

55590

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ISIRGAN TOHUMU LİPAZININ ENZİMATİK HİDROLİZ
YÖNTEMİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kim. Müh. Nilgün TOKMAN

**F.E. YÜKSEKÖĞRETİM FAKÜLTESİ
SÖZLÜ VE YAZIYLA**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11 Ocak 1996

Tezin Savunulduğu Tarih : 29 Ocak 1996

Tez Danışmanı

: Prof.Dr. H. Ayşe AKSOY

Diğer Jüri Üyeleri

: Prof.Dr.Nusret BULUTÇU

Prof.Dr.Turgut ÖZTÜRK

OCAK 1996

ÖNSÖZ

Çalışmamın her aşamasında değerli fikir ve önerileri ile bana yol gösteren ve bilimsel çalışma zevkini kazandıran saygıdeğer hocam Sayın Prof.Dr. H.Ayşe AKSOY'a ve Kimyasal Teknolojiler Ana Bilim Dalı'ndaki çok değerli hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarında ve tezimin hazırlanmasında her an yanımda bulunan ve desteğini esirgemeyen Kim. Yük. Müh. Levent DANDİK'e teşekkürlerimi iletirim.

Tüm öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleriyle bana güç veren sevgili aileme teşekkürü borç bilirim.

Ocak 1996

Kim.Müh. Nilgün TOKMAN

İÇİNDEKİLER

NOTASYON LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM 2. TEORİK BÖLÜM	2
2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi	2
2.2. Enzimatik Hidroliz	5
2.3. Çalışmanın Önemi ve Literatürde Yapılan Araştırmalar	7
BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	15
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	15
3.2. Deney Düzenegi ve Kullanılan Cihazlar	16
3.3. Hidroliz Reaksiyonlarının Yürütülmesi	16
3.4. Aseton Tozunun Hazırlanması	17
3.5. Isırgan Tohumu Lipazının Hidroliz Reaksiyonunda Kullanımı	18
3.5.1. Ham Enzim Miktarının Hidroliz Reaksiyonuna Etkisi	18
3.5.2. Enzimatik Hidroliz Reaksiyonunda Sıcaklığın Etkisi	25
3.5.3. Enzimatik Hidroliz Reaksiyonunda pH'ın Etkisi	31
3.5.4. Reaksiyon Kinetiği	36
BÖLÜM 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	43

NOTASYON LİSTESİ

TLC-FID : İnce Yüzey Kromatografisi-Alev İyonizasyon Dedektörü

TG : Trigliserid

FA : Yağ Asidi

1,3-DG : 1,3-Digliserid

1,2-DG : 1,2-Digliserid

1-MG : 1-Monogliserid

2-MG : 2-Monogliserid

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde ürün bileşiminin zamanla değişimi (Enzim miktarı = %25, pH=8.0, T=40°C).	20
Şekil 3.2. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde ürün bileşiminin zamanla değişimi (Enzim miktarı = %30, pH=8.0, T=40°C).	21
Şekil 3.3. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde ürün bileşiminin zamanla değişimi (Enzim miktarı = %35, pH=8.0, T=40°C).	22
Şekil 3.4. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde ürün bileşiminin zamanla değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0, T=40°C).	23
Şekil 3.5. Aseton tozu miktarının ürün asit miktarına etkisi (pH=8.0, T=40°C).	24
Şekil 3.6. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0, T=30°C).	26
Şekil 3.7. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0, T=35°C).	27
Şekil 3.8. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0, T=45°C).	28
Şekil 3.9. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0, T=50°C).	29

Şekil 3.10.	Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlarda ürün asit miktarlarının zamanla değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0).	30
Şekil 3.11.	Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=5.0, T=40°C).	32
Şekil 3.12.	Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=6.0, T=40°C).	33
Şekil 3.13.	Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=7.0, T=40°C).	34
Şekil 3.14.	Farklı pH değerlerindeki fosfat tampon çözeltiler ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda elde edilen ürünlerin asit miktarlarının zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, T=40°C).	35
Şekil 3.15.	Sıcaklığın hidroliz reaksiyonu hız sabitine etkisi.	37

