklik olmaması da önemli husustur.

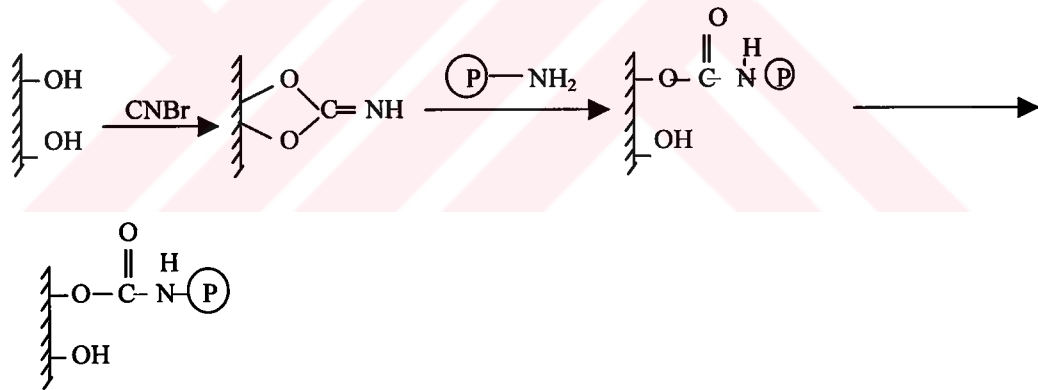
Enzimlerin immobilizasyonu amacıyla kullanılan inorganik taşıyıcı matriksler : bentonit, diatome toprağı, kum, kontrollü gözenekli cam, gözenekli titanium, gözenekli alümina, gözenekli silika, alüminium silikatlar'dır .

2.2.1.2 Kovalent Bağlama

Bu yöntemin esası, enzim proteinlerinin fonksiyonel grupları ile taşıyıcı arasında kovalent bağlar oluşturarak enzimi taşıyıcıya bağlamaktır. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağlanmasında dikkat edilecek en önemli nokta, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasındaki sterik engellemeler nedeni ile bu grupların rahatsız edilmemesidir. Taşıyıcıya kovalent bağlanmada, enzim protein zincirinde yer alan amino asitlerin (i) alfa-amino grupları ile lisin ve

arginin'in yan zincirlerinde bulunan epsilon-amino grupları, (ii) alfa-karboksil grupları ile aspartik ve glutamik asitlerin beta ve gamma karboksil grupları, (iii) tirozin'in fenol halkası, (iv) sistein'in tiol grubu, (v) serin ve treonin'in hidroksil grupları, (vi) histidin'in imidazil grubu, ve (vii) triptofan'ın indol grubu ile taşıyıcı arasında bağlantı yapılabilmektedir. Taşıyıcılar genellikle polimerik maddelerdir ve polimer fonksiyonel gruplarının cinsine göre, açilleme, alkillenme ve arilleme, diazolama, CNBr ile muamele gibi reaksiyonlarla istenilen kovalent bağlar oluşturulur.

Yukarıda sözü edilen reaksiyon mekanizmalarına girilmeyecek, sadece bir örnek üzerinde enzimin kovalent bağlanması açıklanmaya çalışılacaktır. Selüloz, çapraz bağlı dekstran ve agaroz gibi polisakkaritler üzerine enzimin amino grupları vasıtasıyla bağlanması Şekil 2.2' de şematik olarak gösterilmiştir. Taşıyıcılar polihidroksi polimerler olmasına rağmen direkt olarak protein ile bağ yapamamaktadır. Önce CNBr ile aktive edilmekte, molekül üzerinde imidokarbonat grupları oluşturulmakta, daha sonra bu gruplara enzimde bulunan serbest amino grupları bağlanmaktadır.



Şekil 2.2. CNBr vasıtasıyla selüloz, dekstran ve benzeri polisakkaritlere enzimin serbest amino gruplarının kovalent bağlanması .

Yukarıda verilen örnekte görüldüğü üzere reaksiyon koşulları her zaman bu kadar basit olmayıp, kovalent bağlanmalar son derece komplike reaksiyonlar eşliğinde gerçekleşebilir. Bundan dolayı da enzimin konformasyonel yapısında ve aktif merkezlerinde değişimler olabilir. Neticede enzim aktivitesinde düşme ve substrat seçiciliğinde farklılaşma görülür. Ancak kovalent bağlanmada, enzim taşıyıcıya çok sıkı bağlandığından enzimin yüksek iyonik güçlü çözeltilerde bile taşıyıcıdan kopması söz konusu değildir.

2.2.1.3 İyonik Bağlama

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanması temeline dayanır. Bazı durumlarda iyonik bağlanma yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır. İyonik bağlama çok yumuşak koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe neden olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ kovalent bağ kadar güçlü olmadığından, çözeltilerde özellikle pH değişimlerinde taşıyıcıdan enzim kaçıışı söz konusudur.

2.2.1.4 Fiziksel Adsorpsiyon Yöntemi

Enzim immobilizasyonunda kullanılan en eski ve en basit yöntemdir. Adsorpsiyon işlemi sırasında enzim ve taşıyıcı arasında oluşan bağlar, taşıyıcının yüzey özelliğine ve kimyasal özelliğine bağlı olarak iyonik, hidrojen köprüleri veya hidrofobik etkileşimler sonucu oluşabilir. Bu bağların oluşumuna, pH, çözeltinin iyonik kuvveti, sıcaklık, çözücü varlığı, enzim miktarı ile enzim/adsorban oranı gibi faktörlerin ve ortam koşullarının etkisi büyüktür. Bu etmenlerin araştırılması, adsorpsiyonun optimal koşulların saptanması için gereklidir.

Adsorpsiyonla immobilizasyonda, pH ve ortamın iyonik kuvvetinin kontrolü çok önemlidir. Eğer bağlanma sırasında çok zayıf hidrojen bağının yanında daha çok iyon-iyon etkileşimi gerçekleşmiş ise iyonik kuvvet ve pH daki küçük bir değişme dahi protein bağlantısını etkiler ve desorpsiyon gerçekleşebilir. Bu nedenle genellikle adsorpsiyon tampon çözelti ortamında gerçekleştirilir. Bazı durumlarda taşıyıcının yüzeyinin pH'a göre ön koşullandırılması da gerekebilir. Örneğin kontrollü gözenekli silika asidik bir yüzeye sahiptir (pH 4), buna karşılık enzimler genel olarak pH 4' de denatüre olurlar. Bu durumda gözenek kontrollü silikanın yüzeyi enzim ortama konulmadan önce tampon ile işleme sokulmalıdır. Tampon çözeltinin pH' ı ise enzimin en yüksek aktivite gösterdiği ve stabilite gösterdiği pH olarak seçilmelidir. Yüzeyin bu şekilde koşullandırılması için, birçok çalışmada taşıyıcının 37°C' de yaklaşık 1 saat tampon çözeltide bekletilmesinin yeterli olduğu saptanmıştır.

Bilindiği üzere, bir çok enzim kofaktörlerle, bazı metal iyonlarının etkisiyle, aktivasyon kazanır veya daha aktif hale geçer. Ortama ilave edilen bu metal

iyonlarının taşıyıcıya bağlanması da söz konusu olduğunda, enzim aktivasyonu için gerekli olan metal iyonlarını bağlamak için taşıyıcı ile yarışır duruma gelebilir. Hatta metal iyonlarının enzimin fonksiyonel bölgesinden uzaklaşıp taşıyıcıya bağlanması dahi olabilir ki bu durumda ise enzim aktivitesini kaybederek inaktif hale gelir. Adsorpsiyon esnasında bu olayın meydana gelmemesi için, taşıyıcı yüzeyinin enzim ortama katılmadan önce metal iyonlarını içeren çözelti ile ön işleme sokulması en iyi yöntemdir. Bu ön işlem, taşıyıcı ile enzimin metal iyonları için yarışmasını engeller.

Taşıyıcı üzerine adsorplanan enzim miktarını etkileyen faktörlerden biri de, taşıyıcının birim alanı veya ağırlığı başına düşen enzim konsantrasyonudur. Enzim konsantrasyonu artışıyla adsorplanan enzim miktarında da artma olur. Ancak belli bir değerin üstünde adsorpsiyon, enzim moleküllerinin hareket kabiliyetinde sınırlamaya neden olur. Dolayısıyla immobilize olmuş enzim aktivitesi düşer. Her enzim cinsine ve taşıyıcıya bağlı olarak optimum enzim/taşıyıcı oranının belirlenmesi de gereklidir.

Sıcaklık ve zaman da adsorpsiyonla immobilizasyon için önemli faktörlerdir. Sıcaklıkla adsorpsiyonun artması bilinen bir olaydır. Ancak enzim gibi büyük moleküllerin özellikle gözenekli taşıyıcılarda gözenek içine diffüze olmasında, sıcaklığın diffüzyon hızını artırması da dikkate alınması gereken bir husustur. Adsorpsiyon dengesinin kurulması için geçecek zamanında makul seviyede olması için, çok düşük sıcaklıklarda çalışılmaktan kaçınılmaktadır. Seçilen sıcaklıkta protein moleküllerinin denatüre olmaması da dikkat edilecek diğer önemli konudur. Pratik olarak literatürde yer alan adsorpsiyon çalışmalarında oda sıcaklığında enzimlerin adsorpsiyonunun gerçekleştirildiği gözlenmektedir.

Adsorpsiyon yolu ile enzim immobilizasyonu dört farklı yöntemle yapılabilmektedir. Bu yöntemler hakkında aşağıda kısa bilgiler verilmiştir:

- 1. Statik Adsorpsiyon:** Statik işlem, dört yöntem içinde çok zaman alması açısından adsorpsiyonla immobilizasyon için en elverişsiz yöntemdir. Bu yöntem, enzim içeren çözelti içine taşıyıcının eklenmesi ve karıştırmadan enzimin taşıyıcının yüzeyine ve gözeneklerinin içine kendiliğinden difüzlenmesi temeline dayanır. Adsorpsiyon veriminin yüksek olması ve adsorpsiyonun uniform olması için günlerce enzim çözeltisinin taşıyıcı ile birlikte bekletilmesi gerekir.

2. Elektrodepozisyon Yolu ile Adsorpsiyon: Taşıyıcı enzim banyosu içindeki elektrodlerden birinin yakınına yerleştirilir ve akım başlatılır. Enzim taşıyıcıya doğru yürür ve yüzeyinde birikir. Bu yöntem kolaydır fakat çok fazla enzim gerektirmesi ve sonucunda az miktarda immobilize enzim elde edilmesi nedeniyle ekonomik değildir.

3. Kolon İçinde Yürütülen Adsorpsiyon : Ticari olarak immobilize enzim eldesinde en fazla tercih edilen yöntem kolon içinde yürütülen adsorpsiyon yöntemidir. Bu yöntemle adsorpsiyon iki şekilde yapılabilir:

- Enzim kolon içine sürekli beslenir. Bu yöntem, sıcaklığın kontrol edilebildiği su ceketli kolonlarda uygulanabilir. Besleme hızı bir pompa ile kontrol edilir.
- Akışkan yatak prosedüründe ise enzim çözeltisi kolonun tabanından beslenir ve üstünden alınır. Taneciklerin akışkan akımı ile sürekli hareketli olması sağlanır. Pompa ile akım hızı ayarlanır. Sıcaklık kontrolü kolon etrafındaki ceket ile sağlanır. Bu yöntemin en önemli avantajı, adsorpsiyonun kolonda yapılması ve elde edilen immobilize enzimin kolonun içindeyken yıkanmasıdır.

4. Karıştırmalı veya Çalkalamalı Banyoda Yürütülen Adsorpsiyon İşlemi: Bu işlem daha çok laboratuarda uygulanır. Taşıyıcı enzim çözeltisi içine başlangıçta konur, çalkalayarak veya bir karıştırıcı ile sürekli karıştırma yapılır. Adsorpsiyon verimi yüksektir ve uniform olarak gerçekleşir.

Adsorpsiyon yönteminin yararları, işlemin basit ve yumuşak koşullarda gerçekleştirilebilir oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan enzim saflaştırılmasına olanak sağlanmasıdır.

Yöntemin sakıncalarını ise şu şekilde sıralayabiliriz. Her ne kadar immobilizasyon işlemi kolay yapılabiliyorsa da adsorpsiyon optimal koşulların saptanması oldukça güçtür. Optimum koşullarda dahi önemli ölçüde enzim inaktivasyonu gerçekleşebilir dolayısıyla immobilizasyon verimi düşüktür. Ayrıca, eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa, bu durumda enzim kolaylıkla desorbe olur. Enzimin tekrar reaksiyon ortamına geçmesi sonucu elde edilen reaksiyon ürünleri enzimle kirlenmiş olurlar.

2.2.2 Çapraz Bağlama Yöntemleri

Yöntemin esası, küçük molekülü bi- veya multi- fonksiyonel reaktifler ile enzim molekülleri arasında kuvvetli bağlar, genellikle çapraz bağlar, kurularak suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlamaktır. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH ve immobilize edilecek enzimin kimyasal yapısına çok bağımlıdır. İntramoleküler bağlanmalar da söz konusudur.

Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleştirilir.

1. Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
2. Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
3. Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıya adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu,
4. Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonu.

En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehit, klorformat ve karboildiimidazol, heterosiklik halojenürler, divinilsulfonlar, p-benzokinon, tranzisyon metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir.

Çapraz bağlama reaksiyonu çok yumuşak koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusudur.

2.2.3 Tutuklama Yöntemleri

Prensip olarak tutuklama enzim molekülünü belirli bir mekanda durmaya zorlamaktadır. Enzim bulunduğu çevreden dışarıya çıkamaz. Bu işlem polimer matriks içindeki kafeslerde gerçekleştirilebileceği gibi yarı geçirgen membranlar içinde mikrokapsülleme ve miseller ile de gerçekleştirilebilir. Bu yöntemi, kovalent bağlama ve çapraz bağlamadan ayıran en önemli özellik enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmış olmamasıdır.

2.2.3.1 Polimer matrikste tutuklama

Polimerizasyon ve çapraz bağlanmanın oluştuğu ortamda enzim de bulunduğu taktirde enzim çapraz bağlama sonucu oluşan odacıklarda (kafes) tutuklanmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer N,N'.metilenbisakrilamid ile çapraz bağlanmış poliakrilamiddir.

Yöntem, yüksek derecede çapraz bağlı bir polimerin enzim çözeltisi içinde oluşturulması temeline dayanır. Polimerleşme sonucu enzim molekülleri çapraz bağları arasında tutuklanmakta ve böylece ana çözeltiye geçmeleri engellenmektedir.

Çapraz bağ yüzdesi öyle ayarlanmalıdır ki, enzim molekülleri tutuklanabilsin ama substrat moleküllerinin enzim moleküllerine ulaşmasına engel olunmasın. Çapraz bağ yüzdesinin aşırı olması substratın enzim aktif merkezlerine ulaşmasını engellemekle kalmayıp enzimin zincir yapısını zorlayıp aktivite kaybına veya tamamen inaktif olmasına neden olabilir. Bu nedenle optimal çapraz bağ yüzdesi saptanması önemlidir. Bu oran enzime ve taşıyıcıya bağımlı olarak değişir. Uygun çaplı substrat molekülleri polimer kafes içinde tutuklanmış enzim moleküllerine ulaşır ve reaksiyon ürünleri de dışarı çıkar. Tutuklama yöntemi ile immobilize edilecek enzim substratının küçük moleküllu olması gerekir.

2.2.3.2 Mikrokapsülleme

Bu yöntem enzim moleküllerinin yarı geçirgen bir membran içinde tutuklanmasından ibarettir. Mikrokapsüllerin büyüklüğü 1-100μ arasında değişmektedir.

Enzimler daha çok kimyasal mikrokapsülleme ile immobilize edilmektedirler. Bu yöntem ile enzim immbilizasyonu: sürekli ve sürekli olamayan yarı geçirgen mikrokapsüllerde tutuklama olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sürekli mikrokapsüllerde ereve membran katı, süreksiz mikrokapsüllerde lipozomlar, ise bir sıvı tabakadır. İmmobilizasyonda kullanılan ereve maddesinin (membran) yarı geçirgen olması zorunludur. Ayrıca bu yarı geçirgen membranın gözenek çapları; Substrat moleküllerinin kapsül içine girişine ve ürün moleküllerinin dışarı çıkışına olanak verecek bir büyüklükte olmalıdır. Substrat molekülleri ne kadar küçükse bu yöntem ile immobilize edilmiş enzimin verimliliği o ölçüde yüksek olacaktır.

2.3 Lipazların İmmobilizasyonu Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Lipaz enzimleri önemli endüstriyel enzimler olup, bu enzimlerin endüstriyel uygulama alanlarının genişlemesi tamamiyle lipazların bu çalışma koşullarında uzun süre stabil olmalarına bağlıdır. Lipazlar bilindiği üzere sulu çözeltilerde çözünürler ancak substratı olan lipidler suda çözünmezler. Uygun bir organik solvent veya emulgatör kullanılarak sustrat ve enzimin teması sağlanabilir ancak bu tür sistemlerde serbest lipaz kullanmak bazı teknolojik ve ekonomik güçlükler nedeniyle olur. Teknolojik güçlükler ürün ile ilgilidir; ürünün kalitesi, depolama zamanı ve sıcaklık gibi ürünün reaksiyon sonrası gördüğü işlemlere bağlıdır. Ekonomik güçlükler ise prosesi etkiler, enzimin yarılanma süresi ve reaktörde kalma süresini belirler. Serbest enzimle çalışıldığında enzim inaktif hale getirilerek reaksiyon sona erdirilir. Enzim immobilize edilirse, reaksiyon sisteminden ayrı bir faz haline gelir, böylece ürünlerin kirlenmesi önlenir ve enzimin aktif halde kullanım süresi artar. Literatürde lipazların immobilizasyonu ve immobilize lipazların uygulamaları üzerine çok sayıda çalışma bulunmakta olup, aşağıdaki bölümlerde, özellikle adsorpsiyon yönteminin kullanıldığı çalışmalara ağırlık verilerek, bu alanda yapılmış çalışmalar hakkında bilgi verilmiştir.

2.3.1 Adsorpsiyon Yöntemi ile Lipaz Enziminin İmmobilizasyonu

Adsorpsiyon tekniği gerek kolay olması gerekse ekonomik olması nedeniyle lipaz enziminin immobilizasyonunda fazla uygulanan tekniklerden biridir. İmmobilizasyon sonrası lipazın substrat seçiciliğinin değişmemesi adsorpsiyonla immobilizasyon yönteminin avantajları arasındadır.

Lipaz enziminin adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonunda, adsorpsiyon koşullarına bağlı olarak bir miktar aktivite kaybı meydana gelebilir. Aktivite kaybının nedenleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Adsorpsiyon sırasında lipaz da konformasyonel değişim meydana gelmesi
- Taşıyıcının düşük adsorpsiyon kapasitesi
- Hidrofobik substratın lipazın aktif bölgesine yaklaşamaması

- Esnekliği zorlanan lipaz molekülünü içeren taşıyıcının neden olduğu sterik engellemeler
- Hidrofilik taşıyıcıların lipazdan su desorpsiyonuna neden olması

Lipaz enziminin adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonunda, immobilize enzim aktivitesine etki eden en önemli faktörlerden biri taşıyıcının su tutma kapasitesidir. Bu nedenle adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyon hidrofilik ve hidrofobik taşıyıcıya adsorpsiyon olmak üzere iki bölümde incelenmiştir [32].

2.3.1.1 Hidrofilik Taşıyıcıya Lipaz Adsorpsiyonu

Hidrofilik toz şeklindeki katı taşıyıcı üzerine lipaz immobilizasyonu; genel olarak lipazın tampon çözeltide çözülmesi, bu çözeltinin taşıyıcı ile erlende veya kolonda çok iyi karıştırılması, süzülerek adsorbe olmayan kısmının uzaklaştırılması ve immobilize enzimin kurutularak depolanması şeklinde yapılır.

Lipazlar hidrofilik taşıyıcıya adsorplanırken bir miktar su ile birlikte adsorplanırlar. Hidrofilik taşıyıcılar yapıları gereği su tutarlar ve enzim aktivitesinde gerekli olan su için enzim ile yarışırırlar. Taşıyıcı daha önceden su ile doyurulursa enzim çevresinde aktivite gösterebilmesi için yeterli miktarda su kalır ve su miktarının artmasıyla protein esnekliği ve enzim aktivitesi artar. Doğal inorganik bir madde olan selitin su tutma kapasitesi düşüktür. Bu nedenle lipaz enziminin adsorpsiyon yöntemiyle immobilizasyonunda, selit üzerinde en fazla çalışılmış olan taşıyıcılardan biridir [33-48]. Aşağıda selitle yürütölmüş çalışmalar özetlenmeye çalışılmıştır.

Selit üzerine yapılmış bir çalışmada, *Candida rugosa* lipazının adsorbe edilmesiyle, enzimin optimum pH' ının 7 den 6,5' e düştüğü buna karşılık optimum sıcaklığının 40 °C' dan 45 °C' ye yükseldiği tespit edilmiş ve bu immobilize enzimin zeytinyağı hidrolizinde kullanılabileceği ancak tekrarlı olarak enzimin kullanılamadığı belirlenmiştir [33].

Basri ve arkadaşları, aynı lipazın selit, Amberlite XAD7 ve PMMA (polimetil metakrilat) üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişler ve bu üç immobilize örneğın yağ asitlerinin esterleşme reaksiyonundaki performansını karşılaştırmışlardır.

Selitle hazırlanmış immobilize enzimin diğerlerine göre daha yüksek aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmışlardır [34].

Benzer şekilde *Rhizopus niveus* lipazının selitin Celite 560, Filtercel, Hyflo supercel ve Celite 545 gibi değişik ticari tipleri üzerine adsorpsiyonu incelenmiş ve elde edilen tüm immobilize lipaz örneklerinin yağların hidroliz ve interesterifikasyon reaksiyonlarında daha aktif oldukları saptanmıştır[35-37].

Rosu ve arkadaşlarının bir çalışmasında ise, *Pseudomonas sp* lipazı kalsiyum karbonat, kalsiyum sülfat, kalsiyum pirofosfat ve selit üzerine fiziksel adsorpsiyonla immobilize edilmiştir. Araştırmacılar daha sonra elde ettikleri bu immobilize enzimlerle katı faz gliseroliz reaksiyonları yürütmüşlerdir. En iyi dönüşümün kalsiyum karbonat taşıyıcısına adsorplanmış lipaz ile sağlanabildiğini, kalsiyum karbonat ve selit taşıyıcılı lipazların bu reaksiyonda 6 kez tekrarlı kullanılabildiğini beyan etmişlerdir [38].

Khare ve Nakajima'nın *Rhizopus japonicus* lipazı ile yürüttükleri immobilizasyon çalışmasında, serbest enzimin transesterifikasyon aktivitesi yokken bu lipazın selit üzerine adsorplanmasıyla enzimin hekzanlı ortamda transesterifikasyon aktivitesi gösterdiği ve bu immobilize lipaz ile soya yağına % 25 oranında Dokosahekzaenoik asitin katılabildiği açıklanmıştır [39].

Lipaz stabilizasyonu amacıyla yapılan diğer bir çalışmada, vinilesterlere uygulanan açıl transfer reaksiyonunun bir yan ürünü olan astaldehitin neden olduğu inaktivasyona karşı korunmak için *Candida rugosa* lipazı Selit 545 üzerine immobilize edilmiştir. Bu yolla enzimin stabilizasyonunun sağlanmasının yanı sıra enantioseçiciliğinin üç kat arttığı bulunmuştur [40].

Literatürde yapılmış çalışmaların bir kısmında immobilize enzimlerin stabiliteleri incelenmiştir. Triantafylou ve çalışma arkadaşları *Chromobacterium viscosum* ve *Candida rugosa* lipazlarının selit üzerine immobilizasyonunda, immobilize enzimlerin aktivitelerine ve stabilitelerine sorbitol ilavesinin etkisini incelemişlerdir. Selit üzerine az miktarda protein adsorbe olduğu durumlarda sorbitol ilavesinin lipazın aktivite kaybetmesini önlediğini belirtmişlerdir [41]. Benzer çalışma Wehtje ve arkadaşları tarafından yürütülmüş olup bu araştırmacılar da immobilizasyon ortamına albumin, jelatin ve kazein gibi proteinlerin ve poli etilen glikolün

ilavesinin, selite bağlanan enzim miktarının çok düşük olması halinde dahi enzimin aktivite kaybını azalttığını saptamışlardır [42].

Wang ve arkadaşlarının güncel bir çalışmasında, 3 ayrı lipaz kullanarak selit ve bazı tuz bileşiklerinin taşıyıcı olarak denendiği denemeler sonucunda, hekzan ortamında yürütülmüş transesterifikasyon reaksiyonunda EDTA-Sodyum tuzuna adsorplanmış *Candida rugosa* , *Candida sp* ve *Pseudomonas sp* enzimlerinin transesterifikasyon aktivitelerinin sırasıyla % 463, % 2700 ve % 1215 artmış olduğunu tespit etmişlerdir [43].

Adsorpsiyon yolu ile lipaz enziminin immobilizasyonunun yapıldığı bazı çalışmalarda, moleküler adsorpsiyonun yanında enzimin taşıyıcı üzerine çözücü ortamında çökmeye zorlanarak bağlatıldığı görülmüştür. Bu amaçla en fazla kullanılan çözücüler aseton ve hekzandır. İmmobilizasyon işleminin çözücü ortamında gerçekleştirilmesi, kullanım koşullarında immobilizasyon stabilitesini arttırmıştır. Organik çözücülerin enzim aktivitesi ve stabilitesine olan etkisi, çözücünün polaritesine bağlı olarak enzimin çevresinden suyun uzaklaştırılması; sulu ve organik faz arasında substrat ve ürün dağılım oranını etkilemesi nedeniyle reaksiyon hızının değişmesi ile açıklanabilir. Hekzan gibi polaritesi düşük olan çözücüler (log P= 3.5) varlığında gerçekleştirilen immobilizasyon işlemlerinde enzimin katalitik aktivitesi daha iyi korunmaktadır. Bunun yanı sıra su ile karışan hidrofilik çözücüler (dimetilformamid, dimetilsulfoksit, alkoller, aseton) varlığında gerçekleştirilen immobilizasyon işlemi sırasında, enzimin aktivitesi için gerekli olan suyu enzim çevresinden hekzanlı ortama nazaran çok daha fazla uzaklaştırmış olmasından dolayı enzim aktivitesinde relatif olarak bir miktar kayıp olmaktadır [44-45].

Asetonlu ortamda selit üzerine sulu ortama nazaran daha fazla enzim adsorplanabildiği ve bu enzimlerin yağların interesterifikasyon reaksiyonlarında daha etkin aktivite gösterdikleri belirlenmiştir [46-47]. İmmobilizasyonda kullanılan taşıyıcının ve ortamın enzim aktivitesine etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada selit ve hidrofilik zeolit üzerine *Candida cylindracea* lipazı aseton ile çöktürme metodu ile immobilize edilmiştir. Selit üzerine immobilize edilen enzimin hidroliz

reaksiyonunda yüksek aktivite gösterdiği, hidrofilik zeolit üzerine immobilize edilen enzimin ise esterleşme reaksiyonunda yüksek aktivite gösterdiği bulunmuştur [48].

Castro ve çalışma grubu hekzan ortamında birkaç inorganik taşıyıcı (silika, niobium oksit ve zirkonyum fosfat) üzerine *Candida rugosa* lipazının çöktürme yolu ile immobilizasyonunda, zirkonyum fosfat ile % 86 immobilizasyon verimi elde ettiklerini ve immobilizasyonda aktivite kazanımının % 34' e eriştiğini tespit etmişlerdir [49]. Aynı grup diğer bir çalışmada ise, yine hekzanlı ortamda bu kez Çitosan taşıyıcısı kullanarak aynı enzimin immobilizasyonu incelemişlerdir. İmmobilize *Candida rugosa* lipazının optimum sıcaklığının 37 °C' den 50 °C' ye yükseldiğini, immobilize enzimin Km ve Vmax değerlerinin serbest enzime göre biraz düştüğünü buna karşılık 55 °C' de yarılanma zamanının 43 dakikadan 66 dakikaya arttığını tespit etmişlerdir [50].

Adsorpsiyon ile lipaz immobilizasyonunda denenen diğer taşıyıcılar, pirinç kabukları [51, 52], selüloz [53], yumurta kabuğu [54], cam bazlı taşıyıcılar (AP-685, ALD-610) [55], seramik taşıyıcılar [56], diatome toprağı [57], alümina [58], silika [59, 60], hidrofilik poliüretan köpüğü [61] ve zeolitler [62] 'dir. Tüm bu taşıyıcıları denendiği çalışmalarda, immobilize lipazların organik solventlerde aktivite ve stabilite gösterdiği belirtilmektedir.

2.3.1.2 Hidrofobik Taşıyıcıya Lipaz Adsorpsiyonu

Lipazlar, hidrofobik arayüzeylerin varlığında (substrat misellerin, apolar organik çözücülerin) aktivite gösterirler. Hidrofobik arayüzeylerin olmaması durumunda lipazın sahip olduğu bazı ikincil yapılar aktif bölgeyi kapatır ve substratın ulaşmasını engeller. Hidrofobik arayüzeylerin varlığında önemli konformasyonel değişimler meydana gelir ve “açık yapı” denilen yapı oluşur. Bu özelliği nedeniyle lipaz katalitik bölgesini çevreleyen geniş hidrofobik yüzeyi ile hidrofobik arayüzeylere kuvvetli bir şekilde adsorplanır. Bu yöntem kullanılarak bazı lipazların hidrofobik taşıyıcılar üzerine adsorplanmasıyla ortamdaki diğer protein gruplarından ayrılması sağlanmış ve böylece saflaştırılmıştır [63, 64].

Deneyssel olarak hidrofobik taşıyıcıya fiziksel adsorpsiyonda, izlenen yol bakımından hidrofilik taşıyıcıya adsorpsiyon ile aynıdır. Katı toz taşıyıcı önce genellikle su-

etanol karışımında dağıtılır, vakum altında hava kabarcıkları giderilir, kolona doldurulur. Kolondaki hidrofobik taşıyıcı üzerinden sırasıyla su, tampon çözelti ve lipaz çözeltisi geçirilerek lipazın adsorplanması sağlanır.

Üzerinde çalışılmış olan hidrofobik taşıyıcılar, polipropilen [65-73], polietilen [74], polistiren-divinil benzen [75, 76], selüloz [77], gözenek-kontrollü cam [78, 79], hidrofobik zeolit [80], hidrofobik Fractogel [81] ve benzerleridir.

Hidrofobik taşıyıcılar arasında üzerinde en fazla çalışılan taşıyıcılardan biri polipropilendir. Bu taşıyıcı kullanılarak yürütülmüş çalışmalardan aşağıda birkaç örnek verilmiştir:

Aspergillus niger kökenli lipaz içeren ham protein karışımından, protein hollow-fiber polipropilen membran üzerine altı değişik sıcaklıkta adsorbsiyonu etraflıca incelenmiştir. Lipazın protein karışımından seçici olarak membran üzerine adsorbe olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada adsorplanan lipazın Langmuir adsorpsiyon modeline uyduğu belirlenmiş ve adsorpsiyon sabitleri de saptanmıştır [66].

Pseudomonas cepacia lipazının mikro gözenekli polipropilen taşıyıcıya immobilize edildiği diğer bir çalışma da ise, gözenek içindeki enzime substratın ulaşmasındaki güçlükler nedeniyle immobilizasyon sonrası enzim aktivitesinde epey düşme olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ayrıca suda çözünen ve çözünmeyen substratın enzim aktivitesine olan etkisi de incelenmiştir. Suda çözünmeyen substrat (p-nitrofenilpalmitat) kullanıldığında aktivitenin, suda çözünen p-nitrofenilasetat'a göre daha düşük olduğu bulunmuştur [72].

Bosley ve çalışma arkadaşları makrogözenekli polipropilen taşıyıcı üzerine fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle lipaz immobilizasyonda, yüksek ve düşük yükleme oranlarının hidroliz ve esterleşme aktivitesine etkisini incelemişlerdir. Taşıyıcıya adsorbe olan enzim miktarına göre enzimin aktivitenin değiştiği tespit edilmiştir. Araştırmacılara göre, adsorbe olan enzim miktarı az olduğunda enzim gözenek içerisinde geniş bir yüzey alanında hareket edebilmektedir, enzim bu alanda yüzeyle olan temasını arttırmak ister ve bunun sonucunda üç boyutlu yapısında değişme meydana gelir ve bu da aktivite kaybına neden olur. Yüksek adsorpsiyon oranlarında ise enzimin hareket alanının sınırlanması nedeniyle enzim yapısal açılma yapamaz ve dolayısıyla enzimin aktivite kaybı azalır[73].

2.3.2 Diğer İmmobilizasyon Yöntemleri ile Lipaz İmmobilizasyonu Üzerinde Yapılmış Çalışmalar

Bu bölümde, literatürde yeralan lipaz enzimlerinin kovalent bağlama, çapraz bağlama, iyonik bağlama ve kapsülleme yolu ile immobilizasyonunun incelendiği çalışmalardan birkaç örnek verilmiştir.

Candida cylindracea lipazının triklorotriazin ile aktive edilmiş alumina, silika ve cam kürecikler gibi inorganik bazı taşıyıcılara kovalent bağla immobilizasyonunun incelendiği iki çalışmada, enzim-taşıyıcı bağlantısının mekanizması üzerinde durulmuştur. Araştırmacılara göre enzimin yirmi iki lizin yan grubu vardır ve bunlar molekülün dış yüzeyinde bulunmaktadır. Bu nedenle bağlanmanın lisinin ϵ -amino grupları üzerinden gerçekleşmiş olması olasılığı yüksektir. Kovalent bağlama yoluyla immobilizasyonun taşıyıcının yapısal özelliklerine değil sadece taşıyıcının aktive edilme derecesine bağlı olduğunun ortaya konduğu bu çalışmalarda, ilave edilen enzim miktarına bağlı olmaksızın her bir taşıyıcı için adsorbe olan enzim miktarının birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. İlave edilen enzim miktarının artmasıyla taşıyıcıların hepsinin fiziksel özelliklerinin farklı olmasına rağmen, adsorbe olan miktarın aynı oranda artığı gözlemlenmiştir [82, 83].

Porcine pancreas lipazının katalitik özelliklerini iyileştirmek ve stabilitesini arttırmak için yapılmış olan diğer bir çalışmada, lipaz poliakrilamid küreciklerine glutaralaldehid veya difloronitrobenzen ile çapraz bağlandığında lipazın katalitik aktivitesinde bir miktar düşme görülmüş ancak ısı ve üreye karşı serbest enzime oranla daha stabil hale geldiği [84].

Warmuth ve arkadaşları, *Staphylococcus carnosus* dan elde edilen bakteriyel lipaza stabilite kazandırmak amacıyla, enzimi hidrofobik bir adsorban olan Eupergit' e glutaralaldehit ile çapraz bağlanmışlardır. Bu sayede enzimin hem taşıyıcıdan desorpsiyonun önlendiğini hem de operasyon stabilitesinin arttığını tespit etmişlerdir [85].

Gandhi ve çalışma grubunun *Mucor miehei* lipazının iyon değiştirici reçineler üzerine iyonik bağlanması ile yürüttükleri çalışmada, Indion-850 (stiren-divinilbenzen polimer reçinesi) kullanılmış ve enzimin immobilizasyonu sonucunda aktivitesinin serbest enzime göre 1.4 kat daha arttığı bulunmuştur [86].

Tutuklama yöntemiyle lipaz immobilizasyonu üzerine yapılmış çalışmalarda, poliakrilamid jel, ürean polimerlerinin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Tutuklama için kullanılan bir metodda monomer çözeltisini ve lipaz çözeltisini içeren karışımın dondurulması ve sonra polimerizasyonun gama ışınlarını kullanarak başlatılması ile yapılmıştır. Tutuklama için kullanılan reçine hidrofobik olduğunda lipaz daha yüksek aktivite göstermiştir. Bu yöntemin en büyük sakıncası ise reçineden dışarıya kütle transferi sınırlaması olduğu belirtilmiştir [67].

Mikroenkapsülasyon yöntemi ise tutuklamaya benzer ancak küçük katı kapsül veya tanelerin oluşturulmasına dayanır. Bazı mikrobiyal lipazların ve porsin pankreatik lipazının bu yöntemle immobilize edildiğinde haftalarca kararlı kalabildiği belirtilmektedir. Ancak büyük moleküllü olan substratın kapsülün duvarından geçme zorluğu nedeniyle, bu sistemlerde lipazın aktivite göstermesinin zor olduğu yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir [67].

2.4 İmmobilize Lipaz Enzimlerinin Teknolojik Uygulamaları

Lipaz enzimleri özellikle yağların modifikasyonlarında, yağlardan polidoymamış yağ asitlerinin ve diğer yağ kimyasallarının eldesinde; gıda sanayiinde; şeker esterlerinin ve konvansiyonel olarak sentezlenemiyen bazı amino asit türevlerinin üretiminde; ilaç sanayiinde öneme haiz bazı rasemik bileşiklerin resolüsyonunda; deterjan, kozmetik ve parfümeri sanayiinde kullanılan önemli endüstriyel enzimlerden biridir [87, 88].

İmmobilize lipazlar bitkisel ve hayvansal yağlardan hidroliz, esterleşme, inter ve transesterifikasyon yolu ile istenilen özelliklere sahip özellikle “structured lipids” denilen sınıf bileşiklerin, margarin veya diğer önemli yağ ürünlerinin üretiminde başarı ile kullanılmaktadır. Bu alanda çalışmalar hızla artmaktadır [89-105].

Lipaz enzimleri ile kimyasal sentez yöntemleri ile kolay ve saf olarak elde edilemeyen “Fine chemicals” diye adlandırılan bileşikler, örneğin bixin [106, 107], antioksidanlar [108], isoamilasetat [109], gıda sanayiinde tad veren düşük molekül ağırlıklı esterler ve terpen ve flavonoid sınıfı bileşikler [110-112], vakslar [113] ve yine gıda sanayiinde emülgatör olarak son yıllarda kullanılmaya başlanan yağ

asitlerinin karbonhidratlarla yapmış oldukları çeşitli şeker esterleri [114], enzimatik yolla yüksek verimle elde edilebilmektedir.

İlaç sanayiinde kullanılan bir çok ilacın formülünde rasemik bileşikler bulunmakta olup, genellikle bu tür bileşiklerde izomerlerden biri etkin rol oynamakta diğlerinin ise yan etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle ABD’ de bu tür ilaçların kullanımı yasaklanmıştır. Sadece etkin olan izomeri içeren ilaçların sentezine geçilmiştir. Bilindiği üzere kimyasal yöntemlerle sadece rasemik bileşikler üretilebilmekte ve enantiomerlerin birbirlerinden ayrılması kimyasal yöntemlerle çok zahmetli ve düşük verimli olmaktadır. Lipazların enantioseçiciliği göstermesi enzimatik yolla bu tür bileşiklerin sentezine imkan sağlamıştır. Naproxen , diltiazem gibi tanınan ilaçların şindiden endüstriyel üretimleri enzimatik yolla yapılmakta ve alanda çalışmalar devam etmektedir [115-120].

Lipaz enzimlerinin pozisyon ve yağ asiti seçiciliği göstermesi, yine konvansiyonel kimyasal yöntemlerle bitkisel yağlardan elde edilemeyen polidoymamış yağ asitlerince zengin ürünlerin enzimatik yoldan üretiminin yapılır olmasına olanak sağlamıştır. Lipazlar kullanılarak polidoymamış yağ asitlerini zenginleştirmek için yapılmış çalışmalar iki grup altında toplanmıştır. Birinci grupta balık yağlarından n-3 sınıfı Eikosapentaenoik asit (EPA) ve Dokosahekzaenoik asit (DHA)’ nın zenginleştirilmesi, ikinci grupta ise ise Boraj, frenk üzümü ve evening primrose bitkileri tohumlarında bulunan n-6 sınıfı γ -linolenik asit (GLA)’ nın zenginleştirilmesi üzerine yapılmış güncel çalışmalar açıklanmaya çalışılmıştır.

Balık yağlarında yüksek oranda bulunan n-3 sınıfı doymamış yağ asitlerinin, arteriosiklerosis ve miyokardiak enfaktüs gibi kardiovasküler sorunları önleyici ve tedavi edici etkilerinin saptanması ile son 15 yılda çalışmalar balık yağları üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, polidoymamış balık yağı yağ asitlerinin, özellikle EPA ve DHA’ nın kalp hastalıkları yanında bazı önemli enfeksiyon hastalıkları ile bağışıklık sistemi bozukluklarının tedavisinde etkin rol oynadığı klinik olarak belirlenmesi ile balık yağlarının farmasotik ve gıda alanında önemi bir kat daha artmıştır. Balık yağlarının bileşimi dolayısıyla konvansiyonel yoldan elde edilemeyen polidoymamış yağ asitleri lipaz enzimleri sayesinde enzimatik olarak zenginleştirilmiş ürünler halinde üretilebilmiştir. Çeşitli balık yağlarına çeşitli lipaz türleri vasıtasıyla hidroliz, esterleştirme, interesterleştirme

reaksiyonları tatbik edilerek, balık yağlarında genel olarak % 25-30 oranında bulunan EPA ve DHA enzimatik işlemler sonucunda % 40-50 civarında polidoymamış yağ asitleri içeren ürünler elde edilebilmiştir [121-130].

2.4.1 GLA İçeren Yağlardan GLA'in Zenginleştirilmesi Üzerinde Yapılmış Çalışmalar

Günümüzde, γ -linolenik asitin besin ve tıbbi açıdan değerinin anlaşılması bu asitin 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 [131, 132], Y-zeolitleri [133] veya silikajel [134] üzerinde ayrılma, yağ vinterezasyonu [135] 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 [136], *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 [137], 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 saptamıştır. 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 [138], 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 gösterdiğini de ortaya konmuştur.

Schmitt ve arkadaşlarının yürüttükleri benzer esterleşme reaksiyonunda ise [139], boraj yağı yağ asitlerinin bu kez immobilize *Candida rugosa* lipazı ile GLA' cc 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 gamma-linolenik asitin zor hidrolize olduğunu ve hidroliz olmayan ester fraksiyonunda bu asitin derişikleştğini göstermişlerdir [140].

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* [141] veya *Pseudomonas* sp.[142] 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 [142, 143].

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 [144], esterleşmede ise Lipozim IM-20 ve IM-60 enzimlerini (*Rhizomucor miehei*) [145, 146] 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 faydalarını 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 [147, 148]. Son yıllarda n-3 ve n-6 poli doymamış yağ asitlerinin ayrı ayrı 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 inkorpore edildiği ve böylece n-3 polidoymamış yağ asitlerinin n-6 poli doymamış yağ asitlerine oranı 0,42-0,62 arasında değişen besin değeri çok yüksek yağlar oluşturulduğu görülmektedir [149-153].

Yukarıda açıklanan çalışmalarının hepsinde ticari mikrobial enzimler ve Evening primrose ile Boraj yağı kullanılmıştır. Diğer kaynaklardan GLA zenginleştirilmesi üzerine az sayıda çalışma bulunmaktadır. Frenk üzümü yağı [154] ve küflerden elde edilen yağlardan [155, 156] 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 [157, 158] ve Vernonia [159] tohumlarından elde edilmiş lipazların γ -linolenik asite negatif seçicilik gösterdiği tespit edilmiştir.

2.5 Çörekotu Bitkisi, Tohumları ve Lipazı Hakkında Genel Bilgi

2.5.1 Çörekotu Bitkisi ve Tohumları

Latince Semen Nigella, Almanca Schwarzkümmel, 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 antibakterial ve terapik etkilerinden dolayı, idrar söktürücü, gaz giderici olarak kullanımı yaygındır. Yakın doğu ve Hindistan'da baharat olarak da tüketilmektedir [160].

Çörekotu, Haziran-Temmuz ayları arasında yeşil-açık mavi renkli çiçekler aan, 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 gözükür. Stilus 5 tane ve uzunca gaga görünümlüdedir. Meyva, içi tohum dolu şişkin bir kapsül şeklindeyir. 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 [160].

2.5.2 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 [161-162]. 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 [161]. Daha sonra bu enzimin tohumlardan ekstraksiyonunda optimum ekstraksiyon koşulları belirlenmiş [162], karakterizasyonu ve şekerler ile polietilen bileşikleri ortamında stabilizasyonu incelenmiştir [163,164]. Çörekotu lipazının immobilizasyonu üzerinde yürütülmüş çalışmalarda ise enzimin selit üzerine adsorpsiyonda ortam pH' ının etkisi ve adsorpsiyon mekanizması açıklığa kavuşturulmuştur [165].

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 [166], kullanılmış yağ hidrolizinde ise enzim olarak öğütülmüş veya preslenmiş çörekotu tohumların direkt olarak kullanımıyla veya aseton tozu olarak çökertilmiş enzimin ilavesinin fark etmediği, her üç formda lipaz enzimiyle % 95 gibi yüksek hidroliz derecesine ulaşıldığı tespit edilmiştir [167-169].

Oleik asit ile metanolün esterleştirilmesinde, 45 °C' de metanol:yağ oranının 1:1,5 olması durumunda, toplam ağırlığın % 50' si kadar preslenmiş çörekotu tohumlarının kullanılması ile % 50 verimle ester elde edilebilmiştir [168]. Preslenmiş tohumların, gliserin ile oleik asitin esterleştirilmesinde de etkin katalizör etkisi göstermiştir. Gliserin: oleik asit oranının 4:1 olması durumunda, 45 °C de ve % 45 tohum kullanımında, elde edilen ester karışımında % 16 triolein, % 37 diolein ve % 31 monoolein oluştuğubelirlenmiştir. Reaksiyonda sıcaklığın 55 °C çıkarılması ve reaktanların stokiometrik oranda kullanılmasıyla triolein miktarının % 82 ye yükseldiği de araştırmacılar tarafından belirlenmiştir [170].

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 [170].

Dandik ve Aksoy [171], çörekotu lipazını aseton tozu formunda kullanarak da kızartma yağının gliseroliz reaksiyonunu gerçekleştirmeye muvaffak olmuşlardır.

TÜBİTAK ile CNR (İtalya Ulusal Araştırma Kurumu) arasında yürütölen ve halen tamamlanan ortak projede ise, çörekotu tohumlarından lipaz ekstraksiyonunda optimum koşulların belirlenmesi; enzimin amonyum sülfat ile çöktürölmesiyle 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 [172].



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 kullanılmıştır. Tohumların kimyasal bileşimi (yağ, protein, nem, kül ve ham elyaf içeriği) standart AOCS (American Oil Chemists'Society) yöntemlerine göre belirlenmiştir [173]. Aşağıda uygulanan bu yöntemler hakkında açıklayıcı özet bilgiler verilmiştir.

Çörekotu tohumlarının nemi 105°C' de sabit tartıma kadar kurutma sonrası kütle kaybından; kül yüzdesi ise tohumların 600°C' de 16 saat yakılması sonucu elde edilen bakiye üzerinden hesaplanmıştır. Kül komponentlerinin 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 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çörekotu lipaz enziminin immobilizasyonu ve müteakip karakterizasyonunun incelendiği bu çalışmada, önce tohumlardan fosfat tampon çözeltisi (pH 7,2) ile lipaz enziminin ekstraksiyonu yapılmıştır. Fosfat tampon çözeltisi (pH 7,2), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (1/15 mol/L) stok çözeltisi ile disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (1/15 mol/L) stok çözeltisinin karışımı ile hazırlanmıştır.

Lipaz adsorpsiyonuna pH etkisinin incelenmesinde kullanılan fosfat tampon çözeltileri (pH 5, 6, 7 ve 8) yine yukarıda açıklanan fosfat stok çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır.

Çörekotu tohumlarının analizinde ve elde edilen ham lipaz ekstraktlarının aktivitelerinin saptanmasında kullanılan çözücüler ve kimyasal maddeler Merck firmasının saf ürünleridir. Lipaz ekstraktlarının protein içeriklerinin belirlenmesinde Randox Total Protein Reaktifi kullanılmış olup Randox Lab. Ltd. (Antrim, İngiltere)’den temin edilmiştir.

Lipaz enziminin adsorpsiyonunda kullanılan selit (Celite 535) Fluka Chemika Biochemika (Buchs, İsviçre)’dan temin edilmiştir. Selit, 2 saat süre 80°C’ de ısıtıldıktan sonra deneylerde kullanılmıştır. Kullanılan selit’e ait spesifikasyonlar aşağıda verilmiştir (Değerler direkt prospektüsten alınmış olup, analiz edilmemiştir).

Selit 535 Spesifikasyonu

Kimyasal Bileşimi:	% 88,9	SiO ₂	Dansitesi (g/L)	: 264
	% 2,6	Al ₂ O ₃	Yakma kaybı (%)	: 1,0
	% 3,25	Fe ₂ O ₃	pH değeri (max.)	: 10
	% 0,39	TiO ₂		
	% 1,09	CaO		
	% 0,53	MgO		
	% 2,57	Na ₂ O/K ₂ O		

Hazırlanan immobilize lipaz enziminin karakteristik özelliklerinin (aktivitesinin, kinetik parametrelerinin, inaktivasyonunun) belirlenmesinde kullanılmış tüm kimyasal maddeler yine analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. İmmobilize enzimin substrat ve yağ asiti seçiciliğinin araştırılmasında ise kullanılan yağlar, Ayçiçek, Soya, Pamuk Çekirdeği, Hint tohumu, Domuz (Lard), Balık (Menhaden) ve Boraj (Borage) Sigma Firması (Buchs, İsviçre)'nden özel olarak getirtilmiştir.

3.2 Çalışma Yöntemi

3.2.1 Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu

Çörekotu tohumlarından lipaz ekstraktının eldesinde önce, analizlerde özellikle protein analizinde sorun yaratan, siyah renkli tohum kabuklarının giderilmesi yapılmıştır. Bunun için 40 gr tohum, distile su içerisinde karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiş ve sonrasında yumuşamış kabuklar tamamıyla soyulana kadar distile su ile yıkanmıştır.

Kabuksuz, sarı renkli tohumlar 1 litre hacmindeki blenderda (Braun, MX 82 Model, Frankfurt, Almanya) 4°C' ye soğutulmuş 200 mL 0.06 M fosfat tamponu (pH 7.2) içerisinde homojenize edilmiştir. Karıştırma yüksek devirde toplam 20 dakika sürdürülmüş ve karıştırma esnasında sıcaklığın 25°C' yi geçmemesine dikkat edilmiştir. Elde edilen homojenat, katı partiküllerin uzaklaştırılması için iki katlı tülbentten süzölmüştür.

Homojenat içerisinde dağılmış yağ partikülleri ile selüloz, lignin liflerinin ayrılması için, homojenat 13 000 g (10 000 devirde) 30 dakika de santrifüjlenmiştir. Yüzeyde toplanan kabuk şeklindeki yağlı katı tabaka spatula ile dikkatlice alındıktan sonra çözelti bir kez daha tülbentten süzölmüştür. Böylece elde edilen bu çözelti, çalışmamızda “Lipaz Ekstraktı” olarak adlandırılmıştır. Lipaz ekstraktının hacmi okunmuş, protein içeriği ile lipaz aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.2 Lipaz Ekstraktlarının Protein İçeriklerinin Belirlenmesi

Lipaz ekstraktlarının protein içeriği, Biüret yöntemine göre [174] Randox Total Protein Reaktifi kullanımı ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

0,5 mL lipaz çözeltisi (0-3 mg protein içeren) üzerine 2,5 mL biüret reaktifi katılmış, 30 dakika 25°C’de bekletildikten sonra numunenin 546 nm dalga boyundaki absorbansı okunmuştur.

Bovine albumin standardı protein kalibrasyon eğrisinin çıkarılması için kullanılmıştır. Mililitresinde 1-6 mg albumin bulunacak şekilde hazırlanmış bir seri albumin çözeltisinin okunan absorbans değerlerinden, protein miktarı ile okunan absorbans değerleri arasındaki lineer bağıntının matematiksel eşitliği bulunmuştur. Elde edilen bu eşitlik :

$$P = 11,428 A - 0,0244' \text{ dir.} \quad (3.1)$$

Burada,

P = Numunenin protein içeriği (mg/0,5 mL)

A = Okunan absorbans değeri’ dir.

Bu eşitliğin geçerli olduğu absorbans aralığı (0,214-0,03) olarak belirlenmiştir. Ancak adsorpsiyon deneylerine başlandığında, lipaz enziminin adsorpsiyon izotermelerinin çıkarılması için, düşük başlangıç protein konsantrasyonlarında çalışılma durumunda, dengedeki protein miktarlarının belirlenmesinde çözeltilerden alınan örneklerin okunan absorbans değerlerinin eşitliğin geçerli olduğu aralığın altında olduğu görölmüştür. Bu durumu düzeltmek ve gerçek protein içeriklerini saptamak için, albumin standardı kullanarak çok düşük konsantrasyonlar için bir seri kalibrasyon deneyleri daha yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda absorbans değerleri

0,03-0,006 arasında olan numuneler için geçerli olacak düzeltme faktörleri saptanmıştır. Bu düzeltme faktörleri Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.2 Protein tayininde absorbans değerleri 0,03-0,006 arasında olan numuneler için kullanılması gereken düzeltme faktörleri.

Okunan Absorbans	Düzeltilme Faktörü
0,006	2,50
0,007	2,14
0,008	1,94
0,009	1,80
0,0010	1,67
0,0011	1,58
0,0012	1,43
0,0013	1,40
0,0014	1,39
0,0015	1,32
0,0016	1,27
0,0017	1,24
0,0018	1,22
0,0019	1,19
0,0020	1,18
0,0021	1,16
0,0022	1,15
0,0023	1,13
0,0024	1,12
0,0025	1,11
0,0026	1,10
0,0027	1,09
0,0028	1,08
0,0029	1,07
0,0030	1,07

3.2.3 Lipaz Preparatlarının (Ekstrakt ve İmmobilize Örneklerin) Hidroliz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Lipaz preparatlarının spesifik aktivitesi, 1 mg enzim proteini 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 CaCl_2 çözeltisi, 3 mL fosfat tampon çözeltisi (0,06 M; pH 7) ve 5 mL distile su karışımı önce, çalkalayıcılı su banyosunda 10 dak. 37 °C de karıştırılmıştır. Böylece reaktanların sıcaklığı 37 °C' ye getirilmiştir. Daha sonra bu karışıma, 1mL serbest enzim (lipaz ekstraktı) veya immobilize enzim (400-500 mg) ilave edilmiş ve 20 dakika daha aynı sıcaklıkta karışım çalkalanmıştır. Süre sonunda, bu karışıma 20 mL aseton-etilalkol karışımı (1:1, hacmen) katılarak enzim inaktive edilmiş ve hidroliz reaksiyonu sonucu zeytinyağından açığa çıkan yağ asitlerinin miktarı 0,02 M NaOH ile timolftalein indikatörüne karşı pH 10'a kadar titre edilerek belirlenmiştir. Paralel olarak, aynı koşullarda şahit denemelerde yapılmıştır.

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

$$\text{Spesifik aktivite } (\mu\text{mol} / \text{dak.mg}) = (V_1 - V_2) \cdot C \cdot 1000 / 20 \cdot E \quad (3.2)$$

Burada:

V_1 = Numune için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

V_2 = Şahit için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

C = NaOH konsantrasyonu (mol/L)

E = Numunenin protein içeriği (mg)'dir.

3.2.4 Çörekotu Lipazının Selit Üzerine İmmobilize Edilmesinde Uygulanan Yöntemler

Çörekotu lipazının selit üzerine immobilize edilmesinde 2 ayrı yöntem kullanılmıştır. Uygulanan 1. yöntemde lipaz enziminin farklı pH daki tampon çözelti ortamlarından

direkt olarak selit üzerine adsorplanması incelenmiştir. Böylece adsorpsiyona, ortam pH'ının ve başlangıç protein konsantrasyonunun etkisi de belirlenmiştir. 2. yöntemde ise adsorpsiyon-çökertme işlemlerinin birlikte oluşması için, adsorpsiyonu müteakiben ortama organik çözücü katılmış ve bir miktar daha enzim proteinlerinin selit üzerine çökmesi sağlanmıştır. İkinci yöntemde çözücü olarak aseton ve hekzan ile paralel deneyler yürütülmüş ve çözücü etkisinin immobilizasyona ve immobilize enzim özelliklerine olan etkisi de saptanmıştır. Uygulanan bu yöntemlere ait çalışma prosedürleri aşağıda verilmiştir.

Enzim Proteinlerinin Adsorpsiyon ile İmmobilizasyonu : Adsorpsiyon deneyleri dijital sıcaklık kontrollü çalkalayıcı su banyosunda 25 °C' de yürütülmüştür. Ağzı kapaklı 250 mL lik erlenlere, içerisinde protein konsantrasyonu 1-6 mg/mL arasında değişecek şekilde ayarlanmış 20 mL tamponlanmış lipaz çözeltileri ve 2 şer gram selit konulduktan sonra, erlenler karıştırıcıya yerleştirilmiş ve 2 saat boyunca çalkalanmıştır. Bu süre sonunda, selitler (immobilize enzim örnekleri) süzölmüş, 3 defa 10 mL distile su ile yıkanmış ve 4 saat 25 °C'da vakum desikatöründe kurutulmuştur. Süzöntüler ise birleştirilmiş ve protein içeriğine bakılmıştır. Selit örneklerine adsorbe olmuş protein miktarı, çözeltideki adsorpsiyon öncesi ve sonrası protein miktarı arasındaki farktan hesaplama yolu ile saptanmıştır.

Yukarıda açıklanan işlemler pH 5, 6, 7 ve 8 fosfat tamponları ortamında en az 2 olmak üzere, genelde 3 paralel deney serisinde tekrarlanmıştır.

Protein adsorpsiyonunun Langmuir ve/veya Freundlich modellerine uygunluğunu araştırmak amacıyla, elde edilen veriler ve aşağıdaki lineerize edilmiş adsorpsiyon denklemleri kullanılarak, sonuçların bu açıdan değerlendirilmesi yapılmış ve modellere ait adsorpsiyon parametreleri de saptanmıştır.

Kullanılan Langmuir denkleminin lineerize edilmiş şekli [66]:

$$C_e / C_{ad} = 1 / C_{max} K_p + (1 / C_{max}) C_e \quad (3.3)$$

Burada,

C_e : Dengedeki lipaz çözeltisinin protein konsantrasyonu (mg protein/mL)

C_{ad} : Adsorplanan protein konsantrasyonu (mg protein/ g selit)

C_{max} : Adsorplanabilecek en fazla lipaz miktarı (mg protein/g selit)

K_p : Adsorpsiyon denge sabiti (mL/mg protein)'dir.

Kullanılan Freundlich denkleminin lineerize edilmiş şekli [175] :

$$\text{Log } C_{ad} = \text{log } K + n \text{ log } C_e \quad (3.4)$$

Burada,

C_{ad} : Adsorplanan protein konsantrasyonu (mg protein/g selit)

C_e : Dengedeki lipaz çözeltisinin protein konsantrasyonu (mg protein/mL)

K : Taşıyıcının adsorbsiyon kaabiliyetini ifade eden sabit

n : Adsorpsiyon etkinliğini ifade eden sabit'tir.

Enzim Proteinlerinin Adsorpsiyon-Çöktürme Yolu ile İmmobilizasyonu: Bu yöntemde, yukarda açıklaması yapılmış yönteme göre yürütülmüş deneyler sonucunda saptanan optimum adsorpsiyon pH'nda (pH 6) ve optimum enzim konsantrasyonunda (4,9 mg protein/mL) hazırlanmış lipaz çözeltisi ile çalışılmıştır.

Tariflenen bu optimum koşullarda hazırlanmış lipaz çözeltinden, yukarıda açıklanan çalışma koşullarına göre, önce enzim proteinlerinin selit üzerine adsorpsiyonu gerçekleştirildikten sonra, behere 20 mL soğutulmuş (0 °C) aseton veya hekzan ilave edilmiş, karışım soğukta 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra süspansiyon filtre kağıdından süzölmüştür. Elde edilen immobilize enzimler 3x20 mL aynı soğutulmuş çözücü ile yıkandıktan sonra vakum desikatöründe 4 saat 25°C kurutulmuştur. Süzöntüler bir araya toplanmış ve protein içeriği saptanmıştır. Benzer şekilde ortama konulan ve adsorpsiyon-çöktürme sonunda süzöntüde kalan protein miktarlarının farkından, elde edilen immobilize enzimin taşıdığı protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.5 İmmobilize Çörekotu Lipazının İnaktivasyon Kinetiğinin İncelenme Yöntemi

İmmobilize enzim örneklerinin çeşitli sıcaklıklardaki inaktivasyon hız sabitleri ile inaktivasyon için aktivasyon enerjisinin belirlenmesinde, enzimin çalışılan her sıcaklıkta zamana bağlı olarak aktivitesinin değişimi incelenmiştir. Bu amaçla, içerisinde 400 mg enzim bulunan 5 mL distile su, sıcaklığı ayarlanmış (40-60 °C)

etüvde belirli süre (0-150 dakika) ısıtılma tabi tutulmuştur. Belirlenen süre sonunda etüvden çıkarılan çözelti, derhal oda sıcaklığına soğutulmuş ve üzerine 0,5 mL zeytinyağı, 0,5 mL 0,1 M CaCl₂ ve 3 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7) ilave edilmiştir. Karışım 37°C' de 20 dakika çalkalanmış ve Bölüm 3.2.3' de açıklanan aktivite tayinindeki prosedür uygulanarak, belli süre ısıtılma görmüş immobilize enzimlerin mevcut aktiviteleri (A_t) saptanmıştır.

Enzimlerin inaktivasyonu birinci mertebe reaksiyon kinetiğine uygunluk gösterdiğinden, kalan aktivite ile zaman arasındaki bağıntı :

$$\ln (A_t/A_0) = - k_i \cdot t \quad \text{dir.} \quad (3.5)$$

Burada,

A_t : Enzimin ısıtılma sonrası aktivitesi (U/mg)

A₀ : Enzimin başlangıç aktivitesi (U/mg)

k_i : İnaktivasyon hız sabiti (dak⁻¹)

t : Isıtılma süresi (dak)'dır.

Her sıcaklıkta, $\ln (A_t/A_0)$ değerlerinin zamana karşı değişim grafiğinin çizilmesi ile elde edilen doğruların eğimlerinden o sıcaklıklardaki inaktivasyon hız sabitleri bulunmuştur.

İnaktivasyon hız sabitlerinin sıcaklıkla değişimini gösteren Arrhenius eşitliğinin aşağıda verilmiş lineerize formu kullanılarak inaktivasyon aktivasyon enerjisi hesaplanmıştır.

$$\ln (k_i) = \ln A - (E_i / RT) \quad (3.6)$$

Burada,

k_i : İnaktivasyon hız sabiti (dak⁻¹)

E_i : İnaktivasyon aktivasyon enerjisi (J/mol)

R : Gaz sabiti (8,314 J.K⁻¹)

T : Mutlak sıcaklık (K)'dır.

Grafiksel olarak $\ln k_i$ değerlerinin $(1/T)$ ' ye göre değişimi çizilerek, elde edilen doğruların eğimlerinden aktivasyon enerjileri bulunmuştur.

Aynı koşullarda, doğal enziminde (serbest enzim = lipaz ekstraktı) inaktivasyonu incelenmiştir. Doğal enzime ait incelenen her sıcaklıktaki inaktivasyon hız sabitleri ve inaktivasyon aktivasyon enerjisi de belirlenmiştir.

Doğal ve immobilize enzimler için her sıcaklıkta yarılanma ömürleri ($t_{0.5}$) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır :

$$t_{0.5} = 0,692 / k_i \text{ (dak)} \quad (3.7)$$

İmmobilize enzimler için ayrıca her sıcaklıkta hesaplanmış yarılanma ömürleri kullanılarak o sıcaklıktaki stabilizasyon faktörleri (SF) de belirlenmiştir.

$$SF = \text{İmmobilize enzim yarılanma ömrü} / \text{Doğal enzim yarılanma ömrü} \quad (3.8)$$

3.2.6 İmmobilize Çörekotu Lipazının Kinetik Parametrelerinin Belirlenmesinde Uygulanan Yöntem

İmmobilize enzim örneklerinin K_m (görünür Michaelis sabiti) ve V_{max} (görünür maksimum hız) kinetik parametrelerinin belirlenmesinde substrat olarak zeytinyağı kullanılmıştır. 37 °C' de gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarında zeytinyağı konsantrasyonu 20-80 mM arasında değiştirilmiştir. Zeytinyağı konsantrasyonunun başlangıç hidroliz hızına olan etkisi, Michaelis-Menten reaksiyon kinetiğine göre değerlendirilerek enzime ait K_m ve V_{max} değerleri bulunmuştur.