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Kullanılmış kızartma yağının özellikleri [3].	15
Tablo 3.2. Kullanılmış kızartma yağının Kapiler gaz kromatografi yöntemiyle belirlenen yağ asidi bileşimi (% ağırlık) [3].	16
Tablo 3.3. Farklı enzim oranlarında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarında hidrolizlenme derecesinin zamana göre değişimi (Sıcaklık=40°C, pH=8.0).	19
Tablo 3.4. Kullanılmış kızartma yağının ısırgan tohumu aseton tozu ile hidrolizinde sıcaklığın etkisi ve hidrolizlenme derecelerinin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0).	25
Tablo 3.5. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde pH'ın hidrolizlenme derecesine etkisi (Enzim miktarı = %40, sıcaklık=40°C).	31
Tablo 3.6. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde reaksiyon hız sabitlerinin sıcaklığa göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0).	36

ÖZET

Günümüzde yağ asitleri üretiminin büyük bir kısmı yüksek sıcaklık ve basınç altında gerçekleştirilen sürekli ters akım hidroliz işlemi ile yapılmaktadır. Ancak bu proseslerden elde edilen ürünler oldukça koyu renkli ve yağ asitlerinin saflığını bozan yan ürünler içerdiğinden ürünlerin distilasyon ile saflaştırılarak arıtılmaları gerekir. Bu arıtma işlemleri ise oldukça fazla enerji gerektirir. Yağ asitlerinin daha saf ve ekonomik olarak üretimi için enzimatik yağ hidrolizinin önemli bir potansiyel teşkil edebileceği düşünülmüş ve son yıllarda bu konudaki çalışmalara hız verilmiştir.

Bu çalışmada kullanılmış kızartma yağının ısırgan (*Urtica pilulifera* L) tohumundan elde edilen aseton tozu (ham lipaz) kullanılarak enzimatik hidrolizlenmesi incelenmiş ve sıcaklık, pH, enzim miktarının bu reaksiyon üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre, 1:1 yağ-tampon çözelti oranında, 40°C ve pH=8.0'de, yağın ağırlıkça %40'ı kadar enzim kullanıldığında hidrolizlenme derecesinin en yüksek değere ulaştığı gözlenmiştir. Ayrıca yapılan kinetik çalışmada bu enzimatik hidroliz reaksiyonunun ikinci derece hız eşitliğine uyduğu görülmüştür.

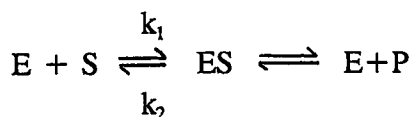
SUMMARY

THE HYDROLYSIS OF USED FRYING OIL BY NETTLE SEED LIPASE (URTICA PILULIFERA LIPASE)

The present industrial process for fat and oil hydrolysis involves pressures of ca. 50 atm and temperatures of 240-260°C or higher for a period of ca. 2 hr to achieve 96-99% hydrolysis. The resulting products are extremely dark fatty acids and discolored dilute (10%) aqueous solution of glycerol. The fatty acids are unusable as obtained and need to be redistilled to remove color and by-products. These processes are energy intensive and give rise to a variety of undesirable side reactions.

In order to conserve energy and obtain light-colored fatty acids, investigators set out to study enzymatic hydrolysis of triglycerides. On the contrary, some factories in Japan already use lipase for production of soap powder and production of high purity unsaturated fatty acid. A variety of lipases of different origins have been studied in the biochemical literatures. Pancreatic lipase was the first fat-splitting enzyme to be thoroughly investigated. Each of the enzymes catalyze a different kind of chemical reaction. All enzymes are proteins with enormous catalytic activity produced by living cells, the enzyme activity varying considerably to the source of the enzyme. They have very complex and specific three-dimensional conformation in which the chains are folded. This conformation is necessary for the activity of the enzyme. The enzymes, like other proteins, can undergo denaturation. When this occurs their activity is lost. The enzymes, known as lipases, function at the oil-water interface to hydrolyze fats to fatty acids and glycerol.

The reaction catalyzed by enzyme proceeds as follows :



E : Enzyme
S : Substrate

ES : Enzyme Substrate complex

P : Product

This reaction is reversible and can be subjected to the law of mass action.