20, 30, 40, 50, 60 ve 80 mM' lük zeytinyağı emülsiyonları, 100 mL lik porsiyonlar halinde, 5 g arap zıncı ve hesaplanan gerekli miktarda zeytinyağının % 0,89' luk NaCl içerisinde karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan emülsiyonlardan 5'er mL alınıp 250 mL lik erlenlere konulmuştur. Erlenlere daha sonra, 3 mL fosfat tampon çözeltisi, 0,5 mL 0,1 M $CaCl_2$ çözeltisi ve 0,5 mL su ilave edilmiş ve sıcaklığı 37 °C' ye ayarlanmış çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. 10 dakika ön ısınmayla tüm reaktanların bu sıcaklığa gelmesi sağlandıktan sonra, erlenlere 400 mg immobilize enzim örnekleri katılmış ve çalkalama işlemine 5 dakika daha devam edilmiştir. Enzimin zeytinyağından açığa çıkardığı yağ asitlerinin miktarı Bölüm

3.2.3.' de açıklanan prosedüre göre saptanmıştır. Paralel olarak her deney için şahit deneyler de yürütülmüştür.

İncelenen her zeytinyağı konsantrasyonu için, başlangıç hidroliz reaksiyon hızı (V_i) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır :

$$\text{Başlangıç Hidroliz Hızı } (V_i) (\mu\text{mol/dak}) = (V_1 - V_2) \cdot C \cdot 1000 / 5 \quad (3.9)$$

Burada,

V_1 : Numune için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

V_2 : Şahit için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

C : NaOH konsantrasyonu (mol/L)

Deneysel olarak belirlenen başlangıç hızlarının zeytinyağı konsantrasyonuna göre değişim eğrisi çizilerek, hidroliz reaksiyonunun Michaelis-Menten [176] kinetiğine uygunluğu kontrol edilmiştir. Daha sonra Lineweaver-Burk [176] eşitliğine göre, $1/V_i$ ile $1/S$ ' in değişimi grafik üzerinde gösterilmiş, elde edilen doğrunun y eksenini kestiği noktadaki $1/V_{\max}$ değeri ile x eksenini kestiği noktadaki $1/K_m$ değeri, grafik üzerinden okunmuştur. Böylece 2 farklı işlemle elde edilmiş immobilize enzim örneklerinin hidroliz kinetik parametreleri saptanmıştır.

Serbest enzim kullanılarak aynı koşullarda deneyler sürdürülmüş ve saptanan kinetik parametrelerin, immobilize enzimler için bulunmuş kinetik parametreler ile mukayesesi yapılmıştır.

3.2.7 İmmobilize Çörekotu Lipazının Hidroliz Aktivasyon Enerjisinin Belirlenme Yöntemi

Hazırlanan immobilize enzim örneklerin zeytinyağı hidroliz reaksiyonunda kullanımı durumunda, sıcaklığın hidroliz başlangıç hızına olan etkisini belirlemek için, 30, 35, 37, 40, 45 ve 50°C' lerde bir seri hidroliz deneyi yürütülmüştür. Bu amaçla, belirlenen sıcaklıkta, içerisinde 0,5 mL zeytinyağı, 0,5 mL 0,1 M CaCl_2 , 5 mL su ve 3 mL fosfat tampon çözeltisi içeren karışım, sıcaklığı belli bir dereceye ayarlanmış çalkalayıcıda 10 dakika karıştırılmıştır. İçerisine 400 mg immobilize enzim ilave edilerek 5 dakika daha karıştırılmaya devam edilmiştir. Bu süre içerisinde

zeytinyağından açığa çıkan yağ asitlerinin miktarı, Bölüm 3.2.3. 'de açıklanan prosedüre göre belirlenmiştir. Bölüm 3.2.6.' da verilen başlangıç hidroliz hızı kullanılarak, her sıcaklık için hidroliz başlangıç hızları hesaplanmıştır.

Sıcaklık ile başlangıç hidroliz hızlarının değişim eğrisi çizilerek, eğri üzerinden immobilize enzim örnekleri için optimum sıcaklık değerleri belirlenmiştir.

Aynı koşullarda lipaz ekstraktı ile yürütülen deneylerden de doğal enzim için optimum sıcaklık değeri bulunmuş ve mukayesesi yapılmıştır. Hidroliz aktivasyon enerjisinin hesaplanmasında ise, başlangıç hidroliz hızlarının sıcaklıkla değişimini veren Arrhenius eşitliğinden faydalanılmıştır.

$$\ln (V_i) = \ln A - (E_A / RT) \quad (3.10)$$

$\ln (V_i)$ değerlerinin $(1/T)$ değerleri ile değişim doğrusunun eğiminden hidroliz aktivasyon enerjisi (E_A) hesaplanmıştır. Doğal enzim ve immobilize enzimlerin hidroliz enerjilerinin birlikte değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.2.8 İmmobilize Çörekotu Lipazının Tekrarlı Kullanımı ile Solvent Ortamında Kullanılabilirliğinin İncelenme Yöntemi

Bu denemelerde, sadece hekzan ile adsorpsiyon-çöktürme yöntemlerine göre hazırlanmış immobilize enzim örneklerinin incelenmesi yapılmıştır.

Tekrarlı Kullanımın Belirlenme Prosedürü : İmmobilize enzim örneklerinin tekrarlı kullanımında, aynı enzim örneği kullanılarak zeytinyağının hidroliz reaksiyonu peş peşe 4 kez tekrarlanmış ve her reaksiyon sonucunda enzimin tekrar aktivitesi saptanmıştır. Böylece enzimin aktivitesinde kayıp olup olmadığı, olduyorsa mertebesi belirlenmiştir. Hidroliz reaksiyonları, tamamiyle aktivite tayininde uygulanan koşullarda gerçekleştirilmiştir. İşleme 5,6 gram (aktivite tayininde kullanılan enzim miktarının 14 katı) immobilize enzimle başlanmış ve aktivite tayininde ortama konan zeytinyağı, tampon çözelti, su, CaCl_2 çözeltisi miktarlarının da 14 katı enzime ilave edilerek reaksiyon 37°C ' de 30 dakika sürdürülmüştür. Reaksiyon sonunda immobilize enzim süzölmüş ve 3×20 mL çöktürmede kullanılan çözücü (hekzan) ile yıkandıktan sonra enzim vakum etüvünde 25°C ' de 4 saat

kurutulmuştur. Aynı koşullarda yine 5,6 gram enzim ile şahit denemelerde paralel olarak sürdürülmüştür.

Kurutulmuş enzimden aktivite tayini için gerekli miktarda örnekler alındıktan sonra, kalan enzimden 4,0 gram alınarak 2. hidroliz reaksiyonuna başlanmış bu sefer reaksiyon ortamına, aktivite tayininde kullanılan reaktifler 10 katı olacak şekilde ilave edilmiş ve reaksiyon aynı koşullarda tekrarlanmıştır. Yine 30 dakika sonunda karışımdan enzim süzülerek alınmış, yıkanmış ve kurutulmuştur. 2. kullanımdan sonra enzimin gösterdiği aktivite tespit edilmiştir. Bir önceki kademede şahit denemede kullanılmış 4,0 gram enzim ile de aynı koşullarda şahit deneye devam edilmiştir.

3. ve 4. hidroliz deneyleri 2,8 ve 1,6 g enzim miktarları ile benzer şekilde tekrarlanmıştır. En son olarak, her reaksiyondan sonra ele geçen enzimlerin aktivite kaybının mertebeleri saptanmış ve kaç kez kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır.

Solvent Ortamında Kullanılabilirliğinin Belirlenme Prosedürü : Deneysel çalışmalar, hekzan ortamında ve hekzanla adsorpsiyon-çöktürme yöntemine göre hazırlanmış immobilize enzim ile yürütülmüştür. 10 mL hekzan-su karışımına 0,5 mL zeytinyağı ve 0,4 gram immobilize katıldıktan sonra, karışım 37 °C' de 20 dakika çalkalanmıştır. Süre sonunda açığa çıkan yağ asitlerinin miktarı yine bilinen aktivite tayin yönteminde uygulanan çalışma prosedürüne göre saptanmıştır. Immobilize enzimin solventli ortamda maksimum reaksiyon vermesi için gerekli su miktarını da saptamak için, hekzana % 3, 5, 7, 10 ve 50 oranında su ilavesiyle ve bunlara ilaveten su ile doyurulmuş hekzan da kullanılarak, 6 ayrı deney yürütülmüş ve reaksiyon için gereken optimum su miktarı da belirlenmiştir.

3.2.9 İmmobilize Çörekotu Lipazının Substrat ve Yağ Asiti Seçiciliğinin Belirlenme Yöntemleri

İmmobilize çörekotu lipazının hidroliz reaksiyonlarında substrat ve yağ asitlerine karşı bir seçicilik gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla, önce 8 farklı bitkisel yağ ile hidroliz deneyleri yürütülmüş ve buradan alınan sonuçlar ışığında, daha sonra Boraj yağı kullanılarak enzimin hidroliz reaksiyonunda gösterdiği yağ asiti

seçiciliğinin daha detaylı incelemesi yapılmıştır. Bu bölümde yapılmış deneylere ait detay aşağıda verilmiştir.

Substrat Seçiciliğinin Belirlenmesinde Uygulanan Çalışma Yöntemi : Deneylerde yağ substraktı olarak 8 farklı bitkisel yağ kullanılmıştır. Seçilen yağlar, zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, boraj yağı (borage oil), pamuk çekirdeği yağı, hint tohumu yağı, domuz yağı (lard oil) ve balık yağı (menhaden oil)'dır. Bu yağlar ile hekzan ortamında adsorpsiyon-çöktürme yöntemine göre hazırlanmış immobilize enzim örneği kullanılarak bir seri hidroliz deneyleri yürütülmüştür. Reaksiyonlar, aktivite tayininde uygulanan koşullarda yapılmış ve bu yağlardan açığa çıkan yağ asitlerinin miktarları aynı prosedüre göre belirlenmiştir. Hidroliz derecelerinin mukayesesi ve yağların gaz kromatografik yağ asitleri bileşimleri gözönünde tutularak ile enzimin substrat seçiciliği hakkında yorum yapılmıştır. Ayrıca serbest enzim kullanılarak aynı koşullarda aynı yağlarla yürütülen deneylerin sonuçları ile immobilize enzimle elde edilmiş sonuçların karşılaştırılmasıyla, immobilizasyonun enzimin seçiciliğine olan etkisi de değerlendirilmiştir.

Yağ Asiti Seçiciliğinin Belirlenmesinde Uygulanan Çalışma Yöntemi : Çörekotu lipaz enziminin, serbest ve immobilize formunun, γ -linolenik asite karşı bir seçiciliğinin olup olmadığını belirlemek için, çörekotu lipazı ile boraj yağının hidrolizi detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Hidroliz reaksiyonu 100 mL' lik cam balonda yürütülmüştür. Balon sıcaklığı ayarlanabilen su banyosuna yerleştirilmiş, banyonun sıcaklığı özel bir ısıtma ünitesi (Framo-Geraetetechnik M22/1 5655, Franz Morat K G, Eisenbach, Almanya) ile $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle sabit tutulmuştur. Immobilize enzim çalışıldığında, balona 2 gram Boraj yağı, 5 mL su, 50 mL hekzan ve gram başına 168 U enzim; serbest enzim ile çalışıldığında ise balona 2 gram boraj yağı ile direkt 55 mL lipaz ekstraktı (335 U) konulmuştur. Karışım magnetik karıştırıcı ile 500 devir hızında karıştırılarak reaksiyon başlatılmıştır ve 77 saat reaksiyona devam edilmiştir. Hidroliz reaksiyonunun yürüyüşü, belirli zaman aralıklarında alınan numunelerin TLC-FID (Thin Layer Chromatography-Flame Ionization Dedector) Iatroscan (Iatron Lab., Inc., Tokyo) cihazında trigliserid (TG), digliserid (DG), monogliserid (MG) ve serbest yağ asitleri yüzde bileşimi saptanarak takip edilmiştir. Bu amaçla alınan numuneler önce 90-100°C' lik bir su banyosunda 15 dakika ısıtılmış, böylece lipaz enziminin inaktive

edilmesi sağlanmış, daha sonra bir santrifüj yardımıyla hidroliz ürünlerinin karışımdan ayrılması sağlanmıştır.

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, rodla enjekte edildikten sonra, rodlar 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 rodlar 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 (serbest yağ asiti) karışımı kullanılarak yapılmıştır.

Hidroliz Ürününün Kolon Kromatografisi ile Fraksiyonlanması : Boraj yağının hidrolizinde elde edilen hidroliz ürününde hangi fraksiyonda γ-linolenik asitin zenginleştiğini belirlemek için, hidroliz ürünü kolon kromatografisi [147] 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 kolona 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 toplanan her porsiyondan alınmış örnekler tatbik edildikten sonra, tabakalar hekzan:dietil eter:asetik asit (70:30:1, hacmen) çözücü sisteminde developpe edilmiştir. İyot buharları ortamında tabaka üzerinde ayrılmış TG, DG ve MG spotlarının belirlenmesi yapılmıştır. Toplanan tüm fraksiyonların TLC incelemesi yapıldıktan sonra saf TG, DG veya MG içeren fraksiyonlar birleştirilmiş, solventleri döner evaporatörde uçurulmuş ve böylece saf olarak gliserid bileşikleri elde edilmiştir.

Hidroliz ürününden yağ asitlerini ayırmak için, üründen alınmış diğer bir örnek hekzan içerisinde çözüldükten sonra 0,5 N NaOH ile titre edilmiş, sulu faz ayrılmış ve üzerine 0,5 N HCl ilave edilerek üründen ayrılan yağ asitleri tekrar serbest hale geçirilmiştir. Ortamdan eter ile ekstrakte edilmiş ve daha sonra eteri uçurulmuştur.

Elde edilen saf tüm bileşiklerin daha sonra gaz kromatografisi ile yağ asitleri bileşenleri belirlenmiştir.

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 kromatografi 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 polisiloksan
Dedektör sıcaklığı	: 250 °C
Enjektör sıcaklığı	: 225 °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 kromatogram kullanılmıştır.

3.3 Çörekotu Lipaz Enziminin Selit Üzerine İmmobilizasyonuna Ortam pH'nın ve Çözücü Varlığının Etkisi

Çörekotu tohumlarından elde edilen lipaz ekstraktları her gün taze hazırlanmış ve aynı gün içerisinde bekletilmeden kullanılmıştır. Bundan dolayı, tohumlar küçük porsiyonlar halinde, tohum/çözücü oranı 1:5 olacak şekilde Bölüm 3.2.1' de açıklanan yöntemle göre ekstrakte edilmiştir. Çalışmanın tümünde, protein içerikleri $13,3 \pm 0,03$ µ/mg protein gibi dar bir aralıkta değişen lipaz ekstraktları kullanılmıştır.

Çörekotu lipaz enziminin hidroliz reaksiyonlarında optimum pH' ın 6, optimum sıcaklığının da 40 °C olduğu daha önce yürütülmüş 3 yüksek lisans çalışmasında belirlenmiş olduğundan [162-164], çalışmalarımızda kullandığımız bu ekstraktlarda optimum değerlerin saptanması yapılmamış ve aynı değerler kabul edilmiştir.

3.3.1 Çörekotu Lipaz Enziminin Selit Üzerine Adsorpsiyonla İmmobilizasyonuna Ortam pH'nın ve Protein Miktarının Etkisi

Çörekotu lipazının fosfat tampon çözeltisi ortamından selit üzerine adsorpsiyonunda, ortam pH'nın ve ortamdaki protein miktarının adsorpsiyona olan etkisini incelemek için yapılan işlemler bir gün içinde tamamlanamadığından, her yeni deneyde farklı ekstrakt ile çalışılmıştır. Bundan dolayı bu ilk bölümde, farklı ekstraktlarla çalışılmanın adsorpsiyona olabilecek etkileri önce incelenmeye alınmıştır.

Deneylere, pH 5' de lipaz enzim proteinlerinin selit üzerine adsorpsiyonunun incelenmesi ile başlanmıştır. O gün elde edilen lipaz ekstraktının protein içeriğine bakılarak, içerisinde 1,0-6,0 mg/mL protein bulunacak şekilde, lipaz ekstraktından belli hacimler alınmış ve çözelti hacmi pH 5 fosfat tampon çözeltisi ile 20 mL' ye

tamamlanmıştır. Böylece başlangıç protein konsantrasyonu farklı olan en az 6 lipaz çözeltisi hazırlanmıştır. Lipaz çözeltilerine, 2' şer gram civarı hassas tartılmış selit ilave edilmiştir. Bölüm 3.2.4'te açıklanan prosedüre göre çalışma yürütülmüş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.3' de verilmiştir. Aynı koşullarda, farklı bir günde farklı lipaz ekstraktı kullanılarak yürütülmüş paralel deneye ait veriler de Tablo 3.4' de gösterilmiştir.

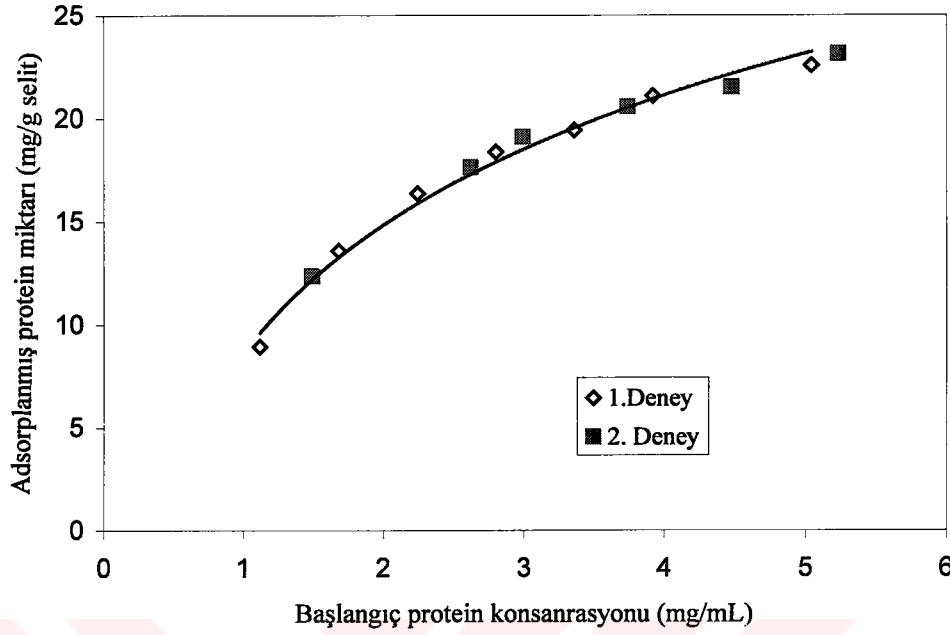
Tablo 3.3 pH 5'de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 1).
(Lipaz ekstratının protein içeriği : 11.21 mg/mL)

Selit miktarı (g)	Başlangıç protein miktarı (mg)	Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/mL) (Ci)	Çözeltideki protein miktarı (mg)	Adsorbe protein miktarı (mg)	Adsorbe protein konsantrasyonu (mg/g selit) (Cad)
2,0603	22,42	1,12	4,00	18,42	8,94
2,0843	33,63	1,68	5,30	28,33	13,59
2,0488	44,84	2,24	11,33	33,51	16,36
2,0278	56,05	2,80	18,78	37,27	18,38
2,0213	67,26	3,36	27,97	39,29	19,44
2,0168	78,47	3,92	35,91	42,56	21,10
2,0377	100,89	5,04	54,93	45,96	22,56

Tablo 3.4 pH 5'de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 2).
(Lipaz ekstratının protein içeriği : 14.94 mg/mL)

Selit miktarı (g)	Başlangıç protein miktarı (mg)	Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/mL) (Ci)	Çözeltideki protein miktarı (mg)	Adsorbe protein miktarı (mg)	Adsorbe protein konsantrasyonu (mg/g selit) (Cad)
2,0791	29,88	1,49	4,18	25,70	12,36
2,0121	52,29	2,62	16,81	35,48	17,63
2,0211	59,76	2,99	21,15	38,61	19,10
2,0067	74,70	3,74	33,44	41,26	20,56
2,0320	89,64	4,48	45,33	43,71	21,51
2,0245	104,58	5,23	57,77	46,81	23,12

Tablo 3.3 ve 3.4’ deki C_{ad} değerlerinin, C_i göre değişimi, aynı grafik üzerinde, Şekil 3.1’ de gösterilmiştir.

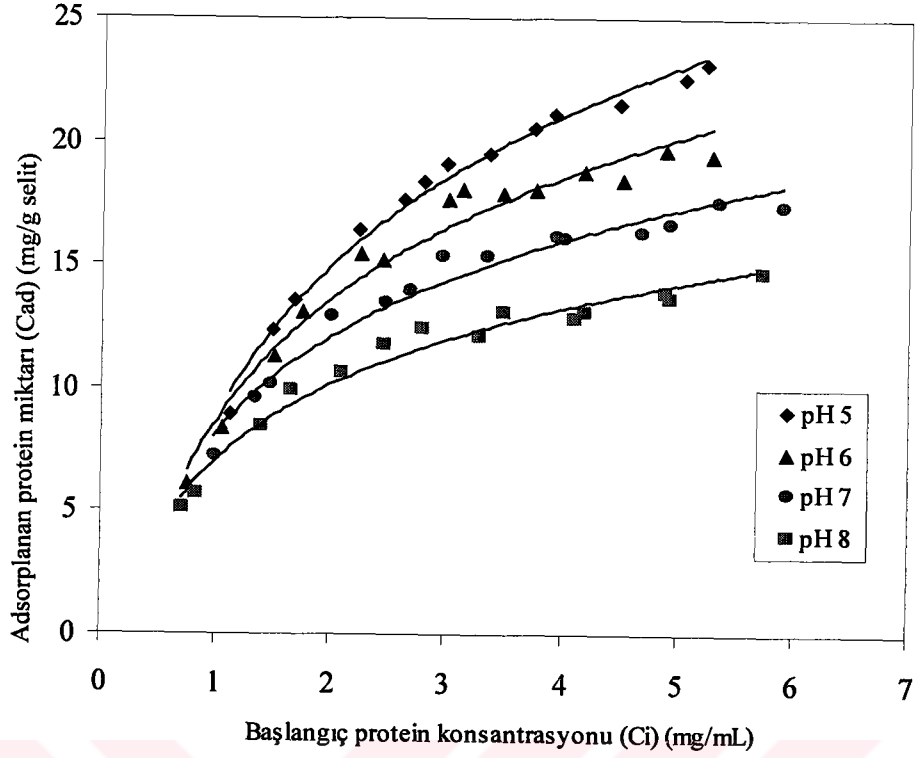


Şekil 3.1 pH 5’de, adsorplanmış çörekotu lipaz miktarının (C_{ad}), başlangıç protein konsantrasyonu (C_i) ile değişimi.

Şekil 3.1’ in incelenmesinden, iki farklı günde ve iki farklı lipaz ekstraktının kullanıldığı deneylerde, elde edilmiş sonuçların birbirine çok yakın ve aynı eğri üzerinde yer aldığı görülmektedir. Bu bize, uyguladığımız ekstraksiyon yöntemi ile oldukça homojen yapıda protein elde edilebildiğini ve farklı protein içerikli ekstraktlarla çalışmanın sonuçlarımıza olumsuz etki yapmadığını göstermiştir. Bundan dolayı, takibeden deneylerimizde paralel deneylere ait sonuçlar birlikte değerlendirilmiştir.

Şekil 3.1’ in adsorpsiyon açısından değerlendirilmesinde ise, ortamdaki protein miktarının artmasıyla adsorpsiyonun arttığı, ancak 4.0 mg/mL konsantrasyonundan sonra adsorpsiyonunun pratik olarak bir artma göstermediği gözlenmiştir.

Ortam pH’ının 6’ ya yükseltilmesiyle lipaz adsorpsiyonunun nasıl etkileneceğini izlemek için yürütülmüş deneylerde, yine benzer koşullarda çalışılmış, sadece çözelti pH’ı fosfat pH 6 tamponu ile 6’ ya ayarlanmıştır. Bu grup denemelere ait sonuçlar, Tablo 3.5 ve 3.6’ da, verilerin grafiksel değerlendirilmesi ise Şekil 3.2’ de verilmiştir.



Şekil 3.2 Farklı pH’larda, adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi

Tablo 3.5 pH 6’da, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 3).
(Lipaz ekstratının protein içeriği : 15.07 mg/mL)

Selit miktarı (g)	Başlangıç protein miktarı (mg)	Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/mL) (Ci)	Çözeltideki protein miktarı (mg)	Adsorbe protein miktarı (mg)	Adsorbe protein konsantrasyonu (mg/g selit) (Cad)
2,0730	15,07	0,75	2,40	12,67	6,11
2,0107	30,14	1,51	7,48	22,66	11,27
2,0074	45,21	2,26	14,31	30,90	15,39
2,0614	40,28	3,01	23,96	36,32	17,62
2,0392	75,35	3,77	38,61	36,74	18,02
2,0356	90,44	4,52	52,86	37,58	18,46
2,0441	105,49	5,28	65,83	39,66	19,40

Tablo 3.6 pH 6’da, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 4).
(Lipaz ekstratının protein içeriği : 13.97 mg/mL)

Selit miktarı (g)	Başlangıç protein miktarı (mg)	Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/mL) (Ci)	Çözeltideki protein miktarı (mg)	Adsorbe protein miktarı (mg)	Adsorbe protein konsantrasyonu (mg/g selit) (Cad)
2,0005	20,96	1,05	4,22	16,74	8,37
2,0119	34,93	1,75	8,61	26,32	13,08
2,0360	48,90	2,45	17,98	30,92	15,19
2,0224	62,87	3,14	26,45	36,42	18,01
2,0293	69,85	3,49	33,57	36,28	17,88
2,0403	83,82	4,19	45,50	38,32	18,78
2,0109	97,79	4,89	58,30	39,49	19,64

Şekil 3.2’ de, immobilizasyon ortamının pH 6’ ya ayarlanmasıyla, adsorbe lipaz miktarının her protein konsantrasyonu için pH 5’ de elde edilen değerlerden daha düşük olduğu gözlenmektedir. Ancak eğrinin profili, pH 5 için çizilmiş eğrinin ki ile büyük benzerlik göstermekte, protein konsantrasyonu 3,6 mg/mL değerinden sonra adsorpsiyonda pratik olarak artma olmadığı, doygunluk gösterdiği görülmektedir.

Tablo 3.7 pH 7’de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 5).
(Lipaz ekstratının protein içeriği : 9.82 mg/mL)

Selit miktarı (g)	Başlangıç protein miktarı (mg)	Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/mL) (Ci)	Çözeltideki protein miktarı (mg)	Adsorbe protein miktarı (mg)	Adsorbe protein konsantrasyonu (mg/g selit) (Cad)
2,0323	19,64	0,98	5,02	14,62	7,19
2,0405	29,46	1,47	8,80	20,66	10,12
2,0605	49,10	2,46	21,26	27,84	13,51
2,0147	58,92	2,95	28,07	30,85	15,31
2,0813	78,56	3,93	44,91	33,65	16,17
2,0151	98,20	4,91	64,62	33,58	16,66
2,0066	117,84	5,89	82,99	34,85	17,37

Tablo 3.8 pH 7’de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 6).
(Lipaz ekstratının protein içeriği : 13.34 mg/mL)

Selit miktarı (g)	Başlangıç protein miktarı (mg)	Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/mL) (Ci)	Çözeltideki protein miktarı (mg)	Adsorbe protein miktarı (mg)	Adsorbe protein konsantrasyonu (mg/g selit) (Cad)
2,0067	26,68	1,33	7,50	19,18	9,56
2,0419	40,02	2,00	13,66	26,36	12,91
2,0360	53,36	2,67	24,92	28,44	13,97
2,0111	66,70	3,34	35,79	30,91	15,37
2,0219	80,04	4,00	47,59	32,45	16,05
2,0337	93,38	4,67	60,17	33,21	16,33
2,0448	106,72	5,34	70,85	35,87	17,54

Adsorpsiyon ortamının pH’ ının 7 ve 8’ e çıkarılmasıyla adsorpsiyonun değişimini incelemek için, pH 7 ve pH 8’ de de iki seri deney yürütülmüş ve elde edilen sonuçlar Tablo 3.7-3.10’ da verilmiş ve sonuçların grafiksel gösterilimi, Şekil 3.2’ de diğer eğrilere ilave edilmiştir.

Tablo 3.9 pH 7’de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 7).
(Lipaz ekstratının protein içeriği : 16.35 mg/mL)

Selit miktarı (g)	Başlangıç protein miktarı (mg)	Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/mL) (Ci)	Çözeltideki protein miktarı (mg)	Adsorbe protein miktarı (mg)	Adsorbe protein konsantrasyonu (mg/g selit) (Cad)
2,0037	16,35	0,82	5,03	11,32	5,65
2,0307	32,70	1,64	12,51	20,19	9,94
2,0467	49,05	2,45	24,89	24,16	11,80
2,0615	65,40	3,27	40,45	24,95	12,10
2,0094	81,75	4,09	55,93	25,82	12,85
2,0567	98,10	4,91	66,99	28,11	13,67
2,0101	114,45	5,72	84,97	29,48	14,67

Tablo 3.10 pH 7’de, selit üzerine adsorblanmış çörekotu lipaz miktarının, başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Deney 8).
(Lipaz ekstratının protein içeriği : 13.94 mg/mL)

Selit miktarı (g)	Başlangıç protein miktarı (mg)	Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/mL) (Ci)	Çözeltideki protein miktarı (mg)	Adsorbe protein miktarı (mg)	Adsorbe protein konsantrasyonu (mg/g selit) (Cad)
2,0666	13,94	0,70	3,36	10,58	5,12
2,0374	27,88	1,39	10,66	17,22	8,45
2,0019	41,82	2,09	20,58	21,24	10,61
2,0279	55,76	2,79	30,65	25,11	12,38
2,0167	69,70	3,49	43,30	26,40	13,09
2,0303	83,64	4,19	57,08	26,56	13,08
2,0063	97,58	4,88	69,71	27,87	13,89

Şekil 2, enzim proteinlerinin adsorpsiyonunda, adsorplanan miktara ortam pH’ının ve enzim proteinlerinin konsantrasyonunun etkisinin büyük olduğu olduğunu net bir şekilde göstermektedir. Protein miktarı artmasıyla adsorplanan enzim miktarı da artmakta, ancak her pH’da, belli bir protein konsantrasyonundan sonra selite adsorplanan madde miktarında pek bir değişme olmadığı, sistemin dengeye ulaştığı gözlenmektedir. Ayrıca, en yüksek lipaz adsorpsiyonun pH’ 5 de gerçekleşmiş olduğu, ortam pH’ının yükselmesiyle adsorplanan madde miktarının da azaldığı görülmektedir. Benzer sonuçlar, Kerzel ve arkadaşlarının, Fractagel TSK butyl 650 taşıyıcısı üzerine “Stephylococcus Carnosus” lipazının adsorpsiyonunda da gözlenmiştir [81]. Araştırmacılara göre, enzim proteinlerinde maksimum adsorpsiyon proteinlerin izoelektrik noktasında (pH 4-6) gerçekleşmektedir. Ortamın pH’ının nötral ve alkali alana geçmesiyle protein molekülünün net yükü negatif olmakta, pH’ın artmasıyla negatif yük konsantrasyonu da artmaktadır. Dolayısıyla taşıyıcı üzerinde aynı yüklü proteinler arasındaki itme kuvvetinin etkisiyle adsorbe olan protein miktarında da azalma görülmektedir. Kernel ve arkadaşlarının bu açıklaması, bizim üzerinde çalıştığımız lipaz molekülleri içinde geçerli olabilir. Çörekotu lipazının izoelektrik noktası, daha önceki bir çalışmamızda pH 4,5 olarak belirlenmişti [162]. Bu çalışmada, maksimum adsorpsiyonun pH 5’de görülmesi ve pH arttıkça adsorpsiyonun azalması benzer şekilde enzim proteinlerinin arasındaki elektrostatik etkileşimin sonucu olması ile izah edilebilir.

3.3.2 İmmobilize Çörekotu Lipaz Enziminin Aktivitesine Adsorpsiyon Ortamı pH'nın Etkisi

Adsorpsiyon ortamı pH' ının adsorbe enzim miktarına olan etkisinin incelendiği deneyler sonucunda, en yüksek enzim adsorpsiyonun pH 5' de gerçekleştiği görülmüştü. Ancak elde edilen immobilize enzimlerin hidroliz aktivitelerinin ortam pH' ından etkilenip etkilenmediği henüz bilinmemektedir. Bundan dolayı, bu bölümde, her pH' da elde edilen immobilize enzimlerin aktivitelerinin, adsorbe olan enzim molekülleri miktarıyla değişme gösterip göstermediği incelenmiştir. Çalışmaların sonucunda, immobilize enzim için optimum adsorpsiyon pH' ı ve optimum başlangıç protein konsantrasyonu saptanmıştır.

Lipaz ekstraktlarının aktivitelerinin dar bir aralıkta olsa bile belli bir farklılık gösterdiği bilindiğinden, aktivitelerdeki bu farklılığın sonuçları etkilememesi için bu bölümde yürütülmüş deneylerde aynı ekstrakt kullanılmıştır. Deneylerimizde, protein içeriği 12,3 mg/mL ve hidroliz aktivitesi 0,42 U/mg protein olan lipaz ekstraktı kullanılmıştır. Protein konsantrasyonu 1,2, 2,5, 3,7, 4,9 ve 6,2 mg/mL olacak şekilde hazırlanmış lipaz çözeltilerinden pH 5, 6, 7 ve 8' de önce immobilize enzimler hazırlanmış ve bu enzimlerin daha sonra aktiviteleri saptanmıştır.

Tablo 3.11' de, elde edilen immobilize enzimlere ait enzimi karakterize eden adsorpsiyonla ilgili değerler yer almaktadır. Bu tablo, “ % immobilizasyon verimi” değerleri de içermektedir. İmmobilizasyon verimi ortamda bulunan proteinlerin yüzde olarak ne kadarının selit üzerine adsorbe olduğunu göstermektedir. Adsorbe olan protein miktarı dengeye eriştiğinde immobilizasyon verimi hızla düşmektedir.

Tablo 3.12' de ise elde edilen bu immobilize enzimlerin aktiviteleri ile ilgili değerler gösterilmiştir. % Aktivite kazanımı ise, adsorbe olmuş enzimlerin mg protein başına göstermiş olduğu aktivitenin orijinal enzim proteinin aktivitesine göre yüzdesini ifade etmektedir. Farklı pH' larda hazırlanmış immobilize enzimlerinin aktivitelerinin ve aktivite kazanımlarının, adsorbe protein miktarına ve adsorpsiyon pH' ına göre nasıl değiştiğini daha iyi görebilmek için, Tablo 3. 12' deki değerler kullanılarak Şekil 3.3 çizilmiştir.

Tablo 3.11 pH 5, 6, 7 ve 8’de hazırlanmış immobilize enzimlerde, adsorplanmış enzim miktarının ve immobilizasyon verimlerinin başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Lipaz ekstraktı protein içeriği= 12,3 mg/mL).

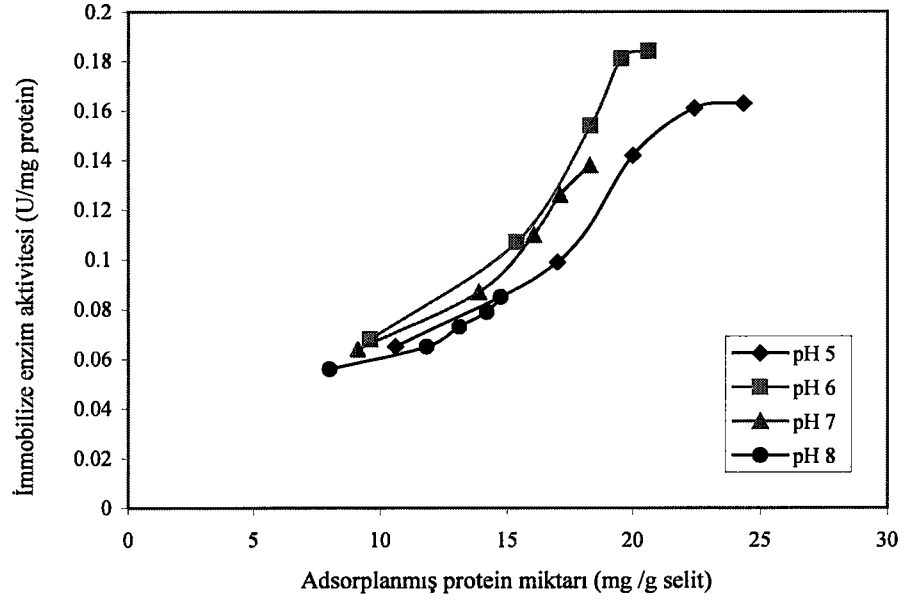
Ortam pH	Başlangıç protein konsantrasyonu (Ci)	Başlangıç protein miktarı (mg)	Adsorbe protein miktarı (mg)	Adsorbe protein konsantrasyonu (C _{ad})	İmmobilizasyon verimi (%) *
5	1,2	24,6	21,67	10,60	88,1
	2,5	49,2	34,28	17,00	69,7
	3,7	73,8	40,77	20,05	55,2
	4,9	98,4	46,30	22,41	47,1
	6,2	123,0	49,16	24,34	40,0
6	1,2	24,6	18,25	9,60	81,1
	2,5	49,2	28,04	15,37	63,4
	3,7	73,8	33,12	18,31	49,7
	4,9	98,4	35,15	19,54	40,6
	6,2	123,0	37,30	20,61	33,9
7	1,2	24,6	18,25	9,11	74,2
	2,5	49,2	28,04	13,88	57,0
	3,7	73,8	33,12	16,04	44,9
	4,9	98,4	35,15	17,09	35,7
	6,2	123,0	37,30	18,28	30,3
8	1,2	24,6	16,16	7,99	65,7
	2,5	49,2	23,77	11,82	48,3
	3,7	73,8	26,97	13,12	36,5
	4,9	98,4	29,01	14,19	29,5
	6,2	123,0	29,94	14,74	24,3

* Adsorbe olan protein miktarının ortamda mevcut protein miktarına oranıdır.

Tablo 3.12 pH 5, 6, 7 ve 8’de hazırlanmış immobilize enzimlerde, aktivitenin ve aktivite kazanımının başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Lipaz ekstraktının aktivitesi: 0,42 U/mg protein).

Ortam pH’ı	Başlangıç Protein Konsantrasyonu (Ci)	Adsorbe protein konsantrasyonu (Cad)	İmmobilize enzim aktivitesi		Aktivite kazanımı (%)*
			(U/g selit)	(U/mg protein)	
5	1,2	10,60	0,69	0,065	15,5
	2,5	17,00	1,68	0,099	23,5
	3,7	20,05	2,85	0,142	33,8
	4,9	22,41	3,61	0,161	38,3
	6,2	24,34	3,97	0,163	38,8
6	1,2	9,60	0,65	0,068	16,2
	2,5	15,37	1,65	0,107	25,5
	3,7	18,31	2,82	0,154	36,7
	4,9	19,54	3,54	0,181	43,1
	6,2	20,61	3,79	0,184	43,9
7	1,2	9,11	0,58	0,064	15,3
	2,5	13,88	1,21	0,087	20,7
	3,7	16,04	1,76	0,110	26,2
	4,9	17,09	2,15	0,126	30,0
	6,2	18,28	2,52	0,138	32,9
8	1,2	7,99	0,45	0,056	13,4
	2,5	11,82	0,77	0,065	15,5
	3,7	13,12	0,96	0,073	17,4
	4,9	14,19	1,12	0,079	18,8
	6,2	14,74	1,26	0,085	20,3

* Adsorbe enzimin mg protein başına gösterdiği aktivitenin ekstrakt aktivitesine oranıdır.



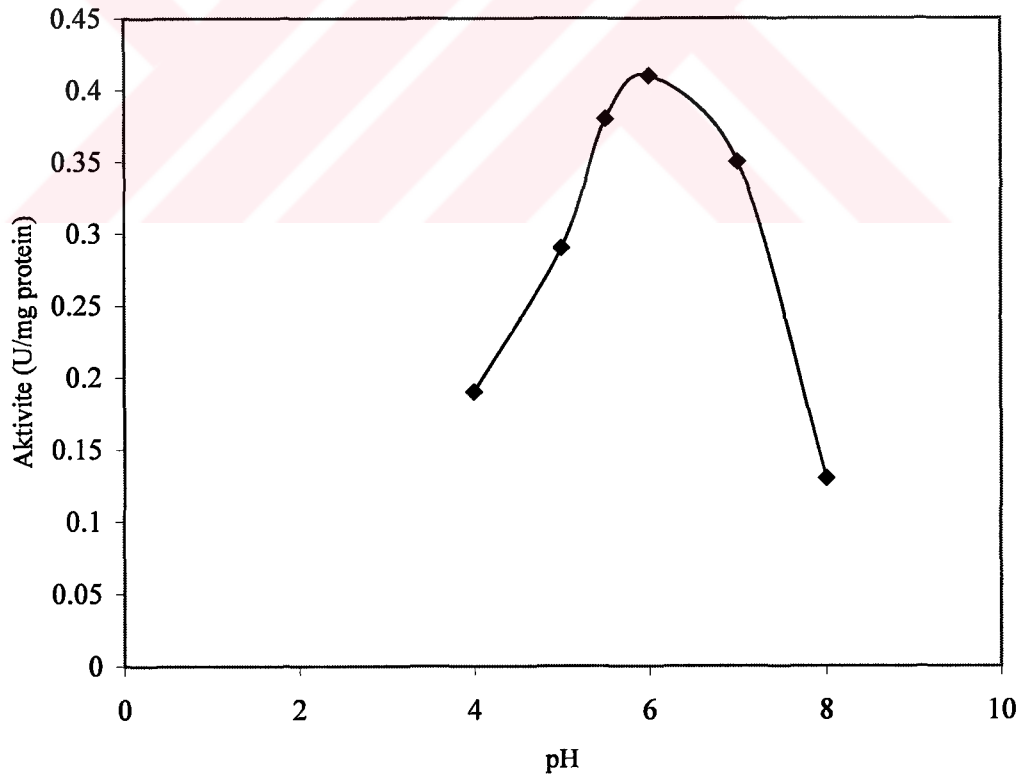
Şekil 3.3 İmmobilize enzim aktivitelerinin pH ve adsorbe protein miktarına göre değişimi

Şekil 3.3' de, genel olarak her pH' da elde edilmiş immobilize enzimlerin aktivitelerinin adsorbe protein miktarıyla büyük değişim gösterdiği görülmektedir. Selit üzerine gram başına adsorbe olan protein miktarı 15 mg' a kadar tüm immobilize örneklerde oldukça düşük aktivite değerleri ölçülmüştür. pH 8' de hazırlanmış örnek dışında, diğer örneklerde protein yüklenmesinin bu değerinden sonra aktivitede hızlı bir artış gözlenmekte ve doygunluk yüklemesine yakın bir değerde ise aktivite maksimuma erişmiştir. Bosley ve Peilow' a [73] göre bu durum adsorbe protein moleküllerinde görülen konformasyonel yapı değişikliğinden kaynaklanmaktadır. Araştırmacılara göre, düşük yüklenme durumunda, enzim molekülleri adsorbent üzerinde geniş bir yüzeyde yerleştiklerinden moleküller yüzey üzerinde konformasyonel açılmaya uğramakta dolayısıyla aktivitede düşmeye sebep olmaktadır. Adsorbent üzerinde enzim moleküllerinin sayısının artması, yüzeyde bağlandıkları alanı sınırlamakta ve konformasyonel değişikliğe uğramasını zorlaştırmaktadır. Dolayısıyla sahip oldukları aktivitede oluşan kayıp da azaltmaktadır.

Tablo 3.12 ve Şekil 3.3 birlikte aktivite kazanımı açısından incelendiğinde, enzim ekstraksiyonu sırasındaki pH' ın serbest enzimin en yüksek aktivite gösterdiği pH' dan farklı olması durumunda, oldukça yüksek oranda aktivite kaybı olduğu

anlaşılmaktadır. En yüksek aktivite kazanımı pH 6 ortamında her protein konsantrasyonda elde edilmiş immobilize örneklerde, en düşük aktivite kazanımının ise pH 8’ de hazırlanmış örneklerde olduğu gözlenmektedir.

Şekil 3.3 ayrıca bize beklenenin aksine, pH 6’ da hazırlanmış immobilize enzim örneklerinin diğerlerine kıyasla, eşdeğer adsorbe protein miktarlarında, daima en yüksek aktivite değerlerine sahip olduğunu açıkça göstermektedir. pH 5 ve özellikle pH 8’ de hazırlanmış örneklerin aktiviteleri pH 6’ daki enzim aktivite değerlerine göre oldukça düşüktür. Bu durum, sadece immobilizasyon esnasında değil, adsorpsiyon öncesinde adsorpsiyon ortamında bulunan doğal enzim molekül yapısının pH’ a göre değişim göstermiş ve kısmen pH etkisiyle aktivite kaybetmesi ile açıklanabilir. Bu durum, yani enzim moleküllerinin adsorpsiyon öncesi farklı aktivitede olmaları, adsorpsiyon sonrası aynı miktarda adsorbe olmuş protein moleküllerinin farklı aktivite göstermesine sebep olmaktadır. Bu olayı daha netleştirmek için, doğal enzimin aktivitesinin pH ile değişim grafiği aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.4 Serbest (doğal) çörekotu lipaz enziminin aktivitesinin pH ile değişimi.

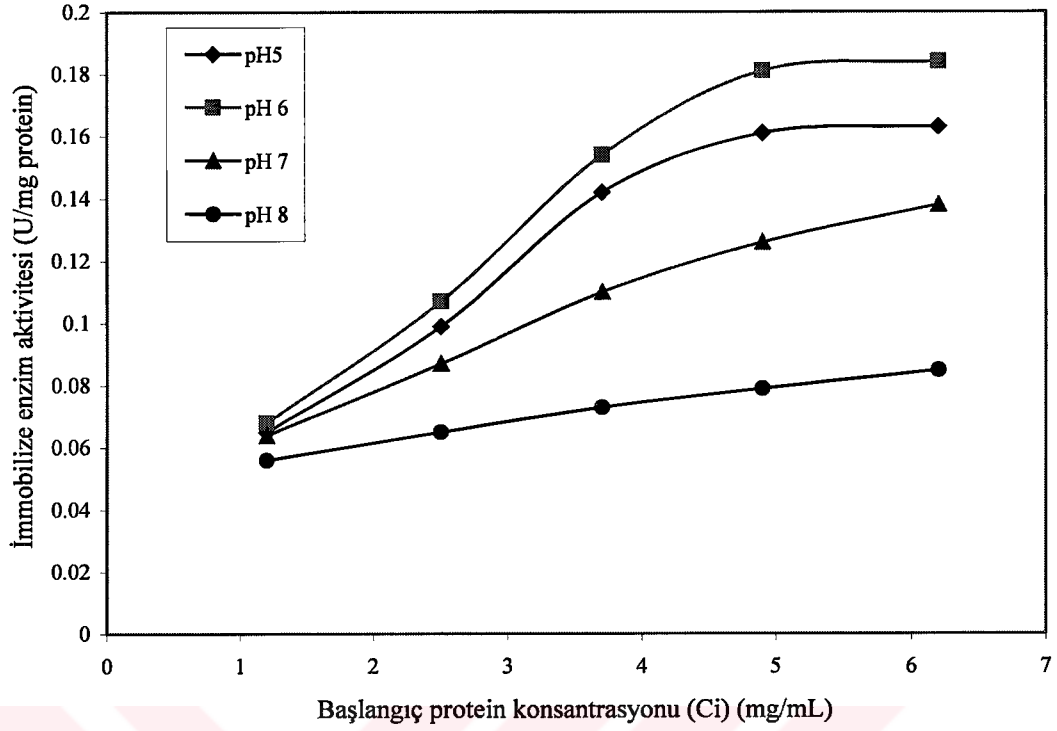
Şekil 3.4' de, serbest çörekotu lipazının maksimum aktiviteyi pH 6' da gösterdiği, pH 5 ve özellikle pH 8' de aktivitenin çok düşük olduğu görülmektedir. Bu aktivite profili, asidik lipaz içeren hint tohumu, bakla gibi bitkisel lipazlar için karakteristik aktivite/pH ilişkisine uyum göstermektedir. Bu bitkisel lipazlarda, alkali bölgede (pH>7) de ve yüksek asidik bölgede (pH<5) de aktivitede önemli derecede düşmeler görülmektedir. Rajendran ve arkadaşları ise, buğday lipazının 5' de dahi kuvvetle inaktive olduğunu göstermiştir. Genel olarak lipazların, aktiviteleri izoelektrik noktalarının $\pm$ (2-3) unit arasında reversibl olarak pH' dan etkilenir. Alkali ortamlarda (pH>8) β -eliminasyon reaksiyonu sonucunda kısmen sistin yan zincirlerinden parçalanır; asidik ortamlarda ise (pH<4) aspartik asit yan zincirlerini takip eden peptid bağlarından kopmalar oluşur [165]. Bitkisel lipazlarda bu geriye dönüşümsüz kısmi parçalanmalar biraz daha erken pH' larda başlamaktadır. Benzer şekilde, çörekotu lipaz enziminde de alkali parçalanma pH 8' de etkin olarak oluşmuş olmalı ki pH 8' de hazırlanan tüm immobilize enzimlerin aktiviteleri diğerlerine göre çok düşük değerdedir. PH' 5 de ise, buğday lipazına benzer olarak, kısmen asidik parçalanmalar söz konusu olabilir. pH 5' de en fazla protein adsorpsiyonu görülmesine rağmen, elde edilen immobilize enzimlerin, eşdeğer miktarda protein içeren pH 6 ve pH 7' de hazırlanmış immobilize enzimlerden daha az aktivitede olmasının nedeni bu şekilde açıklanabilir.

3.3.3 Çörekotu Lipaz Enziminin İmmobilizasyonunda, Optimum Adsorpsiyon pH Değerinde Optimum Başlangıç Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İmmobilize enzim aktivitesine ortam pH' ının etkinin incelendiği çalışmalar sonucunda, pH 6 değerinin optimum adsorpsiyon pH' ı olduğu belirlenmiştir. Bu kez, optimum başlangıç protein konsantrasyonunu da saptamak amacıyla, Tablo 3.12' deki değerler kullanılarak, immobilize enzim aktivite değerlerinin başlangıç protein konsantrasyonuna göre değişim eğrileri Şekil 3.5' te sunulmuştur.

Şekil 3.5' in incelenmesiyle, başlangıç protein konsantrasyonuna göre immobilize enzim aktivitelerinin değişiminde, pH 5 ve pH 6' da elde edilmiş immobilize enzim örneklerinin hemen hemen aynı profilde olduğu, yine pH 6 ortamında çalışıldığında diğerlerinden daha yüksek aktiviteli enzimler elde edilebileceği

gözlendi.



Şekil 3.5 İmmobilize çörekotu lipaz enzimlerinin aktivitelerinin pH ve başlangıç protein konsantrasyonuna göre değişimi.

Şekil 3.5’ den pH 6’ da immobilize enzim hazırlamak için optimum başlangıç protein konsantrasyon değerinin eğrinin dönüm noktasına tekabül eden 4.9 mg/mL olarak seçilebileceği görülmektedir.

Optimum protein konsantrasyonun seçiminde, aktivite kazanımı ve immobilizasyon verimlerinin de gözönünde bulundurularak son kararı vermek için, Tablo 3.13 düzenlenmiştir. Tablo 3.13’ den, immobilizasyon verimini ve aktivite kazanımını mümkün olduğu kadar yüksek tutmak için, başlangıç protein konsantrasyonunun 4.9 mg/mL olarak seçilmesinin uygun olduğu bir daha tespit edilmiştir.

Sonuç olarak optimum koşullarda (pH 6 ve 4.9 mg/mL protein konsantrasyonunda) hazırlanan immobilize enzimin aktivitesi 3.54 U/g selit (0,18 U/mg protein) dir ve gram selit başına 19.5 mg protein yüklenmesi göstermektedir. Eldesi esnasında, immobilizasyon verimi % 41, aktivite kazanımı ise % 43 olarak gerçekleşmiştir.

Tablo 3.13 pH 6’ da elde edilen immobilize enzimlerde, aktivite, aktivite kazanımı ve immobilizasyon verimlerinin başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi.

Başlangıç protein konsantrasyonu (C _i) (mg/mL)	İmmobilize Enzim Aktivitesi		Aktivite Kazanımı (%)	İmmobilizasyon Verimi (%)
	(U/mg Protein)	(U/g selit)		
1,2	0,058	0,65	16,2	81,1
2,5	0,107	1,65	25,5	63,4
3,7	0,154	2,82	35,7	49,7
4,9	0,181	3,54	43,1	40,6
6,2	0,184	3,79	43,8	33,9

3.3.4 Çörekotu Lipaz Enziminin Adsorpsiyon İzotermlerinin Langmuir ve/veya Freundlich Modellerine Uygunluğunun Tespiti

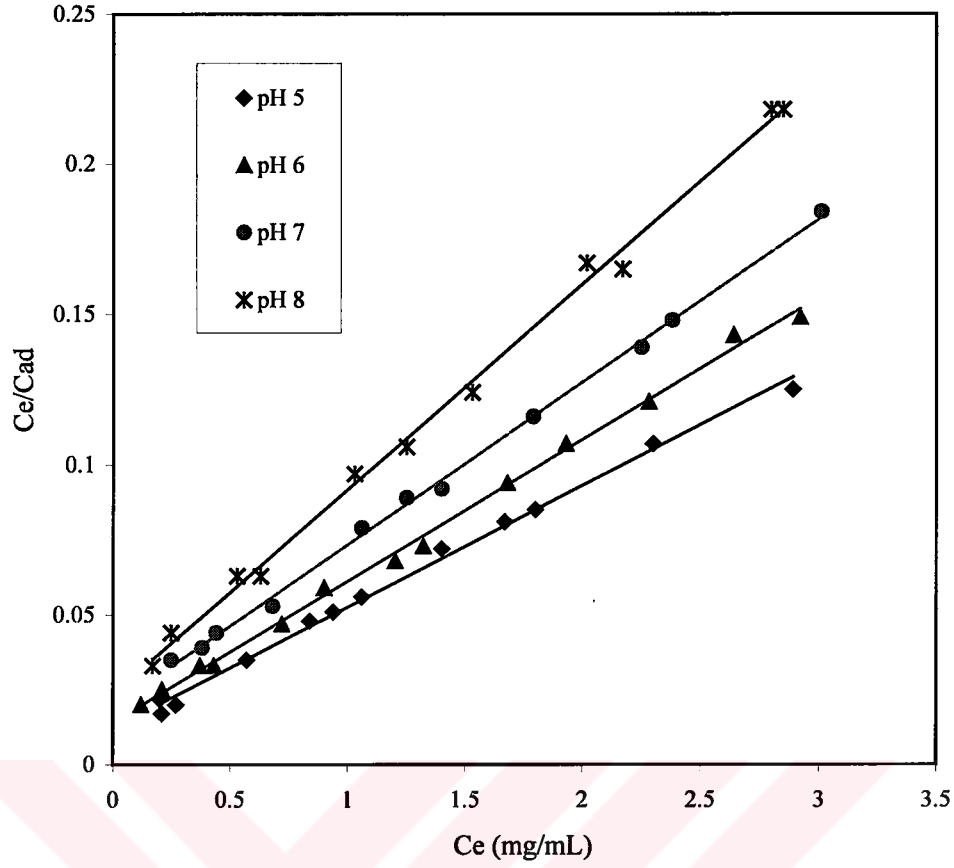
Bu bölümde çörekotu lipaz enzim proteinlerinin, farklı pH’ larda selit üzerine adsorpsiyonunun incelendiği deneylerde elde edilen sonuçların, Langmuir ve Freundlich modellerine uygunluk gösterip göstermediği araştırılmıştır. Bu amaçla önce Bölüm 3.2.4’ de verilen Langmuir adsorpsiyon izoterm eşitliği (3.3) ve Tablo 3.3-3.10 da sunulan veriler kullanılarak, her pH değeri için (C_e/C_{ad})’ nin (C_e) ile değişim doğruları çizilmiş ve bunlar topluca Şekil 3.6’ da gösterilmiştir.

Şekil 3.6’ dan açık olarak çörekotu enzim proteinlerinin adsorpsiyonunun Langmuir modeline modeline büyük uyum gösterdiği anlaşılmaktadır. Elde edilen doğruların eğimlerinden C_{max} değerleri, ordinat kesimlerinden ise K_p değerleri hesaplanmış ve bu değerler Tablo 3.14’ de verilmiştir.

Tablo 3.14 Çörekotu lipazının selit üzerine adsorpsiyonun da, saptanan Langmuir parametreleri.

pH	C _{max} (mg/ g selit)	K _p ^a
5	24,3	1,94 10 ⁵
6	20,7	1,93 10 ⁵
7	17,9	1,96 10 ⁵
8	14,5	1,92 10 ⁵

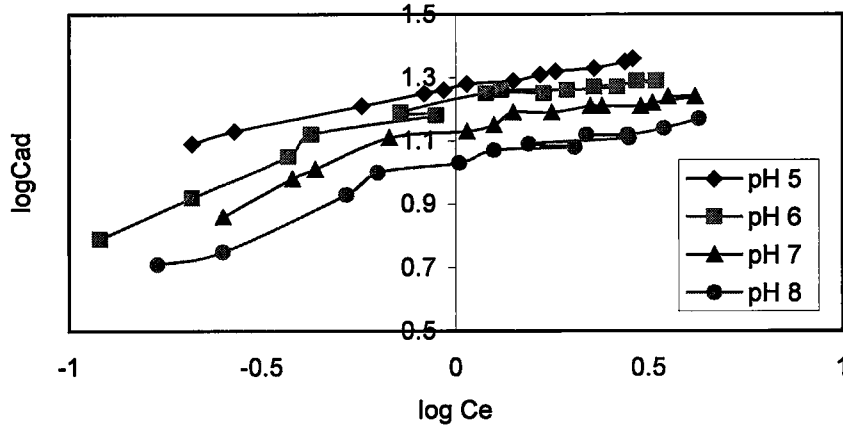
a Lipazın molekül ağırlığı 61 kDa olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3.6 Çörekotu lipaz enziminin Langmuir adsorpsiyon izotermlerinin pH ile değişimi

Tablo 3.14' den görüldüğü üzere, çörekotu lipazı için C_{max} adsorpsiyon doygunluk değerleri, ortam pH'nın 8 den 5' e düşmesiyle, gram selit başına 14.5 mg' dan 24.3 değerine yükselmektedir. Aynı koşullarda saptanmış K_p (Adsorpsiyon sabiti) değerlerinin ise pratik olarak pH' a bağımlı olmadığı görülmektedir. Saptanan K_p değerlerinin aritmetik ortalaması alınarak çörekotu lipazının selit üzerine adsorpsiyonun da adsorpsiyon sabiti (25 °C ' de) $1,92 \cdot 10^5$ 1/M olarak belirlenmiştir.

Daha sonra bu bölümde, adsorpsiyon deneylerinde elde ettiğimiz aynı verilerin, Bölüm 3.2.4' de verilen Freundlich izoterm eşitliğine (3.4) uygun olup olmadığı incelenmiştir. Bu kez linerize edilmiş Freundlich eşitliği kullanılarak çörekotu lipazının selit üzerine adsorpsiyonun da, her pH için $\log(C_{ad})$ değerlerinin $\log(C_e)$ ile değişimleri şekil 3.7' de topluca gösterilmiştir.



Şekil 3.7 Çörekotu lipaz enziminin Freundlich adsorpsiyon izotermelerinin pH ile değişimi

Şekil 3.7 incelendiğinde, sadece pH 5 ortamında gerçekleştirilen adsorpsiyon deneylerinde elde edilen veriler Freundlich modeline uygunluk gösterdiği görülmektedir. pH 6, 7 ve 8’ de ise $\log (C_{ad})$ ile $\log (C_e)$ arasında lineer bir bağlantı bulunmamaktadır. Bundan dolayı da, Freundlich modelinin parametreleri olan K ve n değerlerinin pH ile değişimi saptanamamıştır.

3.3.5 Çörekotu Lipaz Enzimin Selit Üzerine İmmobilizasyonuna Çözücü Etkisi

Çalışmamızın bu bölümünde, çörekotu lipazının immobilizasyonunda adsorpsiyon ortamına solvent ilavesinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, Bölüm 2.3.4’ de açıklanan prosedüre göre, adsorpsiyon ortamına ayrı ayrı aseton ve hekzan ilave edilerek bir miktar daha proteinin selit üzerine bağlanması sağlanmıştır. Bu yolla elde edilen immobilize enzimlerin daha sonra, protein içerikleri, aktiviteleri, immobilizasyon verimleri ve aktivite kazanım değerleri tespit edilmiştir. İmmobilize enzimlerin bu değerler göz önüne alınarak mukayesesi yapılarak, immobilizasyona solvent ve solvent cinsinin etkisi incelenmiştir.

Bilindiği üzere, proteinlerin saflaştırılmasında uygulanan yöntemlerden biri çöktürme olup yöntemin esası proteinlerin sulu çözeltilerine, suda çözünebilir ve ortamın dielektrik sabitini önemli derecede azaltabilecek kadar düşük dielektrik sabitine haiz solventlerin katılmasıdır [162]. Bu solventler (dimetilformamid, dimetilsulfoksit, düşük molekül ağırlıklı alkoller ve aseton) su ile proteinlerin sudaki

çözünürlüğünü azaltarak proteinlerin çökmesini sağlarlar. Metil alkol ve özellikle aseton bu yöntem için en uygun solventlerdir. Metanole nazaran asetonun non-toksik ve ucuz olması, asetonun tercih edilme nedenleridir.

Bizde çalışmamızda önce aseton kullanarak, lipaz ekstraktından lipaz enzim proteinlerinin selit üzerine aynı zamanda adsorpsiyon olmasını ve çökmesini sağlamaya çalıştık. Deneylerimizde, pH 6' da başlangıç protein konsantrasyonu 1.5-6.6 mg/mL arasında değişen 4 ayrı lipaz çözeltisi ile çalışılmış olup, Bölüm 3.2.4' de açıklanan prosedüre uygun olarak aseton-tampon çözelti ortamında immobilize enzim örnekleri hazırlanmıştır. Elde edilen bu immobilize enzimlerin bağladıkları protein miktarları ve aktiviteleri ile ilgili veriler Tablo 3.15 ve 3.16' da verilmiştir.

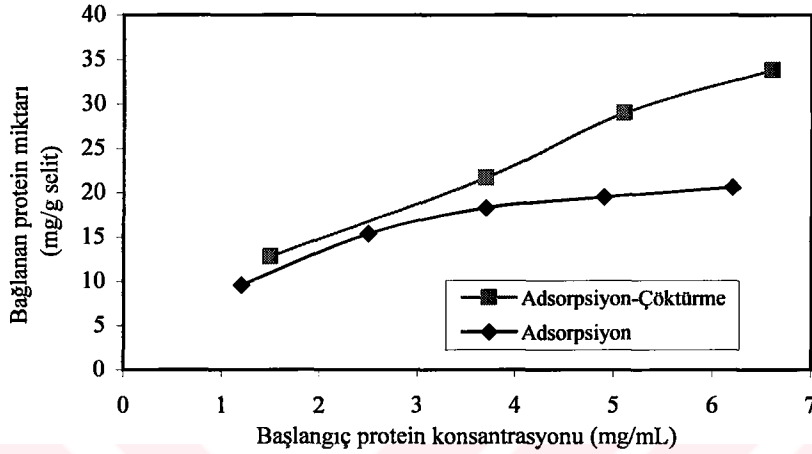
Tablo 3.15 pH 6'da ve aseton/tampon ortamında hazırlanmış immobilize enzimlerde, bağlanmış protein miktarlarının ve immobilizasyon verimlerinin başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi. (Lipaz ekstraktı protein içeriği = 14,68 mg/mL).

Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/mL)	Başlangıç protein miktarı (mg)	Bağlanan protein miktarı (mg)	Bağlanan protein konsantrasyonu (mg/g selit)	İmmobilizasyon verimi (%)
1,5	29,36	25,68	12,83	87,5
3,7	73,40	43,81	21,70	59,7
5,1	102,76	58,74	29,02	57,2
6,6	103,12	68,65	33,81	52,0

Tablo 3.16 pH 6' da ve aseton/tampon ortamından hazırlanmış immobilize enzimlerde, aktivitelerin ve aktivite kazanımının başlangıç protein konsantrasyonu ile değişimi (Lipaz ekstraktının aktivitesi 0,41 U/mg protein).