Many investigators have studied the enzymatic reactions. The hydrolysis of triglycerides is consecutive and reversible reaction. The reaction can be driven to completion by the addition of the reactants in excess, or by removal of one of the products Figure 1 shows the mechanism for the hydrolysis reaction.

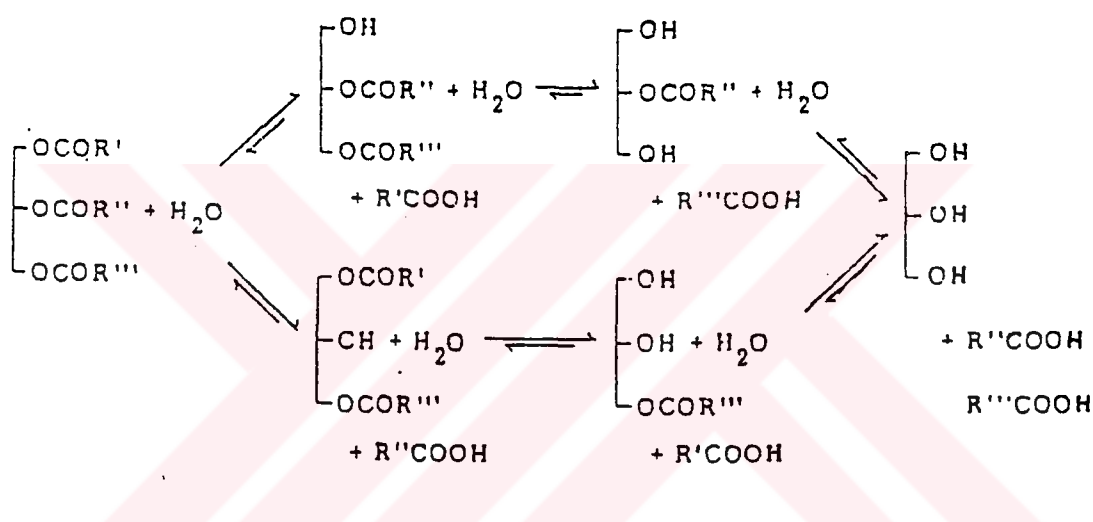


Figure 1 The mechanism for the hydrolysis reaction.

The purpose of the present study is to investigate the enzymatic hydrolysis of used frying oil by nettle seed lipase (*Urtica Pilulifera* L.), to elucidate the role of process parameters on the reaction rate.

Nettle seeds of Turkish origin were used as a lipase source for the acetone powder preparation. Enzymatic hydrolysis reactions were carried out in a three-necked flask (250 ml) equipped with a stirrer, a temperature controller, and a thermometer.

In all experiments, 80 g used frying oil and 80 ml phosphate buffer solution were placed into the reaction flask and heated by stirring to desired temperature and then lipase was added to the mixture as catalyst, kept at constant temperature for 9 h.

Samples were with drawn at predetermined time intervals and placed in a 90°C water bath for 15 min to inactive the enzyme. Then, they were centrifuged to seperate the lipase, and the oil phase was dried using anhydrous Na₂SO₄.

At the same time, 0.1 g hydrolyzed oil was added to 10 ml chloroform and analyzed by thin-layer chromatography-flame ionization detection (TLC-FID) analyser (Iatron laboratories Inc. Tokyo, Japan). Complete seperation of the lipid mixture was achieved into triglyceride (TG), fatty acid (FA), 1,3-diglyceride (1,3-DG), 1,2-diglyceride (1,2-DG), 2-monoglyceride (2-MG) and 1-monoglyceride (1-MG).

For the investigation of potential application of Nettle seed lipase "acetone powder" in the enzyme-catalyzed hydrolysis, lipase "acetone powder" was prepared by charging blender, equipped with a 1000 ml glass container, with 100 g Nettle Seed, followed by 200 ml of acetone, then ground for 3-5 min. The resulting mixture was transferred into a 1000 ml beaker, which was cooled by salt-ice mixture and the glass container was rinsed with 150 ml of acetone. The acetone was added to the original mixture, the stirred for 1 min. The suspension containing low density material was carefully decanted into a Buchner funnel equipped for vacuum filtration. The seed residue was washed with two 250 ml portions of acetone. Acetone wash was added to the filter cake. The filter cake was transferred into a 1000 ml beaker which was cooled by salt-ice mixture, and then wash with two 150 ml portions of acetone, followed by another 100 ml portion. The combined acetone wash was vacuum filtered. The powder was transferred and spread on to an appropriately sized filter paper, then air-dried under a hood. The powder was stored at 4°C until required.