Başlangıç protein konsantrasyonu (mg/mL)	Bağlanan protein konsantrasyonu (mg/g selit)	İmmobilize enzim aktivitesi		Aktivite kazanımı (%)
		U/g selit	U/mg protein	
1,5	12,83	1,48	0,115	28,1
3,7	21,70	4,57	0,211	51,4
5,1	29,02	5,96	0,205	50,1
6,6	33,81	6,33	0,187	45,7

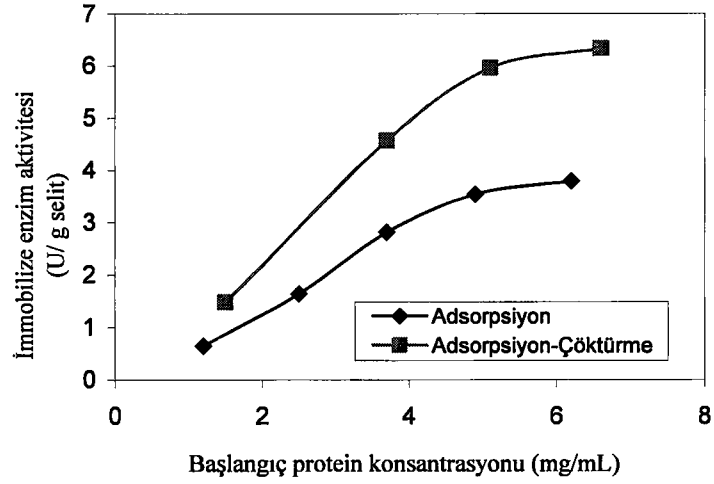
pH 6' da, direkt tampon çözeltilerden ve aseton/tampon çözeltilerinden elde edilmiş immobilize enzimlerin, önce bağladıkları protein miktarları açısından mukayese etmek için, Tablo 3.11 ve Tablo 3.15' de verilen değerler kullanılarak başlangıç protein konsantrasyonuna bağlı olarak selite bağlanan protein miktarlarının değişimi incelenmiş ve elde edilen eğriler Şekil 3.8' de birlikte gösterilmiştir.



Şekil 3.8 Tampon çözeltilerden ve aseton / tampon çözeltilerinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipaz enzimlerinin protein içeriklerinin başlangıç protein konsantrasyonuna göre değişimi.

Şekil 3.8' in incelenmesiyle, ortama aseton ilavesinin selit üzerine bağlanan proteini önemli derecede attırdığı açıkça görülmektedir. Başlangıç protein miktarının artmasıyla çöken protein miktarı da artmaktadır ki bu durum bilinen ve beklenen bir sonuçtur. Tampon çözelti ortamında yürütülmüş adsorpsiyon çalışmalarında, saptanmış optimum koşullarda hazırlanmış immobilize enzimde immobilizasyon verimi % 41 iken, aynı koşullarda ortama aseton ilavesi bu verimi % 50' ye çıkarmıştır.

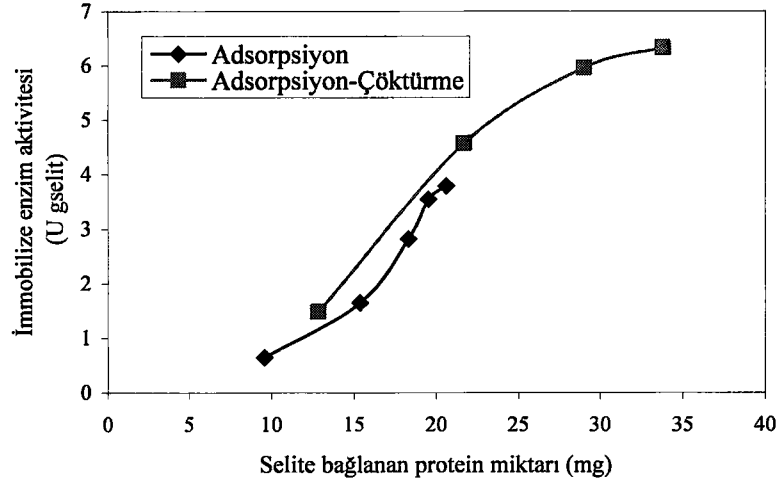
Her iki yöntemle elde edilmiş immobilize enzimleri, aktiviteleri açısından karşılaştırmak için, bu kez Tablo 3.12 ve Tablo 3.16' da yer alan değerler kullanılarak, enzimlerin aktivitelerinin başlangıç protein konsantrasyonları ile değişim eğrileri şekil 3.9' da gösterilmiştir.



Şekil 3.9 Tampon çözeltiden ve aseton/tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipaz enzimlerinin aktivitelerinin başlangıç protein konsantrasyonuna göre değişimi.

Şekil 3.9’ da adsorpsiyon ortamında aseton bulunuşunun immobilize enzim aktivitelerinde direkt adsorpsiyonla hazırlanmış örneklere göre 1.6 –1.7 kat artışa sebep olduğu gözlenmektedir. Benzer sonuçlar, Castro ve arkadaşlarının [44] selit üzerine Porcine pankreatik lipazının selit üzerine immobilizasyonunda da görülmüştür. Araştırmacılar göre bu durum, asetonun enzim proteinlerini çevreleyen su moleküllerini kısmen molekülden uzaklaştırması sonucu, moleküllerin kısmen renaturasyon olması, yani üç boyutlu yapısına dönmesi ile açıklanmaktadır.

Adsorpsiyon ve adsorpsiyon-çöktürme yöntemlerine göre elde edilmiş bu immobilize enzimlerde, selite aynı miktarda protein bağlandığında enzimlerin gösterdiği aktivite değerleri arasında fark olup olmadığını irdelemek için, aktivite değerlerinin selit üzerindeki protein konsantrasyonu ile değişimini gösteren grafik düzenlenmiştir. Şekil 3. 10’ da, asetonlu ortamda elde edilmiş immobilize enzimlerin daima diğerine nazaran daha yüksek aktiviteli olduğu görülmektedir. Asetonun en düşük protein yüklenmesinde dahi aktivite üzerinde olumlu etkisi olduğu gözlenmektedir.



Şekil 3.10 Tampon çözeltiden ve aseton/tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu enzimlerinin aktivitelerinin selite bağlanan protein miktarına göre değişimi.

Adsorpsiyon ortamına aseton ilavesiyle, hem selite bağlanan protein miktarı hem de aktiviteyi arttırmak mümkün olabilmektedir. Ancak Tablo 3.16’ da verilen aktivite kazanım değerleri ve mg protein başına aktivite değerleri tekrar gözden geçirildiğinde, bağlanan protein miktarı artmasıyla, belli bir değerden sonra aktivite kazanımının ve protein başına aktivitenin düştüğü görülmektedir. Bu olay, asetonun ekstraktan enzim dışı protein çöktürmesi ile alakalı olabilir. Gram selit başına bağlanan protein 21,7 mg’ dan 33,81 mg’ a çıkmasıyla, spesifik aktivite 0,211 U/mg değerinden 0,187 U/mg’ a, aktivite kazanımı ise %51,4 den % 45,7’ e düşmektedir. Mümkün olduğu kadar bir taraftan aktiviteyi ve aktivite kazanımını yüksek tutmak, diğer taraftan da yüksek protein yüklemesini sağlamak için, optimum protein yüklenmesinin 29 mg/g selit olarak seçilmesine karar verilmiştir. Bu yükleme değerinde aktivite kazanımı % 50 ve spesifik aktivite değeri yaklaşık olarak 6 U/g selit (0,2 U/mg protein) olmaktadır. Bu enzimi hazırlamak için kullanılması gereken başlangıç protein konsantrasyonu ise 5 mg/mL değerine karşılık gelmektedir. Seçilen bu değer, direkt tampon çözeltiden adsorpsiyon ile immobilize enzim hazırlanmasında daha önce belirlenmiş optimum başlangıç protein konsantrasyon (4,9 mg/mL) değerine pratik olarak eşittir.

Su ile karışan solventin (asetonun) immobilizasyona olan olumlu etkisinden sonra, bu kez su ile karışmayan solvent ortamında immobilize enzim hazırlanarak bu solventin immobilize enzim özelliklerine olan etkisi incelenmiştir. Tampon çözeltiye

bu kez hekzan katılarak, immobilize enzim eldesinde aseton için uygulanmış çalışma prosedürü (Bölüm 3.2.4' de açıklanan) aynen tatbik edilmiş ve immobilize enzim örnekleri hazırlanmıştır. Bu çalışmalarımızda, başlangıç protein konsantrasyonu olarak, hem direkt tampon çözeltiden hem de aseton/tampon çözelti ortamından immobilize enzim hazırlanmasında saptanmış optimum başlangıç protein konsantrasyonu olan 5 mg/mL değeri kullanılmıştır. Bu çözeltiye hekzan ilave edilerek immobilize enzim örnekleri hazırlanmıştır. Tabii ki aktivite açısından sağlıklı karşılaştırma yapabilmek için, aynı lipaz ekstraktı kullanılarak, tampon çözeltiden ve aseton/tampon çözeltisinden immobilize enzimler de eşdeğer zamanda ve aynı koşullarda topluca hazırlanmıştır. Üç farklı adsorpsiyon ortamından hazırlanmış bu immobilize enzim örneklerinin önemli karakteristik özellikleri mukayeseli olarak Tablo 3.17' de verilmiştir.

Tablo 3.17 pH 6' da direkt tampon çözeltiden ve solvent /tampon çözeltilerinden hazırlanmış immobilize enzimlerin özelliklerinin karşılaştırılması. (Lipaz ekstraktının protein içeriği: 15,22 mg/mL ve aktivitesi 0,39 U/mg protein; başlangıç protein konsantrasyonu: 5 mg/mL).

İmmobilizasyon ortamı	Bağlanan protein (mg/g selit)	İmmobilizasyon verimi (%)	İmmobilize enzim aktivitesi		Aktivite kazanımı (%)
			U/g selit	U/mg protein	
Tampon çözelti	19,77	40,3	3,44	0,174	44,6
Aseton+ tampon çözelti	28,15	57,5	5,86	0,208	53,3
Hekzan+tampon çözelti	36,14	74,0	11,65	0,321	82,3

Tablo 3.17' in incelenmesiyle, immobilizasyon ortamına hekzan katılmasının asetona nispetle selite bağlanan protein ve bu proteinlerin in taşıdığı aktivite açısından çok daha olumlu etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Hekzanlı ortamda immobilizasyon verimi %74' e ulaşırken aktivite kazanımı ise % 82' e yükselmiştir. Dolayısıyla, elde edilen immobilize enzimlerin aktivitelerinde de büyük farklar oluşmuştur. Direkt adsorpsiyon yolu ile hazırlanmış immobilize enzimin aktivitesi gram selit başına 3,44 U iken, ortama aseton ve hekzan ilavesi ile elde edilmiş immobilize enzimlerin aktiviteleri sırası ile 5,86 U ve 11,65 U' a yükselmiştir. Benzer sonuçlar, Castro ve arkadaşlarının [44] çalışmalarında, selit üzerine ticari Porcine pankreatik lipaz enziminin immobilizasyonunda da gözlenmiştir.

Araştırmacılar göre, hekzanlı ortamda immobilize enzimin daha üstün özelliklere sahip olmasının mekanizması tam olarak aydınlatılmamıştır. Yine de, hekzanın daha düşük polariteli solvent olması (yüksek log P değerine sahip olması), solventin enzim molekülleri etrafında spesifik bir mikro çevre yaratması nedeniyle enzim proteinlerinin daha stabil olmasına ve aktivitesinde daha az kayba yol açmış olması şeklinde yorum yapılmaktadır.

3.4 İmmobilize Çörekotu Lipaz Preparatlarının İnaktivasyon Kinetik Değerlerinin İncelenmesi

Üç farklı yöntemle hazırlanmış immobilize enzim örneklerinin stabilitiesini incelemek için, bu enzimlere ait inaktivasyon kinetik değerlerinin doğal enzimin inaktivasyon kinetik değerlerine göre ve birbirlerine göre farklı olup olmadığına bakılmıştır. Bilindiği üzere, inaktivasyon hız sabitlerinin küçülmesi, yarılanma ömrünün artması, inaktivasyon enerjisinin yükselmesi gibi kinetik değerlerdeki değişim enzim stabilitesinin önemli bir göstergesidir. Bu değişimlerin gerçekleşmesi, mukayese edilen örneğe göre bu enzimin daha stabil olduğunu gösterir. Bu amaçla, çalışmamızın bu bölümünde doğal enzim ile 3 farklı yöntemle hazırlanmış immobilize enzim preparatlarının inaktivasyon kinetik değerleri belirlenmiş ve mukayesesi yapılmıştır.

Lipaz ekstraktının ve immobilize enzimlerinin inaktivasyonları Bölüm 3.2.5' de açıklanan yöntemle göre ayrı ayrı incelenmiştir. Çalışmamızın bu bölümünde, lipaz ekstraktının inaktivasyonu bizzat tarafımızdan yapılmamış olup, aynı zamanda ve aynı tohum örnekleri kullanılarak yürütülmüş Şehnaz Ünsal' a ait [164] yüksek lisans tezinde yer almış değerler kullanılmıştır. Sözü geçen bu çalışmada, lipaz ekstraktı 35, 40, 45 ve 50 °C' larda 0-60 dakika ısıtılma tabi tutulmuş, belirlenen süre sonunda enzimin kalan aktivitesi saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.18' de verilmiştir.

Tablo 3.18 Çörekotu lipaz ekstraktının (serbest enzimin) inaktivasyonu.

Sıcaklık (°C)	Zaman (dak)	Aktivite (A _t) (U/mg)	A _t /A ₀	ln (A _t /A ₀)
35	0	0,441	1,0	0,0
	15	0,442	0,957	-0,044
	30	0,383	0,868	-0,141
	45	0,377	0,855	-0,157
	60	0,351	0,796	-0,228
40	0	0,517	1,0	0,0
	15	0,446	0,863	-0,147
	30	0,398	0,770	-0,261
	45	0,367	0,710	-0,343
	60	0,317	0,613	-0,489
45	0	0,494	1,0	0,0
	15	0,345	0,698	-0,359
	30	0,236	0,478	-0,798
	45	0,160	0,324	-1,127
	60	0,109	0,221	-1,510
50	0	0,475	1,0	0,0
	15	0,235	0,495	-0,703
	30	0,115	0,242	-1,419
	45	0,053	0,112	-2,189
	60	0,028	0,059	-2,830

Tablo 3.18’ de yer alan ln (A_t/A₀) değerlerinin her sıcaklık için zamanla değişim doğruları Şekil 3.11’ de görülmektedir.

Tampon çözeltiden, aseton ve hekzan ilave edilmiş tampon çözeltilerden hazırlanmış immobilize enzimlerin inaktivasyonlarını incelemek için, örnekler Bölüm 3.2.5’ de açıklanan prosedüre göre 40 °C, 45 °C, 50 °C ve 60 °C’ larda 0-150 dakika ısıtılma işlemine tabi tutulmuş ve zamanla oluşan aktivite kayıpları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.19-3.21’ de verilmiştir. Benzer şekilde immobilize enzimlerin farklı sıcaklıklarda deneysel olarak saptanmış Ln(A/A₀) değerlerinin zamanla değişim doğruları da şekil 3.12-3.14 gösterilmiştir.

Tablo 3.19 Tampon çözeltiden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının inaktivasyonu.

Sıcaklık (°C)	Zaman (dak)	Aktivite (A _t) (U/mg)	A _t /A ₀	ln (A _t /A ₀)
40	0	3,48	1,0	0,0
	30	3,34	0,960	-0,041
	60	3,10	0,891	-0,115
	90	2,96	0,851	-0,161
	120	2,89	0,830	-0,186
	150	2,74	0,787	-0,240
45	0	3,51	1,0	0,0
	30	2,95	0,841	-0,173
	60	2,63	0,749	-0,289
	90	2,26	0,644	-0,440
	120	1,90	0,541	-0,614
	150	1,63	0,464	-0,768
50	0	3,59	1,0	0,0
	30	2,56	0,713	-0,338
	60	1,96	0,546	-0,605
	90	1,38	0,384	-0,958
	120	1,03	0,287	-1,250
	150	0,74	0,206	-1,580
60	0	3,56	1,0	0,0
	15	1,29	0,362	-1,014
	30	0,47	0,132	-2,034
	45	-	-	-

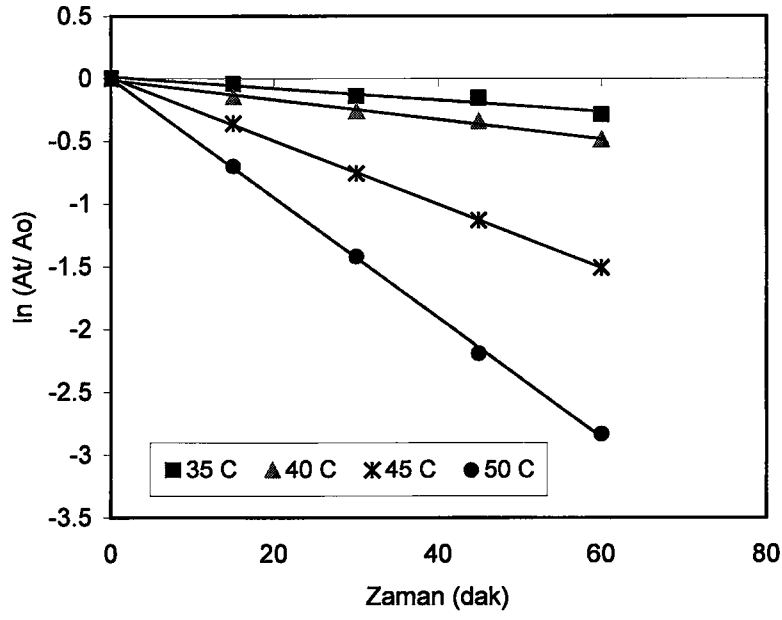
Tablo 3.20 Aseton/Tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının inaktivasyonu.

Sıcaklık (°C)	Zaman (dak)	Aktivite (A _t) (U/mg)	A _t /A ₀	ln (A _t /A ₀)
40	0	5,77	1,0	0,0
	30	5,59	0,969	-0,032
	60	5,24	0,908	-0,097
	90	5,13	0,889	-0,118
	120	5,01	0,868	-0,142
	150	4,69	0,813	-0,207
45	0	5,82	1,0	0,0
	30	5,09	0,875	-0,134
	60	4,45	0,765	-0,268
	90	4,11	0,706	-0,348
	120	3,61	0,620	-0,478
	150	3,07	0,528	-0,639
50	0	5,87	1,0	0,0
	30	4,72	0,804	-0,218
	60	3,69	0,629	-0,464
	90	2,83	0,482	-0,729
	120	2,34	0,399	-0,920
	150	1,81	0,308	-1,178
60	0	5,90	1,0	0,0
	15	2,55	0,432	-0,840
	30	1,15	0,195	-1,635
	60	0,45	0,076	-2,579

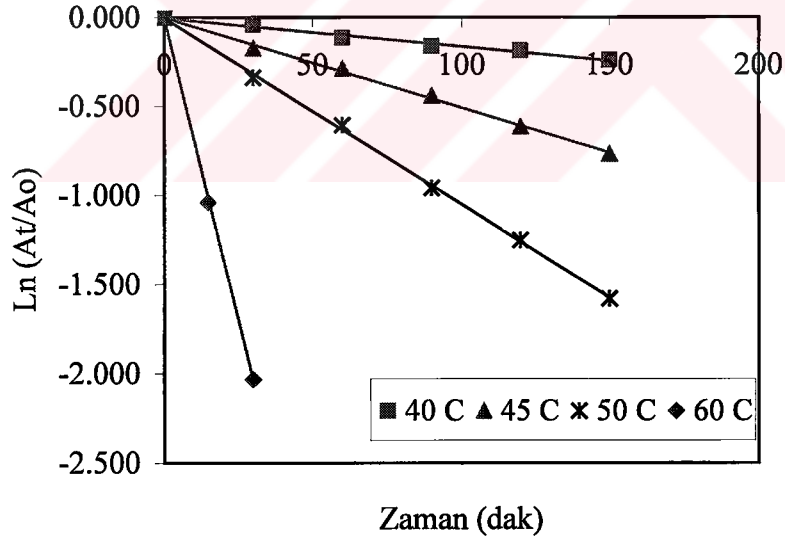
Tablo 3.21 Hekzan/Tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının inaktivasyonu.

Sıcaklık (°C)	Zaman (dak)	Aktivite (A _t) (U/mg)	A _t /A ₀	ln (A _t /A ₀)
40	0	11,53	1,0	0,0
	30	11,07	0,960	-0,041
	60	10,79	0,936	-0,066
	90	10,64	0,923	-0,080
	120	10,37	0,899	-0,106
	150	10,23	0,887	-0,120
45	0	11,61	1,0	0,0
	30	10,70	0,922	-0,081
	60	10,08	0,868	-0,142
	90	8,94	0,770	-0,261
	120	8,24	0,710	-0,342
	150	7,95	0,685	-0,379
50	0	11,48	1,0	0,0
	30	9,76	0,850	-0,162
	60	7,86	0,685	-0,378
	90	6,83	0,595	-0,520
	120	5,92	0,516	-0,661
	150	4,74	0,413	-0,884
60	0	11,69	1,0	0,0
	15	5,94	0,508	-0,678
	30	3,59	0,307	-1,181
	45	1,61	0,138	-1,978
	60	0,94	0,080	-2,530

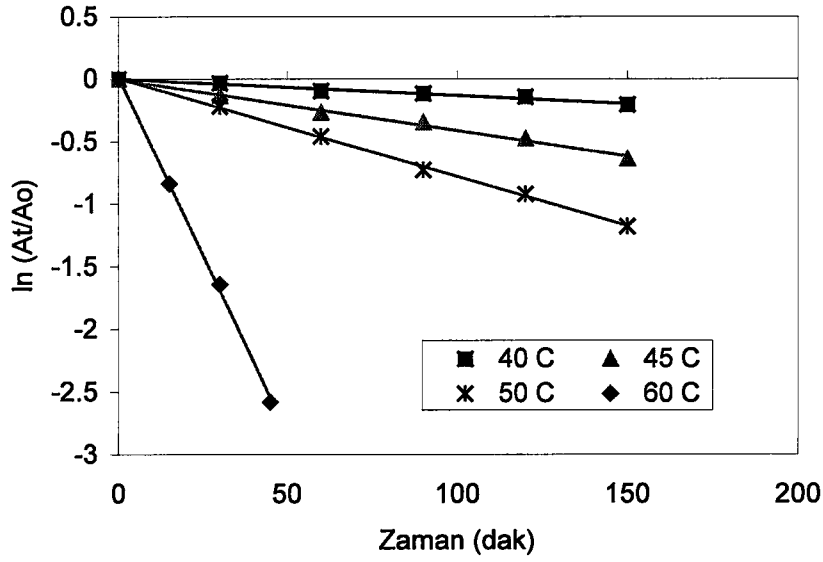
Dr. Yücel ÖZDEMİR
BİYOKİMYA
BİYOKİMYA



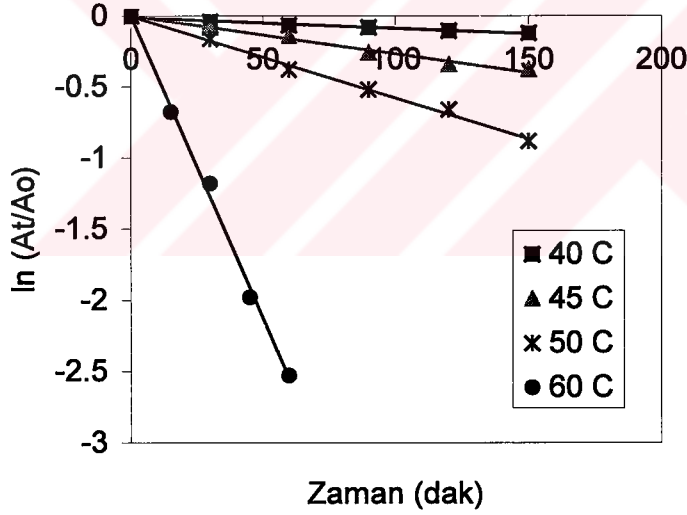
Şekil 3.11 Çörekotu lipaz ekstraktının inaktivasyonu.



Şekil 3.12 Tampon çözeltiden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazını inaktivasyonu.



Şekil 3.13 Aseton/Tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının inaktivasyonu.



Şekil 3.14 Hekzan/Tampon çözeltisinden hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının inaktivasyonu.

Şekil 3.11- 3.14' de yer alan doğruların eğimlerinden her sıcaklık için enzimin inaktivasyon hız sabitleri (k_i) hesaplanmıştır. Serbest ve immobilize enzimlerin bu belirlenmiş (k_i) değerlerinden, her sıcaklık için enzimlerin yarılanma ömürleri ($t_{0.5}$) de (3.7) no.lu formül kullanılarak saptanmıştır. İmmobilize enzimler için ayrıca her

sıcaklık için hesaplanan bu $t_{0.5}$ değerleri kullanılarak o sıcaklıktaki stabilizasyon faktörleri (SF) (3.8) no.lu formülden hesaplanmıştır

Deneysel olarak saptanan bu değerlerin (k_i , $t_{0.5}$ ve SF) mukayesesini topluca yapabilmek için, serbest enzime ve immobilize enzim örneklerine ait inaktivasyon kinetik değerleri Tablo 3.22' de verilmiştir.

Tablo 3.22 Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzimlerine ait inaktivasyon kinetik değerleri.

Enzim Şekli	Sıcaklık (°C)	k_i (dak ⁻¹)	$t_{0.5}$ (dak)	SF
Serbest	40	0,0823	84,2	-
	45	0,0252	27,5	-
	50	0,0483	14,3	-
	60	0,3300	2,1	-
İmmobilize (Tampon)	40	0,00160	433,1	5,14
	45	0,00503	137,8	5,01
	50	0,01045	66,3	4,64
	60	0,0753	9,2	4,38
İmmobilize (Aseton/Tampon)	40	0,0121	570,9	6,78
	45	0,00409	169,4	6,16
	50	0,0798	86,8	6,07
	60	0,0563	12,3	5,86
İmmobilize (Hekzan/Tampon)	40	0,000788	879,4	10,44
	45	0,00258	268,6	9,77
	50	0,00565	122,7	8,58
	60	0,0447	15,5	7,38

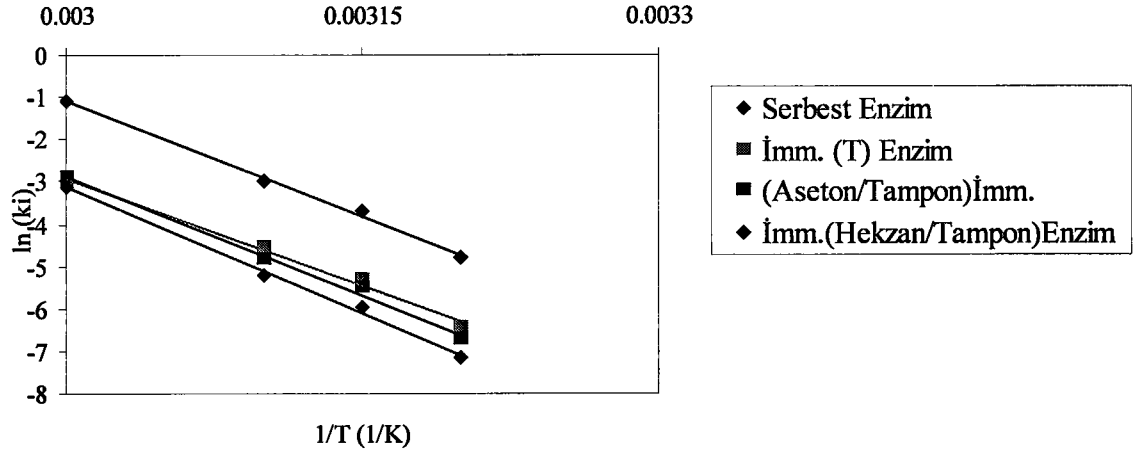
Tablo 3.22' nin incelenmesi ile, immobilizasyonun enzime stabilite kazandırdığı net olarak ortaya çıkmıştır. Her üç yöntemle hazırlanmış immobilize enzim örneklerinde, her sıcaklıkta immobilize enzimlerin serbest enzime kıyasla inaktivasyon hız sabitleri küçülmüş, dolayısıyla enzimlerin yarılanma ömrü uzamıştır. Direkt tampon çözeltiden hazırlanmış immobilize enzimin serbest enzime göre, 40-60 °C arasında stabilitesinin 5.1-4.4 kat artmış olduğu görülmektedir. Aseton-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize enzimde ise stabilitenin biraz daha artmış olduğu, aynı sıcaklıklarda 6.8-5.9 kat daha yüksek değerlere ulaştığı anlaşılmaktadır. İmmobilizasyonda ortama aseton ilavesinin immobilize enzim stabilitesini, direkt

tampon çözeltiden hazırlanmış immobilize enzim örneğine göre yaklaşık % 30 daha arttırmıştır. En stabil immobilize enzim ise hekzan-tampon çözeltiden hazırlanmış olmalıdır. Serbest enzime göre bu enzimin stabilitesi 40-60 °C' lar da 10.4-7.4 kat artış göstermektedir. Bu enzim, asetonlu ortamda hazırlanmış olan örneğe göre de yaklaşık % 50 daha yüksek stabilizeye sahiptir. Immobilize enzimler, serbest enzime göre daha stabildirler. Immobilizasyon enzim stabilizasyon yöntemlerinden biridir, bizim çalışma koşullarımızda çörekotu lipazının optimum sıcaklık olan 40 °C' de ömrünün immobilizasyonla 5-10 kat arttırılmış olması iyi bir netice olarak değerlendirilebilir.

Çörekotu lipaz enziminin inaktivasyon aktivasyon enerjisine, immobilizasyonun ve immobilizasyon yönteminin etkisinin görebilmek için, Arrhenius denkleminin lineerize edilmiş formu (3.6 eşitliği) kullanılarak (bak. Bölüm 3.2.5) serbest ve immobilize enzim örneklerine ait inaktivasyon aktivasyon enerjileri hesaplanmıştır. Bunun için deneysel olarak belirlenmiş (k_i) değerlerinin ($1/T$) ile değişim doğruları çizilmiş ve bu doğruların eğimlerinden E_i (Aktivasyon enerjisi) değerleri saptanmıştır. $\ln(k_i)$ değerlerinin ($1/T$) ile değişim doğruları şekil 3.15, grafiksel olarak saptanmış E_i değerleri ise Tablo 3.23'de verilmiştir.

Tablo 3.23 Serbest ve immobilize çörekotu lipazının inaktivasyon aktivasyon enerjisi.

Enzim	İnaktivasyon Aktivasyon Enerjisi (kJ/mol)
Serbest	150,2
İmmobilize (Tampon)	155,8
İmmobilize (Aseton/Tampon)	157,9
İmmobilize (Hekzan/Tampon)	162,2



Şekil 3.15 Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzimlerinin inaktivasyon hız sabitlerinin sıcaklıkla değişimi.

Tablo 3.23' den görüldüğü üzere, immobilizasyon etkisiyle enzimin inaktivasyon aktivasyon enerjisinde artma olmuştur. Aktivasyon enerjisi artışı, inaktivasyon olayının daha zor gerçekleştiğini göstermektedir. En yüksek artış hekzan ortamında hazırlanmış immobilize enzim örneğinde gözlenmiştir.

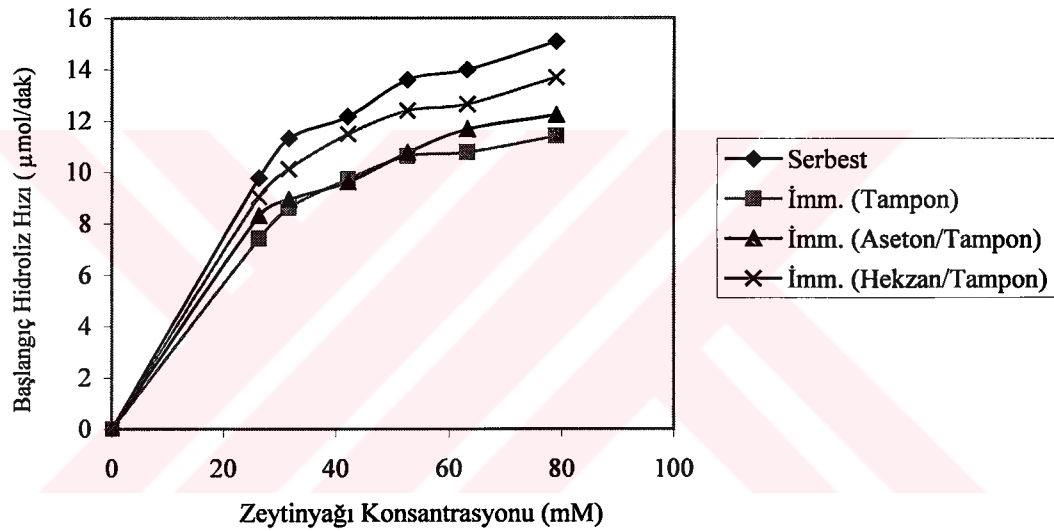
3.5 İmmobilize Çörekotu Lipaz Preparatlarının Km ve Vmax Kinetik Değerlerinin İncelenmesi

Çörekotu lipaz enziminin kinetik parametrelerine (K_m ve V_{max}), immobilizasyonun ve immobilizasyon yönteminin etkisini araştırmak için, serbest enzim ile optimum koşullarda üç farklı yönteme göre hazırlanmış immobilize enzim örneklerinin ayrı ayrı K_m ve V_{max} değerleri belirlenmiştir. Substrat olarak zeytinyağı seçilmiş ve zeytinyağının hidroliz reaksiyonlarında bu enzim örnekleri katalizör olarak kullanılmıştır. Zeytinyağı konsantrasyonu 20-80 mM arasında değiştirilerek substrat konsantrasyonunun başlangıç hidroliz hızına olan etkisi incelenmiştir. Başlangıç hidroliz hızları Bölüm 3.2.6' da açıklanan çalışma yöntemine göre belirlenmiştir.

Serbest enzim ve aynı enzimden hazırlanmış immobilize enzimler ile yürütülmüş hidroliz deneylerine ait sonuçlar Tablo 3.24' de verilmiş ve ayrıca bu deneyler için başlangıç hidroliz hızlarının zeytinyağı konsantrasyonu ile değişim eğrileri Şekil 3.16' da gösterilmiştir.

Tablo 3.24 Zeytinyağının serbest ve immobilize çörekotu lipaz örnekleri ile hidrolizinde, başlangıç hidroliz hızlarının zeytinyağı konsantrasyonu ile değişimi.

Zeytinyağı konsantrasyonu (mM)	Başlangıç Hidroliz Hızı ($\mu\text{mol/dak}$)			
	Serbest	İmmobilize (Tampon)	İmmobilize (Aseton/Tampon)	İmmobilize (Hekzan/Tampon)
26,3	9,78	7,42	8,31	9,05
31,6	11,33	8,62	8,94	10,13
42,1	12,18	9,73	9,62	11,50
52,6	13,60	10,62	10,76	12,40
63,2	14,00	10,78	11,68	12,66
79,0	15,31	11,42	12,24	13,70

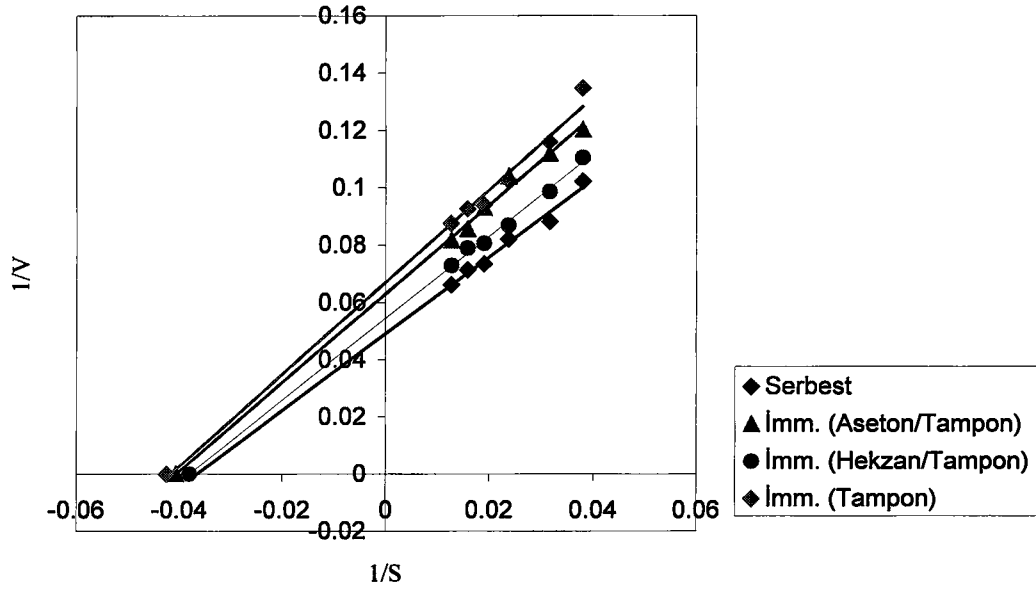


Şekil 3.16 Zeytinyağının serbest ve immobilize çörekotu lipaz örnekleri ile hidrolizinde, başlangıç hidroliz hızlarının zeytinyağı konsantrasyonu ile değişimi

Şekil 3.16' dan, zeytinyağı hidrolizinde başlangıç hidroliz hızına zeytinyağı konsantrasyonunun etkisi olduğu görülmektedir. Reaksiyon ortamına aynı U' lik aktivite gösterecek şekilde enzim örnekleri ilave edilmiş olmasına rağmen, immobilize enzimlerin kullanıldığı deneylerde hidroliz başlangıç hızlarının serbest enzime göre bir miktar düşük olduğu gözlenmiştir.

İmmobilizasyonun ve immobilizasyon ortamının serbest enzimin K_m ve V_{max} değerlerini nasıl etkilediğini anlamak için, her enzim örneği için elde edilen deneysel

veriler kullanılarak Lineweaver-Burk grafikleri çizilmiş ve Şekil 3.17’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.17 Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzimleri ile hidroliz deneylerinde, $(1/V)$ değerlerinin $(1/S)$ değerleri ile değişimi.

Şekil 3.17’ den, tüm incelenen hidroliz reaksiyonlarında, $(1/V)$ değerlerinin $(1/S)$ ile lineer değiştiği görülmektedir. Bu doğruların x ve y eksenlerini kestiği noktalardaki değerlerden K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmış ve saptanan bu değerler Tablo 3. 25’ de topluca verilmiştir.

Tablo 3.25. Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzimi örneklerinin K_m ve V_{max} Değerleri.

Enzim	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol/dak}$)
Serbest	27.24	20.33
İmmobilize (Tampon)	23.90	14.90
İmmobilize (Aseton/Tampon)	24.50	15.80
İmmobilize (Hekzan/Tampon)	26.30	18.40

İmmobilizasyon ile doğal enzimin K_m ve V_{max} değerlerinin bir miktar azaldığı Tablo 3.25’ den anlaşılmaktadır. Hekzan-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize enzimin K_m ve V_{max} değerleri serbest enzime oldukça yakın olduğu,

buna karşılık diğer immobilize enzim örneklerinin bu kinetik değerlerinin birbirlerine pratik olarak eşit olduğu söylenebilir.

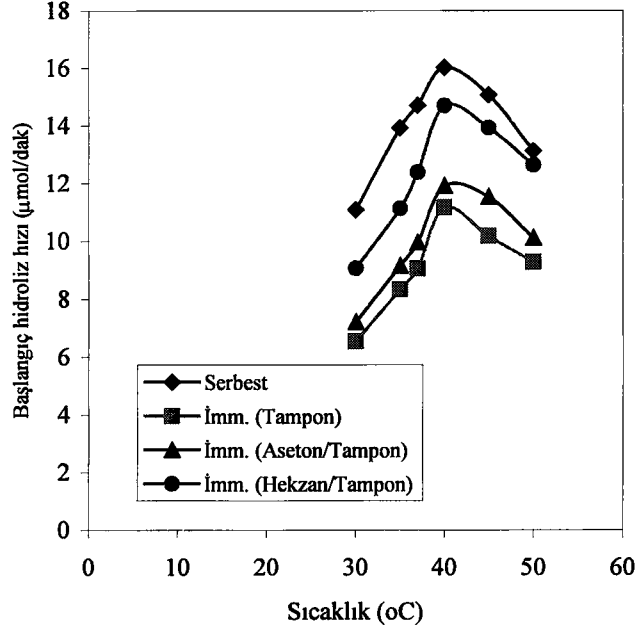
3.6 İmmobilize Çörekotu Lipaz Preparatlarının Hidroliz Aktivasyon Enerjisi Değerlerinin İncelenmesi

Çalışmamızın bu bölümünde, çörekotu lipaz enziminin immobilize edilmesi ile, enzimin optimum sıcaklığının ve hidroliz aktivasyon enerjisinin değişme gösterip göstermediği incelenmiştir. Bu amaçla, Bölüm 3.2.7’ de açıklanan çalışma yöntemine göre, serbest ve immobilize enzim örnekleri ile zeytinyağının 30-50 °C’ da hidroliz reaksiyonları yürütülmüştür. Bu hidroliz reaksiyonlarında elde edilmiş başlangıç hidroliz hızları Tablo 3.26’ da, bu sonuçların grafiksel görünümü ise topluca Şekil 3.18’ de verilmiştir.

Şekil 3.18’ den, çörekotu lipaz enziminin immobilize edilmesi ile enzimin optimum sıcaklığında değişme olmadığı ve her immobilize örnek için yine optimum sıcaklığın 40 °C olduğu anlaşılmaktadır. Sıcaklığın 40 °C’ nin üstüne çıkarılmasıyla özellikle 50 °C’ de enzimin başlangıç hidroliz hızlarının düşmesi enzimde inaktivasyonun başlamış olmasından kaynaklanmaktadır. Bundan dolayı hidroliz aktivasyon enerjisinin saptanmasında, 45 ve 50 °C’ larda elde edilmiş değerler kullanılmamıştır.

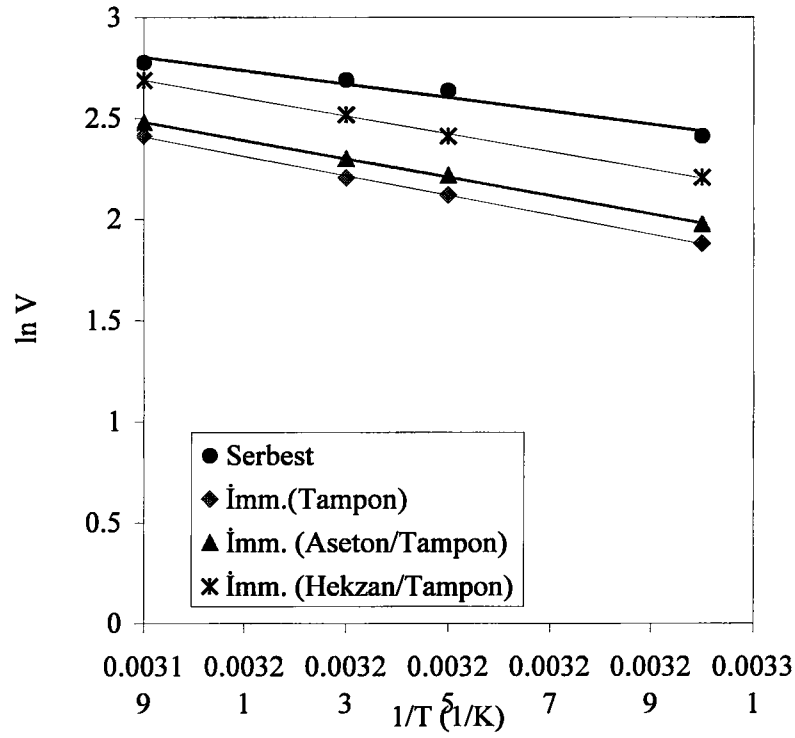
Tablo 3.26 Zeytinyağının serbest ve immobilize çörekotu lipaz örnekleri ile hidrolizinde, başlangıç hidroliz hızlarının sıcaklık ile değişimi.

Sıcaklık (°C)	Başlangıç Hidroliz Hızı (µmol/dak)			
	Serbest	İmmobilize (Tampon)	İmmobilize (Aseton/Tampon)	İmmobilize (Hekzan/Tampon)
30	11,09	6,54	7,21	9,07
35	13,94	8,34	9,16	11,14
37	14,71	9,06	9,96	12,39
40	16,04	11,17	11,91	14,70
45	15,08	10,18	11,54	13,94
50	13,12	9,28	10,12	12,64



Şekil 3.18 Zeytinyağının serbest ve immobilize çörekotu lipaz örnekleri ile hidrolizinde, relatif başlangıç hidroliz hızlarının sıcaklık ile değişimi

Çörekotu lipazının serbest ve immobilize formları için, hidroliz aktivasyon enerjilerinin saptanmasında, 30-40 °C' larda elde edilmiş başlangıç hidroliz hız değerleri ve Arrhenius eşitliği (3.10) kullanılarak , $\ln (1/V)$ değerlerinin $(1/T)$ ile değişim doğruları çizilmiş ve elde edilen bu doğruları eğimlerinden serbest ve immobilize lipaz enzimlerinin hidroliz aktivasyon enerjileri hesaplanmıştır. Şekil 3. 19'da incelenen bu enzim örneklerine ait başlangıç hidroliz hızlarının sıcaklık ile değişim doğruları ve Tablo 3.27' de de hesaplanan hidroliz aktivasyon enerjileri verilmiştir.



Şekil 3.19 Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzim örneklerinin Arhenius eşitliğine göre başlangıç hidroliz hızlarının sıcaklık ile değişimi.

Tablo 3.27 Serbest ve immobilize çörekotu lipazının hidroliz aktivasyon enerjisi.

Enzim	Hidroliz Aktivasyon Enerjisi (kJ/mol)
Serbest	32,6
İmmobilize (Tampon)	35,2
İmmobilize (Aseton/Tampon)	34,7
İmmobilize (Hekzan/Tampon)	33,9

Tablo 3.27' den immobilize enzimler için hidroliz aktivasyon enerjilerinin serbest enzime göre biraz yükselmiş olduğu anlaşılmaktadır.

3.7 İmmobilize Çörekotu Lipaz Enziminin Tekrarlı Kullanımı ve Solvent Ortamında Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

İmmobilize çörekotu lipaz enziminin tekrarlı olarak hidroliz deneylerinde kullanılabilirliğini tespit edebilmek için, immobilize enzim örnekleri kullanılarak zeytin yağının hidrolizi peş peşe 4 kez tekrarlanmıştır. Hidroliz reaksiyonları, Bölüm 3.2.8’ de açıklanan prosedüre göre, tamamiyle aktivite tayininde uygulanan koşullarda 30 dakika yürütülmüştür. Herbir reaksiyondan sonra ortamdan süzülerek alınan immobilize enzim hekzanla yıkanmış, kurutulmuş ve mevcut aktivitesi belirlendikten sonra müteakip hidroliz deneyinde tekrar kullanılmıştır. Ancak deneylerimizde, hekzan-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize örnek dışında diğer immobilize enzimler ile tekrarlı ve yeterli sonuçlar alınamamıştır. Bundan dolayı Tablo 3.28’ de sadece bu immobilize enzime ait başlangıç ve 1-4. kez kullanımından sonra gösterdiği aktivite değerleri verilmiştir.

Tablo 3.28 Hekzan-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize çörekotu lipazının hidroliz reaksiyonunda tekrarlı kullanımı.

Enzim	Aktivite (U/g selit)	Aktivite kaybı (%)
Orijinal	12,06	-
1. Kullanımdan sonra	10,32	14,4
2. Kullanımdan sonra	9,58	20,6
3. Kullanımdan sonra	9,08	24,7
4. Kullanımdan sonra	8,33	30,9

Tablo 3.28’ den, hekzan-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize enzimin tekrarlı olarak hidroliz reaksiyonlarında kullanılabileceği anlaşılmaktadır. Her uygulamada enzimin aktivitesinde bir miktar kayıp olmaktadır. En yüksek kayıp ilk uygulamada gözlenmiştir. Büyük bir olasılıkla ilk reaksiyon esnasında selite zayıf bağlarla tutunmuş olan bazı enzim molekülleri çözeltiye geçmiş olmalıdır. Daha sonra daha düşük değerlerde aktivitede kayıplar olmuştur. Sonuç olarak 4 kez kullanım sonunda immobilize enzim orijinal aktivite değerinin % 70 kadar aktivite göstermektedir ki bu değer de enzimin oldukça iyi performans gösterdiğini vurgulamaktadır.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise yine aynı immobilize enzim örneğinin solventli ortamda kullanılabilirliği incelenmeye alınmıştır. Bu amaçla, bu enzim ile zeytinyağının hekzan ortamında hidroliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarda, 0,5 mL zeytinyağı 10 mL çözelti ortamında 0,4 g immobilize enzimle reaksiyona sokulmuş ve reaksiyon sonucunda açığa çıkan yağ asitlerinin miktarı belirlenmiştir. Bu reaksiyonlarda hekzana hacmen % 3-50 arasında değişen farklı miktarlarda su ilave edilmiş ve su miktarının reaksiyona olan etkisi incelenmiştir. Deneylerimizin sonucunda solventli ortamda reaksiyon için gerekli olan suyun optimum değeri de saptanmıştır. Tablo 3.29' da farklı miktarda su içeren hekzan ortamında aynı miktarda enzimin zeytin yağından açığa çıkardığı yağ asitlerinin miktarları verilmiştir.

Tablo 3.29 Hekzan ortamında zeytin yağının immobilize çörekotu enzimi ile hidrolizinde enzim aktivitesine suyun etkisi.

Su miktarı	Yağ asitleri miktarı (μ mol)	Aktivite değişimi (%)
Orijinal enzim	94,5	100
Suyla doygun hekzan	101,5	107,4
% 3 su	89,6	94,8
% 5 su	91,5	96,8
% 7 su	99,5	105,3
% 10 su	93,5	98,9
% 50 su	80,6	85,3

Tablo 3.29' dan görüldüğü üzere immobilize çörekotu enzimi hekzan ortamında, ortamda reaksiyona girebilmesi için gerekli su olduğu takdirde sulu ortama göre daha etkin olarak zeytin yağını hidroliz etmektedir. Enzimin su ile doygun hekzan veya % 7 su içeren hekzan-su karışımında görünen aktivitesi ortalama % 6 artmıştır. Su miktarının % 50 değerine artırılmasıyla aktivitede bir miktar düşme gözükmemektedir. Bu durum solventin etkisiyle moleküllerin bir miktar yapısal değişim dolayısıyla aktivite kaybına uğramış olması ile açıklanabilir. Muhtemelen düşük su konsantrasyonlarında da enzimin solventten etkilenmesi olmuştur. Fakat

reaksiyonun hızlanmasından dolayı enzimde gerçekleşmiş olan bu yapısal aktivite kaybı farkedilememektedir.

3.8 İmmobilize Çörekotu Lipaz Enziminin Substrat Seçiciliğinin İncelenmesi

İmmobilize çörekotu lipaz enziminin substrat seçiciliğinin olup olmadığını incelemek için, hekzan–tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize enzim örnekleri kullanılarak 8 farklı yağın hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Hidroliz deneylerinde kullanılan yağlar, zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, boraj yağı, pamuk çekirdeği yağı, hint tohumu yağı, domuz yağı ve menhaden balık yağıdır. Bu yağlara ait yağ asitleri bileşimleri Tablo 3.30-3.32’ de verilmiştir.

Tablo 3.30 Ayçiçek, boraj, soya, pamuk ve zeytin yağı yağ asitlerinin bileşimleri.

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi				
	Ayçiçek yağı	Boraj yağı	Soya yağı	Pamuk yağı	Zeytin yağı
14:0	0,1	0,1	0,1	0,8	-
15:0	-	-	-	0,6	-
16:1	0,1	0,2	-	0,7	0,7
16:0	6,2	10,8	10,5	21,0	11,2
18:3	-	21,9	8,3	0,1	-
18:2	71,1	38,1	54,5	54,1	6,4
18:1	17,0	15,2	22,3	19,3	77,9
18:0	4,4	3,8	3,2	2,5	2,9
20:1	0,1	4,5	0,4	0,2	0,4
20:0	0,2	0,3	0,2	0,2	0,5
22:1	0,3	3,0	-	0,3	-
22:0	0,3	0,1	0,5	0,1	-
24:1	-	1,9	-	0,1	-
24:0	0,2	0,1	-	-	-

Tablo 3.31 Menhaden balık yağı yağ asitleri bileşimi.

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi
14:0	6,6
15:0	0,5
16:4	0,6
16:3	0,7
16:2	1,4
16:1	10,4
16:0	17,8
17:0	0,9
18:4	0,9
18:3	0,6
18:2	4,0
18:1	15,6
18:0	3,5
20:5	11,4
20:4	4,8
20:2	0,3
20:1	0,7
20:0	0,1
22:6	14,9
22:5	2,6
22:4	0,9
22:1	0,6
24:1	0,3

Tablo 3.32 Domuz yağı (lard oil) ve hint tohumu yağı yağ asitlerinin bileşimleri.

Yağ Asitleri	% Yağ Asitleri Bileşimi	
	Domuz yağı	Hint tohumu yağı
12:0	0,3	-
14:0	1,7	-
14:1	0,2	-
15:0	0,1	-
16:0	26,2	0,9
16:1	4,0	0,2
17:0	0,5	-
17:1	0,3	-
18:0	13,5	1,2
18:1	42,9	3,3
18:2	9,0	3,7
18:3	0,3	0,2
20:0	0,2	0,2
20:1	0,8	-
18:OH ^a	-	89,0
18:2 OH ^b	-	1,3

^a Risinoleik asit

^b Dihidroksi stearik asit

Serbest ve immobilize çörekotu lipazı kullanılarak bileşimleri yukarıda verilen tablolarda verilen yağların hidroliz deneyleri Bölüm 3.2.9 açıklanan çalışma yöntemine göre yürütülmüştür. Reaksiyonlar aktivite tayininde uygulanan koşullarda, 37 °C da, 20 dakika, pH 7, fosfat tampon çözeltisi ortamında, 0,5 mL yağa 1 mL serbest enzim veya eşdeğer aktivite verecek şekilde (≈ 400 mg) immobilize enzim ilave edilerek gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda enzim örneklerinin kullanılan yağlardan açığa çıkardığı yağ asitleri miktarı Tablo 3. 33’ de topluca verilmiştir.

Tablo 3.33 Serbest ve immobilize çörekotu lipazı ile çeşitli yağların hidrolizleri sonucunda açığa çıkan yağ asitleri miktarları.

Yağ cinsi	İmmobilize enzim Yağ asiti (μmol)	Serbest enzim Yağ asiti (μmol)
Ayçiçek yağı	95,9	113,9
Pamuk yağı	90,5	109,7
Zeytin yağı	88,4	89,5
Soya yağı	86,3	87,3
Hint tohumu yağı	82,0	84,1
Boraj yağı	76,7	77,8
Menhaden balık yağı	71,4	73,5
Domuz yağı (Lard)	47,9	49,0

Tablo 3.33’ den görüldüğü üzere, çörekotu lipaz enzim örnekleri ile 8 farklı yağın hidrolizi sonucunda açığa çıkan yağ asitlerinin miktarlarında da farklı değerler elde edilmiştir. Çörekotu lipazı substrat seciciliği göstermiştir. Reaksiyon ortamına aynı aktivite gösterecek şekilde serbest ve immobilize enzim konulduğu halde, bu iki enzim örneği ile aynı yağ için elde edilen değerler de birbirinden farklı olmuştur. Serbest enzimin hidrolizleme hızının biraz daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Yalnız önemli olan nokta, immobilizasyonla çörekotu lipazının substrat seçiciliğinin değişmediğidir. Çörekotu lipazının en kolay ayçiçek ve pamuk yağını hidrolizlediği görülmektedir. Pratik olarak zeytinyağı, soya ve hint tohumu yağlarına karşı aynı hidroliz aktivitesi gösterdiği, boraj ve balık yağını daha zor hidroliz ettiği anlaşılmaktadır. Domuz yağı reaksiyonun yürütüldüğü sıcaklıkta yarı katı halde bulunduğu için, enzim bu yağın hidrolizinde diğerlerine oranla çok daha az miktarda yağ asiti açığa çıkarabilmiştir.

Tablo 3.33’ de elde edilen sonuçlar ile yağların yağ asitleri bileşimleri ile bir bağlantı kurabilmek amacıyla, Tablo 3.30-3.32’ de sunulan verilerden faydalanılarak yağların içerdiği yağ asitleri doymuş, monodoymamış, didoymamış ve polidoymamış yağ asitleri olarak sınıflandırılmış ve Tablo 3.34’ de topluca verilmiştir.

Tablo 3.34 Ayçiçek, pamuk, zeytin, soya, hint tohumu, boraj, menhaden ve domuz yağı yağ asitlerinin çift bağına göre sınıflandırılması.

Yağ cinsi	Doymuş YA (%)	Monodoymamış YA (%)	Didoymamış YA (%)	Polidoymamış YA (%)	Hidroksilli YA (%)
Ayçiçek	11,4	17,5	71,1	-	-
Pamuk	25,2	20,6	54,1	0,1	-
Zeytin	14,6	79,0	6,4	-	-
Soya	14,5	22,7	54,5	8,3	-
Hint toh.	2,3	3,5	3,7	0,2	90,3
Boraj	15,2	24,8	38,1	21,9	-
Menhaden	29,4	27,5	5,7	37,4	-
Lard	42,5	48,2	9,0	0,3	-

Tablo 3.34 incelendiğinde, çörekotu lipazının kolaylıkla hidrolizleyebildiği ayçiçek ve pamuk yağının yüksek yüzdede linoleik asit içerdiği görülmektedir. Çörekotu lipazının linoleik asite karşı öncelik tanıdığı söylenebilir. Buna karşılık, relatif olarak ayçiçek ve pamuk yağına göre daha az hidroliz ettiği soya, boraj ve menhaden yağlarında ise gittikçe artan yüzde de polidoymamış yağ asitlerinin bulunması dikkate değerdir. Boraj yağı gamma-linolenik asit (GLA) ve balık yağı ise eikosapentaenoik asit (EPA) ile dokosaheksaenoik asit (DHA) içermektedir. Literatürde birçok lipazın GLA, EPA ve DHA asitlerine karşı negatif seçicilik gösterdiği bilinmektedir. Bu noktadan hareketle çörekotu lipazının bu polidoymamış yağ asitlerine olan seçiciliğinden dolayı bu asitleri içeren yağları daha zor hidroliz edebildiği söylenebilir. Soya ve pamuk yağında aynı yüzde de linoleik asit bulunmasına rağmen soya yağının daha az hidrolizlenebilmesi, soya yağ asitlerinde bulunan % 8 oranındaki polidoymamış asitlerinin negatif etkisi ile açıklanabilir.

Genel olarak, serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzim örneklerinin aynı substrat seçiciliği gösterdiği, her iki formuyla özellikle bünyesinde linolenik asiti yüksek oranda içeren yağları tercihi olarak daha fazla hidroliz ettiği ve polidoymamış yağ asitlerince zengin yağları ise daha az hidroliz edebildiği söylenebilir.

3.9 İmmobilize Çörekotu Lipaz Enziminin Yağ Asiti Seçiciliğinin İncelenmesi

Günümüzde γ -linolenik asitin (GLA) besin ve tıbbi açıdan değeri anlaşılmıştır, bu asitin kaynaklarından saflaştırılması, zenginleştirilmesi üzerine olan çalışmaları hızlandırmıştır. Bölüm 2. de GLA içeren yağlardan GLA' ca zengin ürünlerin eldesi için, çeşitli immobilize lipaz enzimlerinin kullanıldığı enzimatik hidroliz ve esterleşme reaksiyonları hakkında bilgi verilmiştir. Açıklanan çalışmalarda ticari mikrobiyal lipazlar denenmiş olup, bitkisel lipazlar kullanılarak GLA derişikleştirilmesi üzerine literatürde çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Sadece çimlenmiş rapiska ve Vernonia tohumlarından elde edilmiş lipazların GLA seçiciliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızın bu bölümünde, çörekotu lipaz enziminin, serbest ve immobilize formunun, γ -linolenik asite karşı bir seçiciliğinin olup olmadığını belirlemek için, çörekotu lipaz örnekleri ile boraj yağının hidrolizi gerçekleştirilmiş ve hidroliz ürünleri GLA zenginleşmesi açısından incelenmeye alınmıştır.

Hidroliz reaksiyonuna immobilizasyonun ve reaksiyon ortamının etkisini de tespit edebilmek amacıyla, 3 seri hidroliz reaksiyonu yürütülmüştür. 1. seri deneylerde direkt serbest enzim kullanılmıştır. Bölüm 3.2.9 da açıklanan çalışma yöntemine göre, 2 gram boraj yağına 50 mL lipaz ekstraktı (gram yağ başına 168 U serbest enzim) ilave edilmiş ve reaksiyon pH 6 tampon çözelti ortamında 40 °C da 77 saat sürdürülmüştür.

İmmobilize enzim kullanıldığı 2. ve 3. seri deneylerde ise hekzan-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize enzim örnekleri ile çalışılmıştır. Bu 2. ve 3. deneylerde farklı reaksiyon ortamlarında hidroliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. 2. seri deneylerde, 2 gram boraj yağı ve 55 mL tampon çözelti (pH 6) karışımına 168 U/g yağ olacak şekilde immobilize enzim ilave edilmiş ve reaksiyon sulu ortamda 40 °C' da 77 saat sürdürülmüştür. 3. seri deneylerde ise, reaksiyon ortamı olarak hekzan-su (50 mL hekzan-5 mL su) karışımı kullanılmıştır. Diğer bütün reaksiyon koşulları aynen sabit tutulmuştur.

Tampon çözelti ortamında serbest enzim ve hekzan ortamında immobilize enzim kullanılarak yürütülmüş boraj yağının hidroliz reaksiyonlarında reaksiyon esnasında

numune alımında ve alınan bu örneklerin analizlerinde herhangi bir sorun ile karşılaşılmadığı halde, tampon çözelti ortamında immobilize enzim kullanıldığı reaksiyonda ise gerek karışımın karıştırılmasında gerekse örnek alınmasında büyük sorunlar yaşanmıştır. Ayrıca alınan örneklerin analiz sonuçlarında da tekrarlı sonuçlar elde edilememiştir. Bundan dolayı 2-3 tekrardan sonra tampon çözelti ortamında immobilize enzimle boraj yağının hidrolizinin incelenmesinden vazgeçilmiştir.

Serbest enzim ve çözücü ortamında immobilize enzim ile yürütülmüş hidroliz reaksiyonlarında, reaksiyon esnasında 2, 4, 6, 8, 24, 48 ve 77 saat sonunda alınmış örneklerin bileşimleri, içerdiği TG (trigliserid), DG (digliserid), MG (monogliserid) ve YA (yağ asitleri) fraksiyonlarının miktarları, TLC-FID Iatroscan cihazıyla belirlenmiştir (bak. Bölüm 3.2.9). Boraj yağının direkt çörekotu lipaz ekstraktı (serbest enzim) ve hekzan ortamında immobilize enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşimlerinin zamanla değişimi değerleri Tablo 3. 35 ve 3.36’ da verilmiştir.