The acetone powder, prepared according to this method developed by Afolabi and co-workers, was used in hydrolysis reactions as catalyst.

The degree of hydrolysis was calculated by the following equation:

$$\text{Hydrolysis \%} = 100 (AV_2 - AV_1) / (SV - AV_1)$$

where AV₁ and AV₂ are acid value of samples at the initial time and time t, respectively and SV is the saponification value of used frying oil.

In order to determine the effect of lipase content on enzymatic hydrolysis of used frying oil, four different amount of lipase have been tested. The results are shown in Table 1. As can be seen increasing the lipase content increased the rate of hydrolysis.

Table 1. The effect of the lipase content on the hydrolysis degree (pH=8.0, T=40°C).

Time (h)	% 25	% 30	% 35	% 40
Initial	0	0	0	0
1	11.57	16.80	--	19.24
2	14.15	27.02	33.32	37.49
3	23.62	34.14	44.21	51.11
4	28.04	41.52	49.70	57.80
5	32.23	47.15	55.95	62.44
6	36.99	52.72	61.71	70.66
7	43.29	58.76	64.39	76.25
8	46.28	61.15	68.19	--
9	47.10	65.05	71.20	78.95

In order to determine the effect of temperature on the enzymatic hydrolysis of used frying oil, the reactions were carried out at 30-50°C and the highest hydrolysis degree was found at 40°C. The results are shown Table 2.

Table 2. The effect of temperature on the hydrolysis degree. (pH=8.0, Lipase content = %40).

Time (h)	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
Initial	0	0	0	0	0
1	27.42	21.86	19.24	24.85	21.39
2	40.40	37.37	37.49	33.44	37.04
3	49.36	49.56	51.11	41.00	44.37
4	55.54	57.22	57.80	48.61	52.52
5	59.10	61.26	62.44	53.50	55.15
6	62.24	67.18	70.66	59.70	63.99
7	66.19	67.76	76.25	66.43	66.28
8	68.44	70.08	--	69.51	68.09
9	75.07	71.24	78.95	72.94	68.95

In addition, the effect of the pH value on the hydrolysis of used frying oil was indicated. The results are presented in Table 3. As can be seen from Table 3, the pH value appeared to have no significant beneficial effect on the reaction.

Table 3. The effect of the pH value on the hydrolysis degree.
(T=40°C, Lipase content = %40).

Time (h)	pH=5.0	pH=6.0	pH=7.0	pH=8.0
Initial	0	0	0	0
1	20.07	--	22.16	19.24
2	32.88	--	39.14	37.49
3	45.14	41.53	52.76	51.11
4	52.32	52.34	54.59	57.80
5	60.37	58.44	58.74	62.44
6	57.39	61.20	70.96	70.66
7	68.31	67.26	73.41	76.25
8	69.24	69.25	67.18	--
9	69.92	70.15	69.51	78.95

In conclusion, the optimum reaction conditions are found 40% lipase content based on oil weight, 40°C and pH=8.0. Data fitted the second-order rate equation.

BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde geniş kullanım alanına sahip olan yağ asitleri, katı ve sıvı yağların yüksek sıcaklık ve basınç altında uygulanan sürekli ters akım hidrolizi ile üretilmektedir. Ancak bu proseslerden elde edilen ürünlerin distilasyon ile saflaştırılarak arıtılmaları gerekir. Bu arıtma işlemleri ise oldukça fazla enerji gerektirir. Ayrıca bu proseslerde yüksek sıcaklığa karşı hassas olan maddelerin kullanılması durumunda termal bozunmalar meydana gelir ve ürünün saflığı bozulur [1,2]. Bu nedenle hem enerji tasarrufu sağlamak hem de açık renkli, termal bozunmaya maruz kalmamış ürünler elde etmek için yağların enzimatik hidrolizi üzerine çalışmalara hız verilmiştir. Literatürde, bu konuda yapılan çalışmalarda daha çok mikrobiyal enzimlerin kullanıldığı görülmektedir. Hayvansal lipaz olan pankreas lipazı bu hidroliz reaksiyonları için kullanılan ilk enzim olmakla beraber mikrobiyal lipaz olan *Candida cylindracea* ve *Candida rugosa* da bu amaçla en çok kullanılan enzimlerden bazılarıdır. Enzimlerin bitkisel kökenli de olabileceği bilinmektedir. Örneğin yağlı tohumlar önemli bir lipaz enzimi kaynağıdır. Hem bilimsel, hem de endüstriyel uygulamaya katkı sağlamak amacıyla, çeşitli yağlı tohumlardan elde edilen lipaz enzimleri kullanılarak, bu enzimlerin hidroliz reaksiyonlarındaki katalitik etkileri ve seçicilikleri araştırılmaktadır. Özellikle bu yöntem için kullanılan yağlı tohumlar, çörekotu tohumu ve ısırgan tohumlarıdır. Ancak bu tohumlardan elde edilen enzimlerin özellikleri ile bilgiler çok sınırlıdır [1,2,3].

Bu çalışmada, ısırgan (*Urtica pilulifera* L.) tohumu lipazının yağların hidrolizindeki etkisi incelenmiştir. Bu konuda literatür çalışması yapıldıktan sonra hidroliz reaksiyonu deneysel olarak gerçekleştirilmiş ve ısırgan tohumu lipazının katalizör olarak kullanıldığı enzimatik yağ hidrolizi reaksiyonunun optimum koşullarının belirlenmesine çalışılmıştır.

BÖLÜM 2. TEORİK BÖLÜM

2.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Organizmada metabolik olayları hızlandıran protein yapısındaki biyolojik katalizörler enzim olarak adlandırılır. Enzim proteinleri 20 çeşit doğal aminoasitten oluşan polipeptidlerdir. Enzimlerin molekül ağırlıkları 13.000 ile 1.000.000 arasında değişir [3,4].

Biyokimyasal reaksiyonlarda, reaksiyon hızını normale göre 10^{10} kat artırabilen enzimleri anorganik katalizörlerden ayıran fark; anorganik katalizörlerin çok çeşitli reaksiyonları katalizleyebilmeleri, enzimlerin ise ancak belirli maddeleri veya karışımları üzerinde özel etki göstermeleridir. Enzimlerin etki ettikleri madde veya karışımlara o enzimin substratı denir. Ayrıca anorganik katalizörler reaksiyon sonunda kantitatif olarak yeniden elde edilebilirken, enzimler etkili oldukları reaksiyonlarda az veya çok tahrip olurlar [4].

Enzimler, hücrelerde ya serbest halde ya da hücre zarında bulunurlar. Enzim yapılarında genel olarak bileşimce ve ödevce farklı olan iki kısım vardır. Bunlardan biri protein yapısındaki apoenzim diğeri ise protein olmayan kısımdır. Her ikisine birden haloenzim denilir. Bazı enzimlerin katalitik etki gösterebilmeleri için proteinden başka metal iyonuna ya da protein olmayan vitamin gibi organik bir bileşiğe veya her ikisine de ihtiyacı vardır. Bu iyon ve bileşiğe kofaktör denilir. Bunlar enzimin katalitik etkisinden, yani etki edeceği reaksiyondan sorumludur. Organik bileşik enzimin protein kısmı ile oldukça sıkı birleşmiş ve dissosiyeye olmuyorsa "prostetik grup", pek sıkı birleşmemiş ve dissosiyeye olabiliyorsa "koenzim" adını alır. Enzimin protein kısmı olan apoenzim büyük protein moleküllerinden oluşmuş olup yapısı protein içindeki aminoasit türlerine, sayılarına ve diziliş sıralarına göre değişir. Apoenzim ısı ile kolayca denatüre olur [1,5]. Bir enzimin kullanım alanını aktivitesi, spesifikliği (seçiciliği), kararlılığı ve fiyatı

kısıtlar. Enzimin ekonomik olarak kullanılabilmesi için, aktivitesinin yüksek olması ve reaksiyon koşullarından az etkilenmesi istenir. Enzim aktivitesi belli başlangıç koşullarında ve verilen bir zamanda enzimin bilinen miktarının etkisi altında değişime uğrayan madde miktarıyla ölçülür [4].