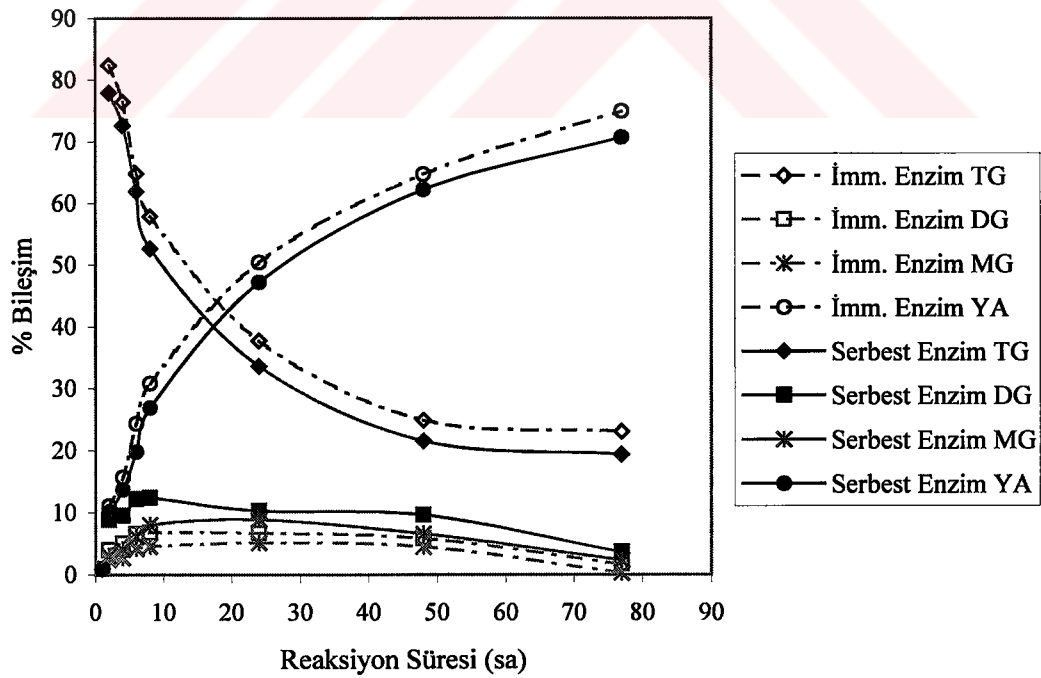
Tablo 3.35 Boraj yağının sulu ortamda serbest enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.

Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
2	77,91	8,87	3,08	10,14
4	72,66	9,51	4,10	13,73
6	61,90	12,21	6,11	19,78
8	52,65	12,45	8,01	26,89
24	33,61	10,33	8,86	47,20
48	21,57	9,66	6,56	62,21
77	19,39	3,61	2,31	70,69

Tablo 3.36 Boraj yağının hekzan ortamında 168 U/g yağ immobilize enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi.

Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
2	82,39	4,00	2,50	11,11
4	76,43	5,10	2,76	15,71
6	64,80	6,60	4,24	24,36
8	57,86	6,79	4,54	30,81
24	37,75	6,68	5,15	50,42
48	24,91	5,88	4,51	64,70
77	23,05	1,71	0,31	74,93

Tablo 3.35 ve 3.36' nın incelenmesiyle, aynı 168 U/g yağ enzim miktarında serbest ve immobilize enzim kullanılması halinde dahi boraj yağının hidroliz reaksiyonunun farklı mekanizmalarına göre gerçekleşmiş olduğu anlaşılmıştır. Aradaki farkı daha iyi görebilmek için, her iki reaksiyonda elde edilmiş ürün bileşimlerinin zamanla değişimi aynı grafik üzerinde, Şekil 3.20 de, gösterilmiştir.



Şekil 3.20 Boraj yağının serbest ve immobilize enzimle 40 °C da ve 185 U/g yağ enzim miktarında yürütülmüş hidrolizinde, ürün bileşiminin zamanla değişimi

Şekil 3.20' den, boraj yağının hidrolizinde ortamda hidrolizlenmeden kalan TG moleküllerinin zamanla değişim eğrilerinin her iki enzim ile hemen hemen aynı profili gösterdiği , ancak serbest enzim ile reaksiyonun immobilize enzim örneğine göre daha hızlı gerçekleşmiş olduğu anlaşılmaktadır. Reaksiyon ilk 8 saatte oldukça hızlı gerçekleşmiştir. Hidroliz süresinin 8 saatten 48 saate uzatılmasıyla TG miktarında yaklaşık yarılanma olurken, sürenin 48 saatten 77 saate çıkarılmasıyla ise pratik olarak bileşimde değişiklik olmadığı gözlenmektedir.

DG ve MG fraksiyonları açısından Şekil 3.20 incelendiğinde ise, serbest enzimle elde edilmiş hidroliz ürününde bulunan DG ve MG miktarlarının aynı koşullarda immobilize enzimle elde edilmiş olan ürünün içerdiği DG ve MG miktarlarına göre hemen hemen iki kat daha fazla olduğu açıkça görülmektedir. Diğer önemli bir fark ise, Tablo 3.37' den görüldüğü üzere, söz konusu olan bu DG fraksiyonlarının bileşimlerinde olan farktır. Tablo 3.37' den görüldüğü üzere, serbest enzimle yürütülmüş reaksiyonda, reaksiyonun hızlı gerçekleştiği ilk 8 saatte ortamda 1,3-DG miktarının 2-3 katı kadar 1,2-DG bulunmaktadır. Zaman ilerledikçe durum tersine dönmekte ve ortamdaki 1,3-DG miktarı 1,2-DG miktarının yaklaşık 2 katına çıkmaktadır. Immobilize enzimle yürütülmüş deneyde ise hidroliz ürününde oluşmuş DG fraksiyonunda 1,3-DG moleküllerince zengin olduğunu, zamana bağlı olarak 1,2-DG moleküllerinin 2-3 kat daha fazla oluştuğu gözlenmektedir.

Tablo 3.37 Boraj yağının serbest ve immobilize enzim ile hidrolizinde, DG ürünü bileşiminin zamanla değişimi.

Reaksiyon Süresi (saat)	Serbest Enzim		İmmobilize Enzim	
	1,2-DG	1,3-DG	1,2-DG	1,3-DG
2	6,23	2,64	1,21	2,79
4	6,61	2,90	1,41	3,69
6	7,40	4,81	1,67	4,93
8	8,44	4,01	1,55	5,24
24	4,03	6,30	1,19	5,49
48	3,24	6,42	1,16	4,72
77	0,93	1,68	0,66	1,05

MG moleküllerinin 1-MG veya 2-MG den ibaret olduğu hakkında, kullandığımız analiz yönteminin yetersizliğinden dolayı tespit yapılamamıştır. İatroscan analizlerinde sadece tek MG piki elde edilmiştir.

Serbest ve immobilize çörekotu lipazı kullanılarak yürütülmüş hidroliz deneylerinde, elde edilmiş reaksiyon ürünlerinin her bir komponentinde zamana bağlı olarak GLA'nın zenginleşip zenginleşmediğini görebilmek için, reaksiyon karışımından 8, 24 ve 77 saat sonunda alınmış örneklerin TG, DG, MG ve YA fraksiyonlarına ayrılması ve bu fraksiyonların yağ asitleri bileşimlerinin saptanması Bölüm 3.2.9 da açıklanan prosedüre uygun olarak yapılmıştır. Serbest ve immobilize enzimle yürütülmüş çalışmalara ait 8, 24 ve 77 saat sonunda her fraksiyonun yağ asitleri bileşimi sırasıyla Tablo 3.38-3.40 ve Tablo 3.40- 3.42 de verilmiştir.

Tablo 3.38 Boraj yağının serbest enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0,1	0,1	0,1	0,1
16:1	0,1	0,2	0,2	0,1
16:0	9,2	12,5	14,8	11,7
18:3	28,2	23,9	16,8	11,5
18:2	39,0	35,2	31,5	39,2
18:1	11,4	15,0	17,2	21,2
18:0	2,9	3,8	4,1	5,4
20:1	3,9	4,2	5,9	4,6
20:0	0,3	0,4	0,2	0,7
22:1	2,8	2,6	5,3	3,0
22:0	0,2	0,2	0,1	0,6
24:1	1,8	1,8	3,7	1,8
24:0	0,1	0,1	0,1	0,1
Doymuş YA	12,8	17,1	19,4	18,6
Monodoymamış YA	20,0	23,8	32,3	30,7
Didoymamış YA	39,0	35,2	31,5	39,2
GLA	28,2	23,9	16,8	11,5

Tablo 3.39 Boraj yağının serbest enzim ile hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.

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	0,1
16:0	7,7	11,6	20,0	9,9
18:3	35,5	30,0	19,9	11,8
18:2	38,1	34,6	27,3	40,6
18:1	10,3	13,1	19,5	19,6
18:0	2,0	3,6	4,8	6,9
20:1	2,2	3,5	4,2	5,5
20:0	0,3	0,3	-	0,4
22:1	1,7	1,8	2,6	2,3
22:0	0,1	0,1	-	0,7
24:1	1,7	1,1	1,6	1,9
24:0	0,1	-	-	0,2
Doymuş YA	10,3	15,7	24,8	18,2
Monodoymamış YA	16,1	19,7	28,0	29,4
Didoyamamış YA	38,1	34,6	27,3	40,6
GLA	35,5	30,0	19,9	11,8

Tablo 3.38 ve 3.39’ daki verilere göre, serbest enzim ile çalışıldığında, GLA ce zenginleşmenin TG ve DG fraksiyonlarında, özellikle TG fraksiyonunda gerçekleşmiş olduğu anlaşılmaktadır. Orijinal boraj yağında % 21,9 oranında bulunan GLA , TG fraksiyonunda 8 saat sonunda % 28,2’ e ve 24 saat sonunda % 35,5 ‘ e yükselmiştir. 8 saat sonunda GLA miktarında 1.28 kat ve 24 saat sonunda ise 1.62 kat zenginleşme gerçekleşmiştir. DG fraksiyonundaki zenginleşmenin daha az olduğu, 8 saat sonunda GLA miktarının 1.09 kat ve 24 saat sonunda ise bu değerin 1.36 kata ulaştığı gözlenmiştir. MG fraksiyonlarında ise herhangi bir zenginleşme söz konusu değildir.

Tablo 3.40 Boraj yağının serbest enzim ile hidrolizinde, 77 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0,1	-	-	0,2
16:1	0,1	0,1	-	0,1
16:0	9,5	8,2	18,9	11,8
18:3	38,0	39,0	24,2	17,3
18:2	22,4	29,1	28,9	43,2
18:1	13,7	12,6	18,0	15,4
18:0	4,9	3,4	3,3	4,3
20:1	5,3	3,6	4,5	4,2
20:0	0,3	-	-	0,3
22:1	3,3	2,3	1,1	1,0
22:0	0,1	-	-	0,2
24:1	2,2	1,7	1,1	1,8
24:0	0,1	-	-	0,2
Doymuş YA	15,0	11,6	22,2	17,0
Monodoymamış YA	24,6	20,3	24,7	22,5
Didoymamış YA	22,4	29,1	28,9	43,2
GLA	38,0	39,0	24,2	17,3

Y.C. FİSİKİ ÖLÇÜLERİN KONTROLÜ
MUTAKAATLİ YERİNE

Tablo 3.40' dan ise, reaksiyon süresinin 77 saate uzatılması ile, hidroliz ürünüdeki TG ve DG fraksiyonlarındaki GLA yüzdesinin sırasıyla % 38 ve % 39 değerlerine eriştiği anlaşılmaktadır. Bu koşullarda, söz konusu bu fraksiyonlardaki GLA zenginleşmesi 1.8 kat değerine erişmiştir. 77 saat sonunda MG fraksiyonunda bile % 10 mertebesinde GLA' in konsantre olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 3.41 Boraj yağının immobilize enzim ile hidrolizinde, 8 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0,1	0,1	-	0,2
16:1	0,2	0,1	0,1	0,1
16:0	9,6	8,1	14,9	14,7
18:3	27,9	39,8	18,2	9,1
18:2	38,1	30,2	28,6	36,7
18:1	13,2	12,0	24,4	18,8
18:0	3,5	3,2	3,9	6,3
20:1	3,7	3,3	5,1	6,8
20:0	0,2	0,2	0,1	0,4
22:1	2,6	1,8	3,9	4,1
22:0	0,1	0,1	-	0,3
24:1	0,7	1,1	0,8	2,4
24:0	0,1	-	-	0,1
Doymuş YA	13,6	11,7	18,9	22,0
Monodoymamış YA	20,4	18,3	34,3	32,2
Didoymamış YA	38,1	30,2	28,6	36,8
GLA	27,9	39,8	18,2	19,1

İmmobilize enzim ile yürütülmüş deneylerde ise, Tablo 3.41’ den görüldüğü üzere, 8 saat sonunda GLA ‘in yine TG ve DG fraksiyonlarında zenginleştiği, fakat serbest enzimle elde edilmiş sonuçlardan farklı olarak GLA ‘ in esas olarak DG fraksiyonunda konsantre olduğu anlaşılmaktadır. İçerisinde % 21,9 GLA bulunan orijinal boraj yağına göre, GLA yüzdesi DG de % 39,8 değerine yükselirken TG de ise % 27,9 değerine erişmiştir. TG fraksiyonunda % 27 zenginleşme, DG fraksiyonunda ise % 81 zenginleşme söz konusudur. Serbest enzime göre immobilize enzimle toplam olarak daha fazla GLA içeren TG ve DG fraksiyonları elde edilebilmiştir. 8 saat sonunda MG fraksiyonunda GLA zenginleşmesi görülmemiştir.

Tablo 3.42 Boraj yağının immobilize enzim ile hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0,1	0,1	0,1	0,2
16:1	0,3	0,2	-	0,2
16:0	7,3	8,4	17,7	15,1
18:3	34,7	42,9	25,0	9,4
18:2	37,1	28,8	29,3	38,8
18:1	11,8	12,7	18,3	18,0
18:0	2,7	2,0	3,4	6,6
20:1	2,8	2,6	3,6	5,6
20:0	0,1	0,9	0,1	0,5
22:1	1,9	1,0	1,3	3,6
22:0	-	0,1	-	0,3
24:1	1,1	0,2	1,2	1,6
24:0	0,1	0,1	-	0,1
Doymuş YA	10,3	11,6	21,3	22,8
Monodoymamış YA	17,9	16,7	24,4	29,0
Didoymamış YA	37,1	28,8	29,3	38,8
GLA	34,7	42,9	25,0	9,4

İmmobilize enzimle yürütölmüş hidroliz deneyinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri Tablo 3.42’ de görölmektedir. Tablo 3.42’ deki verilerden, GLA’in DG fraksiyonunda % 43 değeriine eriştiğı böylece bu fraksiyonda % 95 GLA zenginleşmesi oluşmuştur. TG fraksiyonundaki GLA yüzdesi 34,7 değeriine erişmiş olup zenginleşme % 58 oranında gerçekleşmiştir. MG fraksiyonunda ise bir miktar , % 14 oranında, GLA ‘in konsantre olduğı da tespit edilmiştir.

Tablo 3.43 Boraj yağının immobilize enzim ile hidrolizinde, 77 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri.

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	-	-	-	0,3
16:1	0,1	-	-	0,2
16:0	8,8	10,8	18,2	10,4
18:3	41,7	44,2	30,0	17,4
18:2	20,9	25,2	32,0	45,5
18:1	13,5	9,6	15,6	14,6
18:0	4,6	3,7	2,2	3,7
20:1	4,7	4,3	2,0	4,3
20:0	0,4	0,1	-	0,1
22:1	2,4	2,1	-	1,2
22:0	0,1	-	-	0,2
24:1	2,0	-	-	1,9
24:0	0,1	-	-	0,2
Doymuş YA	14,0	14,6	20,4	14,9
Monodoymamış YA	22,7	16,0	17,6	22,2
Didoymamış YA	20,9	25,2	32,0	45,5
GLA	41,7	44,2	30,0	17,4

Reaksiyon süresinin 77 saate çıkarılmasıyla, Tablo 3.43' de sunulan değerlere göre, TG ve DG ve MG fraksiyonlarındaki GLA zenginleşme sırası ile % 41,7, % 44,2 ve % 30,0 değerlerine yükselmiştir. Diğer bir deyişle, aynı fraksiyonlarda GLA sırasıyla 1,90, 2.01 ve 1.36 kat konsantre olmuştur.

Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzimi ile boraj yağının hidrolizi sonucu GLA ile zenginleşmiş hidroliz ürünleri elde edilebilmiştir. İmmobilize enzim ile hekzan ortamında mukayese edilen her zaman diliminde serbest enzime göre daha yüksek zenginleşme değerlerine ulaşılabilmiştir. Sonuçların mukayesesi Tablo 3.44' de topluca verilmiştir.

Tablo 3.44 Boraj yağının serbest ve immobilize enzim ile enzimatik hidrolizinde, ürün bileşenlerinde GLA içeriğinin zamana göre değişimi.

Zaman (saat)	% GLA							
	Serbest enzim				İmmobilize enzim			
	TG	DG	MG	YA	TG	DG	MG	YA
Orijinal Yağ	21,9	-	-	-	21,9	-	-	-
8	28,2	23,9	16,8	11,5	27,9	39,8	18,2	9,1
24	35,5	30,0	19,9	11,8	34,7	42,9	25,0	9,4
77	38,0	39,0	24,2	17,3	41,7	44,2	30,0	17,4

Bu bölümde elde etmiş olduğumuz sonuçların değerlendirilmesi ile, boraj yağının hidrolizinde reaksiyon süresinin artmasıyla GLA'ca daha zengin ürünler elde edilebileceği ortaya çıkarılmıştır. Ancak elde edilen ürünün miktarı yani gliserid karışımında bulunan GLA in miktarı ile YA fraksiyonuna geçen kayıp olarak düşünebileceğimiz GLA miktarı da önemlidir. Reaksiyon süresinin artmasıyla elde edilen TG, DG ve MG miktarlarının azalması ve YA miktarının artması dikkate alınarak, 8, 24 ve 77 saat sonunda GLA in gliserid karışımında (TG, DG ve MG karışımında) ve YA fraksiyonundaki dağılımı incelenmeye alınmıştır. Değerlendirmeler Tablo 3.45' de verilmiştir.

Tablo 3.45 Boraj yağının serbest ve immobilize enzim ile enzimatik hidrolizinde, Gliserid karışımı ile YA de bulunan GLA 'in zamana göre değişimi.

Zaman (saat)	Serbest enzim				İmmobilize enzim			
	Gliserid karışımı		YA		Gliserid karışımı		YA	
	Miktarı	% GLA	Miktarı	% GLA	Miktarı	% GLA	Miktarı	% GLA
Boraj yağı	100,0	21,9	-	-	100,0	21,9	-	-
8	73,1	26,3	26,9	11,5	69,1	28,6	30,8	9,1
24	52,8	33,1	47,2	11,8	49,6	37,8	50,4	9,4
77	29,3	38,8	70,7	17,3	25,1	44,1	74,9	17,4

Tablo 3.45' den, 100 gram boraj yağının serbest enzim ile hidrolizinde 8 saat sonunda 73 gram gliserid karışımı elde edilebileceği ve bu karışımın yağ asitlerinde % 26,3 GLA bulunacağı görülmektedir. Aynı koşullarda immobilize enzim kullanımı

ile 70 gram gliserid karışımı ele geçebileceği ve bunun GLA içeriğinin ise % 28,6 olacağı anlaşılmaktadır. Reaksiyon süresinin 24 saate çıkarılmasıyla elde edilebilecek gliserid karışımlarının serbest ve immobilize enzim kullanımı halinde sırasıyla 53 ve 50 gram olacağı ve bunların sırasıyla % 33 ve % 38 GLA içereceği görülmektedir. Aynı tablodan, reaksiyonun 77 saat sürdürülmesiyle ise gliserid karışımı miktarlarının hemen hemen yarılanacağı, serbest enzim kullanıldığı reaksiyonda 29 gram, immobilize enzim kullanımı durumunda ise 25 gram gliserid karışımının oluşacağı gözlenmektedir. Buna karşılık bu gliserid karışımlarında ise beklenen GLA zenginleşmelerinin gerçekleşmediği, GLA in ancak sırasıyla % 38 ve % 44 GLA değerlerine yükselebileceği anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, Çörekotu lipaz enzimi her iki formuyla hidroliz reaksiyonu esnasında gamma-linolenik asite karşı negatif seçicilik göstermiştir. Özellikle immobilize enzim ile boraj yağından enzimatik hidroliz yoluyla içerisinde % 38 GLA bulunan, 1.73 kat GLA'ca zenginleşmiş, gliserid karışımı elde edilebileceği ortaya çıkarılmıştır.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızın ilk bölümünde, çörekotu lipazının fosfat tampon çözeltisi ortamından selit üzerine adsorpsiyonunda ortam pH'nın ve ortamdaki protein miktarının adsorpsiyona olan etkisini incelenmiştir. Başlangıç protein konsantrasyonu 1,0-6,0 mg/mL arasında olacak şekilde hazırlanmış lipaz çözeltileri kullanılarak 25 °C da, pH 5, 6, 7 ve 8' de yürütülmüş deneyler sonucunda, adsorplanan enzim miktarının başlangıçta ortamdaki protein miktarı artmasıyla artış gösterdiği , ancak her pH' da, belli bir protein konsantrasyonundan sonra selite adsorplanan madde miktarında pek bir değişme olmadığı ve sistemin dengeye ulaştığı gözlenmiştir. Adsorpsiyona ortam pH'nın büyük etkisi olduğu, her protein konsantrasyonunda, en yüksek lipaz adsorpsiyonun pH 5 de gerçekleştiği ortam pH'nın yükselmesiyle adsorplanan madde miktarının da azaldığı tespit edilmiştir. PH'ın artmasıyla adsorplanan enzim miktarının azalması Kerzel ve arkadaşlarına göre [81] taşıyıcı üzerindeki aynı yüklü proteinler arasındaki elektrostatik etkileşim ile açıklanabilmektedir. Çörekotu lipazının izoelektrik noktası pH 4,5 [162] olduğundan, pH 5' de maksimum adsorpsiyon olması doğal bir sonuçtur. pH'ın artmasıyla enzim moleküllerinin negatif yük konsantrasyonu da artmakta, dolayısıyla taşıyıcı üzerinde aynı yüklü proteinler arasındaki itme kuvvetinin etkisiyle adsorbe olan protein miktarında azalma görülmektedir.
2. Fosfat tampon çözeltisinden her pH'da elde edilmiş immobilize enzimlerin aktivitelerinin adsorbe olmuş protein miktarına bağlı olarak büyük değişim gösterdiği görülmüştür. Her pH'da selitin gramı başına adsorbe olmuş protein miktarı 0-15 mg arasında, tüm immobilize örneklerde oldukça düşük aktivite değerleri ölçülmüştür. Protein yüklenmesinin bu değerinden sonra, pH 8'de hazırlanmış örnek dışında, diğer örneklerde aktivitede hızlı bir artış gözlenmiş ve doygunluk yüklemesine yakın bir değerde ise aktivitenin maksimumuna eriştiği saptanmıştır. Bosley ve Peilow'a göre bu durum adsorbe

protein moleküllerinde görülen konformasyonel yapı değişikliğinden kaynaklanmaktadır [73]. Düşük yüklenme durumunda, enzim molekülleri geniş bir yüzeyde yerleştiklerinden konformasyonel açılmaya uğramakta dolayısıyla aktivitede düşme görülmektedir.

3. İmmobilizasyon ortam pH'ının immobilize enzim aktivitesine olan etkisinin incelendiği bu çalışmada, pH 6' da hazırlanmış immobilize enzim örneklerinin pH 5, 7 ve 8'de hazırlanmış örneklerle kıyasla, eşdeğer adsorbe protein miktarlarında, daima en yüksek aktivite değerlerine sahip olduğu bulunmuştur. Bu durum, adsorpsiyon ortamında serbest enzim moleküllerinin pH etkisiyle kısmen aktivite kaybetmesi ile açıklanabilir. Şekil 3.4' den de görüleceği gibi, serbest çörekotu lipazının maksimum aktivite gösterdiği pH 6 olup, pH 5 ve pH 8' de muhtemelen kısmi asidik ve bazik parçalanmalar sonucu enzim daha düşük aktivite değerlerine sahiptir. Adsorpsiyon sonrası eşit miktarda adsorplanmış olsalar bile bu moleküllerin farklı aktivite göstermelerinin nedeni bu şekilde açıklanabilir.
4. Fosfat tampon çözeltisinden immobilize lipaz enziminin eldesinde optimum koşulların tespitinde aktivite yanında immobilizasyon verimini ve aktivite kazanımını da mümkün olduğu kadar yüksek tutabilmek kriter olarak alınmış ve sonuçların bu açılarından değerlendirilmesi ile optimum adsorpsiyon pH'ı ve optimum başlangıç protein konsantrasyonu sırasıyla pH 6 ve 4.9 mg/mL olarak seçilmiştir. Bu optimum koşullarda hazırlanmış immobilize enzimin aktivitesi 3.54 U/g selit (0,18 U/mg protein) dir ve gram selit başına 19.5 mg protein yüklenmesi göstermektedir. Eldesi esnasında, immobilizasyon verimi % 41, aktivite kazanımı ise % 43 olarak gerçekleşmiştir.
5. Çörekotu lipaz enziminin farklı pH'lardaki adsorpsiyon izotermelerinin Langmuir ve/veya Freundlich modellerine uygunluğunun tespiti için, elde edilen deneysel verilerin değerlendirilmesiyle çörekotu enzim proteinlerinin adsorpsiyonunun Langmuir modeline büyük uyum gösterdiği bulunmuştur. Langmuir parametreleri (C_{max} ve K_p) saptanmıştır. Elde edilmiş bu parametrelerin literatürde yer alan değerlerle karşılaştırılması yapılamamıştır. Çünkü bitkisel lipazla yapılmış benzer herhangi bir başka çalışmaya rastlanmamıştır.

Adsorpsiyon verilerinin Freundlich modeline uyumluluğunun incelendiği bölümde ise, sadece pH 5 ortamında elde edilen verilerin uyum gösterdiği tespit edildiğinden pH'a bağlı olarak Freundlich modeli parametreleri saptanamamıştır.

6. İmmobilizasyona solvent etkisinin incelendiği bölümde önce çalışmalar aseton ortamında yürütülmüştür. Adsorpsiyon ortamına aseton ilavesiyle, hem selite bağlanan protein miktarı hem de aktiviteyi arttırmak mümkün olabilmıştır. Mümkün olduğu kadar bir taraftan aktiviteyi ve aktivite kazanımını yüksek tutmak, diğer taraftan da yüksek protein yüklemesini sağlamak için, optimum başlangıç protein konsantrasyonunun yine 5,0 mg/mL olarak seçilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir. Bu koşullarda immobilize enzim hazırlanmasıyla, aktivite kazanımı % 50 ve immobilize enzimin spesifik aktivite değeri yaklaşık olarak 6 U/ g selit (0,2 U/mg protein) değerine yükseltilebilmiştir.
7. İmmobilizasyon ortamına hekzan katılması ile asetona nispetle daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Hekzanın selite bağlanan protein ve bu proteinlerin taşıdığı aktivite açısından çok daha olumlu etkisi olduğu ortaya çıkmıştır. Hekzanlı ortamda, aseton için belirlenmiş optimum koşullarda, immobilizasyon verimi %74' ulaşırken aktivite kazanımı ise % 82'e yükselmiştir. Dolayısıyla, elde edilen immobilize enzimlerin aktivitelerinde de büyük farklar oluşmuştur. Elde edilmiş immobilize enzimin aktivitesi 11,65 U değerine erişmiştir.
8. Tampon çözeltiden, aseton/tampon çözeltiden, hekzan/tampon çözeltiden hazırlanmış immobilize enzim örneklerinin ısıl stabilitelerini incelemek için, bu enzimlere ait inaktivasyon kinetik değerleri bulunmuş ve serbest enzime ait değerlerle mukayese edilmiştir. Direkt tampon çözeltiden hazırlanmış immobilize enzimin serbest enzime göre, 40-60 °C arasında ısıl stabilitesinin 5.1-4.4 kat artmış olduğu görülmüştür. İmmobilizasyonda ortama aseton ilavesinin immobilize enzim stabilitesini, direkt tampon çözeltiden hazırlanmış immobilize enzim örneğine göre yaklaşık % 30 daha arttırmıştır. En stabil immobilize enzim ise hekzan-tampon çözeltiden hazırlanmış olanıdır. Serbest enzime göre bu enzimin ısıl stabilitesi 40-60 °C'lar da 10.4-

7.4 kat artış göstermiştir. Sonuç olarak çörekotu lipazı immobilizasyon sonucu serbest enzime göre daha stabil hale gelmiştir. Belirlenen optimum koşullarda ve hekzan varlığında çörekotu lipazının immobilizasyonu sonucunda, enzimin optimum sıcaklık olan 40 °C' de yarılanma ömrünün 10 kat arttırılmış olması iyi bir netice olarak değerlendirilebilir.

9. İmmobilizasyon ile doğal enzimin Km ve Vmax değerlerinin bir miktar azalmışsa da, hekzan-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize enzimin Km ve Vmax değerleri serbest enzime oldukça yakındır.
10. İmmobilize enzimler için hidroliz aktivasyon enerjilerinin serbest enzime göre biraz yükselmiş olduğu anlaşılmaktadır.
11. İmmobilize çörekotu lipaz enziminin tekrarlı olarak hidroliz deneylerinde kullanılabilirliğini tespit edebilmek için, immobilize enzim örnekleri kullanılarak zeytin yağının hidrolizi peş peşe 4 kez tekrarlandığında,hekzan-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize örnek dışında diğer immobilize enzimler ile tekrarlı ve yeterli sonuçlar alınamamıştır. Hekzan-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize enzimin 4 kez kullanım sonunda orijinal aktivite değerinin % 70'i kadar aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bu değer de immobilize enzimin oldukça iyi performans gösterdiğini vurgulamaktadır.
12. Hekzan-tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize enzimin, su ile doymun hekzan veya % 7 su içeren hekzan-su karışımında görünen hidroliz aktivitesi sulu ortamdaki aktivitesine göre ortalama olarak % 6 artmıştır. Bu durum immobilize enzimin solventli ortamda daha etkin kullanılabileceğinin bir işaretidir.
13. Çörekotu lipaz enziminin substrat seçiciliğinin olup olmadığını incelemek için, serbest ve hekzan–tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize enzim örnekleri kullanılarak 8 farklı yağın hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Hidroliz deneylerinde kullanılan yağlar, zeytin yağı, ayçiçek yağı, soya yağı, boraj yağı, pamuk çekirdeği yağı, hint tohumu yağı, domuz yağı ve menhaden balık yağıdır. Genel olarak, serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzim örneklerinin aynı substrat seçiciliği gösterdiği, her iki formuyla

özellikle bünyesinde linolenik asiti yüksek oranda içeren yağları tercihi olarak daha fazla hidroliz ettiği ve polidoymamış yağ asitlerince zengin yağları ise relatif olarak daha az hidroliz edebildiği gözlenmiştir.

14. İmmobilize ve serbest çörekotu lipaz enzimleri kullanılarak yürütölmüş boraj yağının hidroliz reaksiyonu sonucunda, enzimin gamma-linolenik asite karşı negatif seçicilik gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Boraj yağının hekzan ortamında immobilize çörekotu enzim ile 24 saat hidrolizi sonunda, % 50 verimle ve içerisinde % 38 gamma-linolenik asit (GLA) bulunan, 1,73 kat GLA'ca zenginleşmiş, gliserid karışımı elde edilebileceği ortaya çıkarılmıştır. Serbest enzim ile çalışıldığında ise % 53 verimle içerisinde % 33 GLA olan gliserid karışımı ele geçmiş olduğu dikkate alınırsa immobilize enzimin GLA zenginleştirilmesi için daha iyi bir katalizör olduğu da vurgulanabilir.



KAYNAKLAR

- [1] **Girono, L., Drioli, E., 2000.** Biocatalytic Membrane Reactors: Applications and Perspectives, *Trends in Biotechnology*, **18**, 339-349.
- [2] **Navratil, M., Sturdik, E., 1999.** Bioactive Components in Productions Using Immobilized Biosystems, *Biologia*, **54**, 635-648.
- [3] **D'Souza, S. F., 1999.** Immobilized Enzymes in Bioprocess, *Current Science*, **77**, 69-79.
- [4] **Tanaka, A., Tosa, T., Kobayashi, T., 1992.** Industrial Application of Immobilized Biocatalysts, Marcel Dekker, New York, US.
- [5] **Lee, K. T., Akoh, C. C., 1998.** Structured Lipids: Synthesis and Applications, *Food Reviews International*, **14**, 17-34.
- [6] **Balcao, V. M., Malcata, F. X., 1998.** Lipase Catalyzed Modification of Milkfat, *Biotechnology Advances*, **16**, 309-341.
- [7] **Stilwell, K., McComb, D., Frodstrup, J., Graz, M., 2000.** The Potential use of Enzymes for Dairy CIP, *Food Review*, **27**, 42-43.
- [8] **Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C. N., 1999.** Encapsulation in the Food Industry: A Review, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **50**, 213-224.
- [9] **Murakami, Y., Hirata, A., 1998.** Enzymatic Synthesis of Peptides, *Journal of the Society for Fermentation and Bioengineering*, **76**, 238-254.
- [10] **Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J., Serra, J. L., 1998.** Industrial Applications of Peptic Enzymes: A Review, *Process Biochemistry*, **33**, 21-28.
- [11] **Onifade, A. A., Al-Sane, N. A., Al-Musallam, A. A., Al-Zarban, S., 1998.** A Review: Potentials for Biotechnological Applications of Keratin-Degrading Microorganisms and Their Enzymes for Nutritional Improvement of Feathers and other Keratins as Livestock Feed Resources, *Biosource Technology*, **66**, 1-11.
- [12] **Da-Silva, R., Franco, C. M. L., Gomes, E., 1997.** Pectinase, Cellulase and Hemicellulase-action, Production and Application in Food Processing : A Review, *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, **31**, 249-260.

- [13] **Penstone, K.**, 1996. Zooming in on Enzymes, *Food Review*, **23**, 36, 39, 41.
- [14] **Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S., Gulati, R.**, 1999. Microbial Lipases: Potential Biocatalysts for the
- [15] **Liang, J. F., Li, Y. T., Yang, V. C.**, 2000. Biomedical Application of Immobilized Enzymes, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **89**, 979-990.
- [16] **Tkac, J., Sturdik, E., Svitel, J.**, 1998. Biosensors and Their Applications in Food Analysis, *Bulletin Potravinarskeho Vyskumu*, **37**, 89-107.
- [17] **Karube, I., Nomura, Y.**, 2000. Enzyme Sensors for Environmental Analysis, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **10**, 177-181.
- [18] **Telefoncu, A.**, 1997. Enzimoloji Lisansüstü Yazokulu, *İmmobilize Enzimler* pp. 193-248, Eds. Telefoncu, A. Kuşadası, Türkiye.
- [19] **Eraslan, A. ve Kazan, D.**, 1999. Enzim İmmobilizasyonu ve Uygulamaları, TÜBİTAK, MAM, Kocaeli.
- [20] **Bickerstaff, G. F.**, 1997. Immobilization of Enzymes and Cells, Humana Press, Totawa, New Jersey.
- [21] **Li, B., Takahashi, H.**, 2000. New Immobilization Method for Enzyme Stabilization Involving a Mesoporous Material and an Organic/Inorganic Hybrid Gel, *Biotechnology Letters*, **22**, 1953-1958.
- [22] **Tischer, W., Wedekind, F.**, 1999. Immobilized Enzymes: Methods and Applications, *Biocatalysis-From Discovery to Application*, **200**, 95-126.
- [23] **Navratil, M., Sturdik, E.**, 1999. Bioactive Components in Productions Using Immobilized Biosystems, *Biologia*, **54**, 635-648.
- [24] **Tischer, W., Kasche, V.**, 1999. Immobilized Enzymes: Crystals or carriers?, *Trends in Biotechnology*, **17**, 326-335.
- [25] **Jankovsky, M., Vasakova, L.**, 1996. Immobilization in Alginate Gels, *Veterinarni Medicina*, **41**, 159-164.
- [26] **Balcao, V. M., Paiva, A. L., Malcata, F. X.**, 1996. Bioreactors with Immobilized Lipases: State of the Art, *Enzyme and Microbial Technology*, **18**, 392-416.
- [27] **Clark, D. S.**, 1994. Can Immobilization be exploited to Modify Enzyme-Activity?, *Trends in Biotechnology*, **12**, 439-443.
- [28] **Avnir, D., Braun, S., Lev, O., Ottolenghi, M.**, 1994. Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials, *Chemistry of Materials*, **6**, 1605-1614.

- [29] Gemeiner, P., Stefuca, V., Bales, V., 1993. Biochemical Engineering of Biocatalysts Immobilized on Cellulosic Materials, *Enzyme Microbial Technology*, **15**, 551-566.
- [30] Klibanov, A. M., 1983. Immobilized Enzymes and Cells as Practical Catalysts, *Science*, **219**, 722-727.
- [31] Colowick, S. and Kaplan, N., 1976. Methods in Enzymology, in *Immobilized Enzymes*, pp. 153-156, Ed. Mosbach, K., Academic Press, Newyork.
- [32] Reslow, M., Adlercreutz, P. and Matiasson, B., 1987. On the Importance of the Support Material for Bioorganic Synthesis, *Eur. J. Biochem.*, **172**, 573-578.
- [33] Fadiloğlu, S., Söylemez, Z., 1998. Olive Oil Hydrolysis by Celite-Immobilized *Candida rugosa* Lipase, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 3411-3414.
- [34] Basri, M., Yunus, W. M. Z. W., Yoong, W. S., Ampon, K., Razak, C. N. A., Salleh, A. B., 1996. Immobilization of Lipase From *Candida rugosa* on Synthetic polymer Beads for Use in the Synthesis of Fatty Esters, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **66**, 169-173.
- [35] Wisdom, R. A., Dunnill, P., Lilly, M. D., Macrae, A., 1984. Enzymatic Interesterification of Fats: Factors Influencing the Choise of Support for Immobilized Lipase, *Enzyme Microbial Technology*, **6**, 443-446.
- [36] Kermasha, S., Bisakowski, B., 1998. The Effect of Immobilization on the Hydrolytic/Interesterification Activity of Lipase from *Rhizopus niveus*, *Journal of American Oil Chemists Society*, **75**, 1791-1799.
- [37] Tweddell, R., J., Kermasha, S., Combes, D., Marty, A., 1999. Immobilization of Lipase from *Rhizopus niveus*: A Way to Enhance its Synthetic Activity in Organic Solvent, *Biocatalysis and Biotransformation*, **16**, 411-426.
- [38] Rosu, R., Uozaki, Y., Iwasaki, Y., Yamane, T., 1997. Repeated use of Immobilized Lipase for Monoacylglycerol Production by Solid-Phase Glycerolysis of Olive Oil, *Journal of American Oil Chemists Society*, **74**, 445-450.
- [39] Khare, S. K., Nakajima, M., 2000. Immobilization of *Rhizopus japonicus* Lipase on Celite and its Application for Enrichment of Docosahexaenoic acid in Soybean Oil, *Food Chemistry*, **68**, 153-157.
- [40] Kaga, H., Siegmund, B., Neufeliner, E. and Faber, K., 1994. Stabilization of *Candida* Lipase against Acetaldehyde by adsorption onto Celite, *Biotechnology Techniques*, **8**, 369-374.

- [41] **Triantafylou, O.A., Wehtje, E., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B., 1995,** Effects of sorbitol Addition on the action of Free and Immobilized Hydrolytic Enzymes in Organic Media, *Biotechnology and Bioengineering*, **45**, 406-414.
- [42] **Wethje, E., Adlercreutz, P. and Mattiasson, B., 1993.** Improved Retention of Enzymes Deposited on Solid Supports, *Biotechnology and Bioengineering*, **41**, 171-178.
- [43] **Wang, P., Yang, L. R., Wu, J. P., 2001.** Immobilization of Lipase by Salts and the Transesterification Activity in Hexane, *Biotechnology Letters*, **23**, 1429-1433.
- [44] **Castro, H., Oliveira, P., Soares, C. and Zanin, G., 1999,** Immobilization of Porcine Pancreatic Lipase on Celite for Application in the Synthesis of Butyl Butyrate in a Nonaqueous System, *Journal of American Oil Chemists Society*, **76**, 147-152.
- [45] **Laane, C., Boeren, S., Vos, K. and Veeger, C., 1987.** Rules for Optimization of Bicatalysis in Organic Solvents, *Biotechnology and Bioengineering*, **30**, 81-87.
- [46] **Wisdom, R. A., Dunnill, P., Lilly, M. D., 1987.** Enzymatic interesterification of Fats: Laboratory and Pilot-Scale Studies with Immobilized Lipase from *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnology and Bioengineering*, **29**, 1081-1085.
- [47] **Persson, M., Wehtje, E., Adlercreutz, P., 2000.** Immobilization of Lipases by Adsorption and Deposition: High Protein Loading Gives Lower Water Activity Optimum, *Biotechnology Letters*, **22**, 1571-1575.
- [48] **Lie, E. and Molin, G., 1991,** Hydrolysis and Esterification with Immobilized Lipase on Hydrophobic and hydrophilic Zeolites, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **50**, 549-553.
- [49] **Castro, H. F., Silva, M. L. C. P., Silva, G. L. J. P., 2000.** Evaluation of Inorganic Matrixes as Supports for Immobilization of Microbial Lipase, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, **17**, 849-857.
- [50] **Pereira, E. B., DeCastro, H. F., De Moraes, F. F., Zanin, G. M., 2001.** Kinetic Studies of Lipase from *Candida rugosa*-A Comparative Study Between Free and Immobilized Enzyme unto Porous Chitosan Beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **91**, 739-752.
- [51] **Jitwan, T., Narumon, J., Kanit, K., 1997.** Utilization of Rice Hull Ash as a Support Material for Immobilization of *Candida cylindracea* Lipase, *Journal of American Oil Chemists Society*, **74**, 173-175.

- [52] **Jamil, N. I. N., Omar, I. C.,** 1997. Selection of Rice Husks as Support Material for Lipase Immobilization in Organic Solvent Biocatalysis, *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, **5**, 41-47.
- [53] **Geluk, M. A., Norde, W., Kalsbeek, H. K., Riet, K.,** 1992. Adsorption of Lipase from *Candida rugosa* on Cellulose and its Influence on Lipolytic Activity, *Enzyme and Microbial Technology*, **14**, 748-754.
- [54] **Vemuri, G., Banerjee, R., Bhattacharyya, B. C.,** 1998. Immobilization of Lipase Using Egg Shell and Alginate as Carrier: Optimization of Reaction Conditions, *Bioprocess Engineering*, **19**, 111-114.
- [55] **Temesvari, J., Biacs, P. A.,** 1996. Immobilization of Lipase and its Investigation, *Acta Alimentaria*, **25**, 277-290.
- [56] **Kamori, M., Hori, T., Yamashita, Y., Hirose, Y., Naoshima, Y.,** 2000. Immobilization of Lipase on a New Inorganic Ceramics Support, Toyonite, and the Reactivity and Enantioselectivity of the Immobilized Lipase, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **9**, 269-274.
- [57] **Tan, T., Wang, F., Liu, T.,** 2000. Immobilization of Lipase with Earth and its Application in Synthesis in Monoglyceride, *Journal of Chinese Cereals and Oils Association*, **15**, 29-31.
- [58] **Oladejo, D. K., Halling, P. J., Larsen, V. F.,** 1995. Effect of Different Supports on the Reaction Rate of *Rhizomucor miehei* Lipase in Organic Media, *Biocatalysis Biotransformation*, **12**, 47-54.
- [59] **Sonnet, P. E., McNeill, G. P., Wang, J.,** 1994. Lipase of *Geotrichum candidum* Immobilized on Silica Gel, *Journal of American Oil Chemists Society*, **71**, 1421-1423.
- [60] **Sato, S., Aita, T. M., Suzuki, T., Goto, Y.,** 1999. Comparative Study of Esterification Activity in Organic Medium Between Adsorptively Immobilized and Covalently Immobilized Lipase, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **32**, 350-353.
- [61] **Ferreira, D. S., Correia, A. C., Baptista, F. O.,** 1999. Activity and Batch Operational Stability of *Candida rugosa* Lipase Immobilized in Different Hydrophilic Polyurethane Foams During Hydrolysis in a biphasic Medium, *Bioprocess Engineering*, **21**, 517-524.
- [62] **Serralha, F. N., Lopes, J. M., Lemos, F., Prazeres, D. M. F., Aires-Barros, M. R., Cabral, J. M. S., Ribeiro, F. R.,** 1998. Zeolites as Support for an Enzymatic Alcoholysis Reaction, *Journal of Molecular Catalysis B- Enzymatic*, **4**, 303-311.

- [63] **Sabuquillo, P., Reina, J., Lorente, F., Guisan, M. J. and F. Lafuente, R.,** 1998, Interfacial Affinity Chromatography of Lipases : Separation Different Fractions by Selective Adsorption on Supports activated with Hydrophobic Groups, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1388**, 337-348.
- [64] **Bastida, A., Sabuquillo, P., Armisen, P., Lafuente, R., Huguet, J. and Guisan, M. J.,** 1998. A Single Step Purification, Immobilization, and Hyperactivation of Lipases via Interfacial Adsorption on Strongly Hydrophobic Supports, *Biotechnology and Bioengineering*, **58**, 486-493.
- [65] **Fernandez, L. R., Armisen, P., Sabuquillo, P., Fernandez, L. G., Guisan, J. M.,** 1998. Immobilization of Lipases by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports, *Chemistry and Physics of Lipids*, **93**, 185-197.
- [66] **Malcata, F. X., Garcia, S. H., Hill, G. C., Amundson, H. C.,** 1992. Hydrolysis of Butteroil by Immobilized Lipase Using a Hollow-Fiber Reactor: Part I. Lipase Adsorption Studies, *Biotechnology and Bioengineering*, **39**, 647-657.
- [67] **Malcata, F. X., Reyes, H., Garcia, H. S., Hill, C., Amundson, C.,** 1990. Immobilized Lipase Reactors for Modification of Fats and Oils – A Review, *Journal of American Oil Chemists Society*, **67**, 890-910.
- [68] **Balcao, M., Paiva, A., Malcata, F. X.,** 1996. Bioreactors with Immobilized Lipases: State of the Art, *Enzyme and Microbial Technology*, **18**, 392-416.
- [69] **Ju, Y. H., Huang, F. C.,** 1995. Lipase Immobilized on Hydrophobic Microporous Polypropylene for the Hydrolysis of Palm Kernel Olein, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **55**, 17-26.
- [70] **Montero, S., Blanco, A., Virto, M. D., Landeta, L. C., Agud, I., Solozabal, R., Lascaray, J. M., De Renobales, M., Llama, M. J., Serra, J. L.,** 1993. Immobilization of *Candida rugosa* Lipase and Some Properties of the Immobilized Enzyme, *Enzyme and Microbial Technology*, **15**, 239-247.
- [71] **Cao, L. Q., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D.,** 1999. Lipase-Catalyzed Solid-phase Synthesis of Sugar Esters. Influence of Immobilization on Productivity and Stability of the Enzyme, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **6**, 279-285.
- [72] **Pencreach, G., Leullier, M. Baratti, C. J.,** 1997, Properties of Free and Immobilized Lipase from *Pseudomonas cepacia*, , *Biotechnology and Bioengineering*, **56**, 181-188.
- [73] **Bosley, A.J. Peilow, D. A.,** 1997. Immobilization of Lipases on Porous Polypropylene: Reduction in Esterification Efficiency at Low Loading, *JAOCs*, **74**, 107-111.

- [74] **Kim, D. J., Shin, D. H., Hur, B. K., Kim, E. K., 2000.** Beef Tallow Hydrolysis by Immobilized Lipase, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **10**, 836-839.
- [75] **Huang, F. C., Ke, C. H., Kao, C. Y., Lee, W. C., 2001.** Preparation and Application of Partially Porous Poly(styrene-divinylbenzene) Particles for Lipase Immobilization, *Journal of Applied Polymer Science*, **80**, 39-46.
- [76] **De Oliveira, P. C., Alves, G. M., De Castro, H. F., 2000.** Immobilization Studies and Catalytic Properties of Microbial Lipase onto Styrene-divinylbenzene Copolymer, *Biochemical Engineering Journal*, **5**, 63-71.
- [77] **Kery, V., Haplova, J., Tihlarik, K., Schmidt S., 1990.** Factors Influencing the Activity and Thermostability of Immobilized Porcine Pancreatic Lipase, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **48**, 201-7.
- [78] **Bosley, J. A., Clayton, J. C., 1994.** Blueprint for a Lipase Support-Use of Hydrophobic Controlled-Pore Glasses as Model Systems, *Biotechnology and Bioengineering*, **43**, 934-938.
- [79] **Gunnlaugsdottir, H., Wannerberger, K., Sivik, B., 1998.** Alcoholysis and Glyceride Synthesis with Immobilized Lipase on Controlled-Pore Glass of Varying Hydrophobicity in Supercritical Carbon dioxide, *Enzyme and Microbial Technology*, **22**, 360-367.
- [80] **Knezevic, Z., Mojovic, L. Adnadjevic, B., 1998.** Palm oil Hydrolysis by Lipase from *Candida cylindracea* Immobilized on Zeolite type Y, *Enzyme and Microbial Tehnology*, **22**, 275-280.
- [81] **Kerzel, P., Mersmann, A., 1992.** Adsorption Behaviour of Lipase From *Staphylococcus carnosus* on a Hydrophobic Adsorbent, *Journal of Chromatography*, **584**, 109-113.
- [82] **Cho, S.W. Rhee, S.J., 1993.** Immobilization of Lipase for Effective Interesterification Fats and Oils in Organic Solvent, *Biotehnology and Bioengineering*, **41**, 204-210.
- [83] **Moreno, J.M. Sinisterra, J.V., 1994.** Immobilization of from *Candida cylindracea* on Organic Supports, *Journal of Molecular Catalysis*, **93**, 357-369.
- [84] **Bagi, K., Simon, L.M. Szajani, B., 1997.** Immobilization and Characterization of *Porcine pancreas lipase*, *Enzyme and Microbial Technology*, **20**, 531-535.
- [85] **Warmuth, W., Wenzg, E. Mersmann, A., 1995.** Selection of a Support for Immobilization of a microbial Lipase for the Hydrolysis of Triglycerides, *Bioprocess Engineering*, **12**, 87-93.

- [86] **Gandhi, N. N., Vijayalakshmi, V., Sawant, S. B., Joshi, J. B., 1996.** Immobilization of *Mucor miehei* Lipase on Ion Exchange Resins, *Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, **61**, 149-156.
- [87] **Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V. T., 1999.** The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **29**, 119-131.
- [88] **Benjamin, S., Pandey, A., 1998.** *Candida rugosa* Lipases: Molecular Biology and Versatility in Biotechnology, *Yeast*, **14**, 1069-1087.
- [89] **Jung, J.Y., Yun, H.S., Kim, E.K., 1997.** Hydrolysis of Olive Oil by Lipase, Immobilized on Hydrophobic Support, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **7**, 151-156.
- [90] **Murray, M., Rooney, D., VanNeikerk, M., Montenegro, A., Weatherley, L.R. , 1997.** Immobilization of Lipase onto Lipophilic Polymer Particles and Application to Oil Hydrolysis, *Process Chemistry*, **32**, 479-486.
- [91] **Otero, C., Pastor, E., Fernandez, V.M., Ballesteros A., 1990.** Influence of the Support on the Reaction Course of Tributyrin Hydrolysis Catalyzed by Soluble and Immobilized Lipases, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **23**, 237-247.
- [92] **Watanabe, T., Suzuki, Y., Sagesaka, Y., Kohashi, M., 1995.** Immobilization of Lipases on Polyethylene and application to Perilla Oil Hydrolysis for production of α - Linolenic Acid, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **41**, 307-312.
- [93] **Marangoni, A. G., Rousseau, D., 1995.** Engineering Triacylglycerols-The Role of Interesterification, *Trends in Food Science and Technology*, **6**, 329-335.
- [94] **Lee, K.T., Akoh, C. C., 1997.** Effect of Selected Substrat Forms on the Synthesis of Structured Lipids by Two Immobilized Lipases, *Journal of American Oil Chemists Society*, **74**, 579-584.
- [95] **Lee, K.T., Akoh, C. C., 1998.** Structured Lipids: Synthesis and Applications, *Food Reviews International*, **14**, 17-34.
- [96] **Kim, I. H., Yoon, C. S., Cho, S. H., Lee, K. W., Chung, S. H., Tae, B. S., 2001.** Lipase-Catalyzed Incorporation of Conjugated Linoleic Acid into Tricaprylin, *Journal of American Oil Chemists Society*, **78**, 547-551.
- [97] **Lee, K. T., Foglia, T. A., 2000.** Fractionation of Chicken Fat Triacylglycerols: Synthesis of Strucured Lipids with Immobilized Lipases, *Journal of Food Science*, **65**, 826-831.

- [98] **Gandhi, N. N., Patil, N. S., Sawant, S. B., Joshi, J. B., Wangikar, P. P., Mukesh, D.,** 2000. Lipase-Catalyzed Esterification, *Catalysis Reviews-Science and Engineering*, **42**, 439-480.
- [99] **Yahya, A. R. M., Anderson, W. A., Moo-Young, M.,** 1998. Ester Synthesis in Lipase-Catalyzed Reactions, *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 438-450.
- [100] **Zhang, H., Xu, X. B., Nilsson, J., Mu, H. L., Adler-Nissen, J., Hoy, C. E.,** 2001. Production of Margarine Fats by Enzymatic Interesterification with Silica-Granulated *Thermomyces lanuginosa* Lipase in a Large-Scale Study, *Journal of American Oil Chemists Society*, **78**, 57-64.
- [101] **Lee, C. H., Parkin, K. L.,** 2001. Effect of Water Activity and Immobilization on Fatty Acid Selectivity for Esterification Reactions Mediated by Lipases, *Biotechnology and Bioengineering*, **75**, 219-227.
- [102] **Arsani J., Parkin, K. L.,** 2000. Selectivity of *Rhizomucor miehei* Lipase as Affected by Choice of Cosubstrate System in Ester Modification in Organic Media, *Biotechnology and Bioengineering*, **69**, 222-226.
- [103] **Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Yokota, T., Nagao, T., Komemushi, S., Tominaga, Y.,** 1996. Production of Structured Lipids Containing Essential Fatty Acids by Immobilized *Rhizopus delemar* Lipase, *Journal of American Oil Chemists Society*, **73**, 1415-1420.
- [104] **Soumanou, M. M., Bornscheuer, T. U., Menge, U., Schmid, D. R.,** 1997. Synthesis of Structured Triglycerides from Peanut Oil with Immobilized Lipase, *Journal of American Oil Chemists Society*, **74**, 427-433.
- [105] **Lee, K.T., Akoh, C. C.,** 1996. Immobilized Lipase-Catalyzed Production of Structured Lipids with Eicosapentanoic Acid at Specific Positions, *Journal of American Oil Chemists Society*, **73**, 611-614.
- [106] **De Castro, H. F., Anderson, W. A.,** 1995. Fine Chemicals by Biotransformation Using Lipases, *Quimica Nova*, **18**, 544-554.
- [107] **Humeau, C., Rovel, B., Girardin, M.,** 2000. Enzymatic Esterification of Bixin by L-Ascorbic Acid, *Biotechnology Letters*, **22**, 165-168.
- [108] **Stamatis, H., Sereti, V., Kolisis, F. N.,** 1999. Studies on the Enzymatic Synthesis of Lipophilic Derivatives of Natural Antioxidants, *Journal of American Oil Chemists Society*, **76**, 1505-1510.
- [109] **Krishna, S. H., Divakar, S., Prapulla, S. G., Karanth, N. G.,** 2001. Enzymatic Synthesis of Isoamyl Acetate Using Immobilized Lipase From *Rhizomucor miehei*, *Journal of Biotechnology*, **87**, 193-201.

- [110] **Laboret, K., Perraud, R.,** 1999. Lipase-Catalyzed Production of Short-Chain Acids Terpenyl Esters of Interest to the Food Industry, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **82**, 185-198.
- [111] **Chatterjee, T., Chatterjee, B. K., Bhattacharyya, D. K.,** Study of Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Some Monoterpene Esters, *Canadian Journal of Microbiology*, **47**, 397-403.
- [112] **Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H., Kolisis, F. N.,** 2001. Regioselective Acylation of Flavonoids Catalyzed by Lipase in Low Toxicity Media, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **103**, 655-660.
- [113] **Steinke, G., Weitkamp, P., Klein, E., Mukherjee, K. D.,** 2001. High-Yield Preparation of Wax Esters via Lipase-Catalyzed Esterification Using Fatty Acids and Alcohols from Crambe and Camelina Oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 647-651.
- [114] **Degn, P., Zimmermann, W.,** 2001. Optimization of Carbohydrate Fatty Acid Ester Synthesis in Organic Media by a Lipase From *Candida antarctica*, *Biotechnology and Bioengineering*, **74**, 483-491.
- [115] **Sakaki, K., Giorno, L., Drioli, E.,** 2001. Lipase-Catalyzed Optical Resolution of Racemic Naproxen in Biphasic Enzyme Membrane Reactors, *Journal of Membrane Science*, **184**, 27-38.
- [116] **Pregolato, M., Terreni, M., Fuentes, I. E., Leon, A. R. A., Sabuquillo, P., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M.,** 2001. Enantioselective Enzymatic Hydrolysis of Racemic Glycidyl Esters by using Immobilized Porcine Pancreas Lipase with Improved Catalytic Properties, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **11**, 757-763.
- [117] **Muralidhar, R. V., Marchant, R., Nigam, P.,** 2001. Lipases in Racemic Resolutions, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **76**, 3-8.
- [118] **Matsumae, H., Akatsuka, H., Furui, M., Shibatani, T., Tosa, T.,** 1996. Industrial Production of Optically Active Intermediate in the Synthesis of Diltiazem with Lipase, *Journal of the Society for Fermentation and Bioengineering*, **74**, 273-288.
- [119] **Shibati, T., Omori, K., Akatsuka, H., Kawai, E., Matsumae, H.,** 2000. Enzymatic Resolution of Diltiazem Intermediate by *Serratia marcescens* Lipase: Molecular Mechanism of Lipase Secretion and its Industrial Application, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **10**, 141-149.

- [120] **Fernandez-Lorente, G., Terreni, M., Mateo, C., Bastida, A., Fernandez-Lafuente, R., Dalmases, P., Huguet, J., Guisan, J. M.**, 2001. Modulation of Lipase Properties in Macro-Aqueous Systems by Controlled Enzyme Immobilization: Enantioselective Hydrolysis of a Chiral Ester by Immobilized *Pseudomonas* Lipase, *Enzyme and Microbial Technology*, **28**, 389-396.
- [121] **Rakshit, S. K., Vasuhi, R., Kosogi, Y.**, 2000. Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids From Tuna Oil Using Immobilized *Pseudomonas fluorescens* Lipase, *Bioprocess Engineering*, **23**, 251-255.
- [122] **Schmitt-Rozieres, M., Deyris, V., Comeau, L. C.**, 2000. Enrichment of Polyunsaturated Fatty Acids From Sardine Cannery Effluents by Enzymatic Selective Esterification, *Journal of American Oil Chemists Society*, **77**, 329-332.
- [123] **Rice, K. E., Watkins, J., Hill C. G. Jr.**, 1999. Hydrolysis of Menhaden Oil by a *Candida cylindracea* Lipase Immobilized in a Hollow-Fiber Reactor, *Biotechnology and Bioengineering*, **5**, 33-45.
- [124] **Irimescu, R., Furihata, K., Hata, K., Iwasaki, Y., Yamane, T.**, 2001. Two-Step Enzymatic Synthesis of Dokosahexaenoic Acid-Rich Symmetrically Structured Triacylglycerols via 2-Monoacylglycerols, *Journal of American Oil Chemists Society*, **78**, 743-748.
- [125] **Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y.**, 2001. Enzymatic Purification of Polyunsaturated Fatty Acids, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**, 529-538.
- [126] **Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., Baba, T., Ooguri, T., Moriyama, S., Terai, T., Tominaga, Y.**, 2001. Ethyl Esterification of Docosahexaenoic Acid in an Organic Solvent-Free System with Immobilized *Candida antarctica* Lipase, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **91**, 19-23.
- [127] **Garcia, H. S., Arcos, J. A., Ward, D. J., Hill, C. G.**, 2000. Synthesis of Glycerides Containing n-3 Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acid by Solvent-Free Acidolysis of Fish Oil, *Biotechnology and Bioengineering*, **70**, 587-591.
- [128] **Haraldsson, G. G., Halldorsson, A., Kulas, E.**, 2000. Chemoenzymatic Synthesis of Structured Triacylglycerols containing Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids, *Journal of American Oil Chemists Society*, **77**, 1139-1145.
- [129] **Kosugi, Y., Roy, P. K., Chang, Q. L., Cao, S. G., Fukatsu, M., Kanazawa, K., Nakanishi, H.**, 2000. Esterification of Polyunsaturated Fatty Acids by Various Forms of Immobilized Lipase From *Rhizomucor miehei*, *Lipids*, **35**, 461-466.

- [130] **Osorio, N. M., Ferreira-Dias, S., Gusmao, J. H., Da Fonseca, M. M. R.,** 2001. Response Surface Modelling of the Production of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids-Enriched Fats by a Commercial Immobilized Lipase, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **11**, 677-686.
- [131] **Traitler, H., Wille, H. J., Studer, A.** 1988. Fractionation of Blackcurrant Seed Oil, *J. American Oil Chemists Society*, **65**, 755-758.
- [132] **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.
- [133] **Arai, M., Fukuta, H., Morikwa, H.** 1987. Selective Separation of γ -Linolenic Acid Ether Ester Using Y-Zeolite, *J. Fermentation Technology*, **65**, 569-573.
- [134] **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.
- [135] **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 *Mortierella* genus, *J. American Oil Chemists Society*, **67**, 846-851.
- [136] **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.
- [137] **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.
- [138] **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.
- [139] **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.
- [140] **Aggelis, G., Komaitis, M., Pina, M., Graille, J.** 1993. Specificity of *Mucor miehei* Lipase on Methyl Ester Substrates, *Grasas y Aceites*, **44**, 331-334.

- [141] 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.
- [142] 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.
- [143] 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.
- [144] 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.
- [145] 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.
- [146] 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.
- [147] 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.
- [148] 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.
- [149] 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.
- [150] 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.
- [151] 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.

- [152] **Senanayake, S. P. J. N., Shahidi, F.** 1999. Enzymatic Incorporation of Docosahexaenoic Acid into Borage Oil, *J. American Oil Chemists Society*, **76**, 1009-1015.
- [153] **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.
- [154] **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.
- [155] **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.
- [156] **Calvalho, P. O., Pastore, G. M.,** 1998. Enrichment of Gamma-Linolenic Acid from Fungal Oil by Lipases, *Food Biotechnology*, **12** , 57-71.
- [157] **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.
- [158] **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.
- [159] **Adlercreutz, P., Gitlesen, T., Ncube, I., Read, J. S.** 1997. Vernonia Lipase A Plant Lipase with Strong Fatty Acid Selectivity, *Methods in Enzymology*, **284** , 220-232.
- [160] **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.
- [161] **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.
- [162] **Karakazan, S.** 1997. Çörekotu (*Nigella sativa* L.) Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [163] **Akın, A.** 1998. Çörekotu (*Nigella sativa* L.) Lipaz Enziminin Stabilizasyonuna Şekerlerin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [164] Ünsal, Ş. 1999. Çörekotu (*Nigella sativa* L.) Lipaz Enziminin Stabilizasyonuna PEG Bileşiklerinin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [165] 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.
- [166] 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.
- [167] Dandik, L., Arıoğlu, G., Aksoy, H. A. 1993. Enzymatic Hydrolysis of Used Frying Oil by Native Lipase, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **42**, 119-126.
- [168] Dandik, L., Aksoy, H. A. 1996. Application of *Nigella sativa* Lipase in Oleochemical Reactions, *Enzyme and Microbial Technology*, **19**, 277-281.
- [169] 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.
- [170] 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.
- [171] 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.
- [172] 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
- [173] AOCS Analiz Yöntemleri, 1972. *The American Oil Chemists Society*, 2. Baskı.
- [174] Gornall, A. C., Bardawill, C. J., David, M. M., 1949. Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction, *Journal of Biology and Chemistry*, **177**, 751-756.
- [175] Achife, E. C., Ibemesi, J. A., Applicability of the Freundlich and Langmuir Adsorption Isotherms in the Bleaching of Rubber and Melon Seed Oils, *J. American Oil Chemists Society*, **66**, 247-252.
- [176] Segel, I. H., 1975. *Enzyme Kinetics*, John Wiley and Sons, Inc., New York.

ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında İzmit’ te doğdu. 1992 yılında İstanbul Üniversitesi Kimya Mühendisliği bölümünde lisans eğitimini tamamladı, 1995 yılında İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Ana bilim dalında yüksek lisansını tamamladı. Aynı yıl doktora eğitimine başladı. 1995-1997 yılları arasında TÜBİTAK MAM Ulusal Elektronik ve Kriptoloji Enstitüsü, Yarı İletken Teknolojileri Bölümünde araştırmacı olarak görev yaptı. 1997-2000 yılları arasında İTÜ Kimya Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak görev yaptı. Halen ARÇELİK A.Ş. Araştırma ve Teknoloji Geliştirme Merkezinde araştırma mühendisi olarak çalışmaktadır