Enzim etkinliğine etki eden faktörler; sıcaklık, pH, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, aktivatörler ve inhibitörlerdir [4].

Sıcaklık artmasıyla enzimatik reaksiyon hızı belirli bir sıcaklığa kadar artar, daha sonra bir duraklama hatta gerileme gösterebilir. Her enzimin en iyi etki ettiği belirli bir sıcaklık derecesi vardır. Bu derecenin üzerinde enzimler 3 boyutlu yapılarını kaybederek denatüre olurlar ve reaksiyon hızı düşer [1,3].

Her enzimin maksimum aktivite gösterdiği belirli bir pH derecesi vardır. Bu pH derecesi; tampon çözeltinin cinsine, sıcaklığa ve substrat konsantrasyonuna bağlıdır [3].

Enzim konsantrasyonu sabit tutularak substrat konsantrasyonu artırıldığında reaksiyon hızı belirli bir noktaya kadar artar. Hız maksimuma ulaştınca substrat konsantrasyonunun artmasıyla reaksiyon hızı artık değişmez. Sabit substrat konsantrasyonunda ise enzimatik reaksiyonun hızı enzim konsantrasyonu ile artar [3].

Enzim reaksiyonlarında hızı artırıcı rol oynayan bazı metallerle, metal iyonlara aktivatör, azaltanlara ise inhibitör denilir. İnhibitörler ya aktif merkeze doğrudan bağlanarak veya enzim molekülünün konformasyonunu bozarak enzim aktivitesini bozarlar [3].

Enzimelerin isimlendirilmesinde gözönüne alınan temel ilkeler ise şunlardır [2]:

- 1) Bütün enzimeler -az ekini alırlar.
- 2) Kendilerince katalizlenen reaksiyona uygun olarak adlandırılır ve sınıflandırılırlar.
- 3) Birden çok reaksiyonu katalizliyorsa katalizledikleri ilk reaksiyona göre adlandırılırlar.

Enzimlerin sistematik olarak isimlendirilmesinde; substratın ismi + katalizlenen reaksiyon tipi + az eki sırası takip edilir.

Enzimlerin katalizledikleri reaksiyon tipine göre 6 grupta toplamak mümkündür [1,2,3]:

1) Oksidoredüktazlar : Redoks reaksiyonu olarak isimlendirilen yükseltgenme ve indirgenme işlemlerini katalizlerler. Bunlar dehidrogenazlar, sitokramlar, oksidazlar ve oksijenazlardır.

2) Transferazlar: Aldehit, keton, açıl, azot, fosfat ve kükürt içeren grupların bir bileşikten diğerine aktarılmasını katalizlerler. Transaminazlar, transketolazlar, transfosfonazlar bu gruba girer.

3) Hidrolazlar: Hidroliz reaksiyonunu katalizlerler. Bunlara örnek olarak esterazlar, lipazlar, peptidazlar, fosfatazlar, proteazlar ve glikosidazlar verilebilir.

4) Liyazlar: Bir organik moleküldeki grupların hidrolitik olmayanlardan ayrılmasını katalizlerler. Örneğin dekarboksilazlar, dehidrotazlar, karboksilazlar bu gruba girerler.

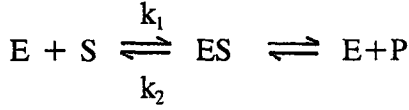
5) İzomerazlar: Aminoasit-rabemaz, glukofosfat-izomeraz gibi enzimler olup izomerleşme reaksiyonunu katalizlerler.

6) Ligazlar: Sentez reaksiyonunu katalizleyen piruvet-karboksilazlar ve açıl-co-A-sentetazların örnek olabileceği enzimlerdir.

Lipazlar gerçek yağlar dışında suda çözünen esterleri de hidrolizlerler. Lipazlar hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal olarak 3 sınıfta toplanır. Hayvansal lipazların en önemlisi pankreas lipazıdır [2].

Çörekotu, soya, mısır ve hint tohumu gibi birçok yağlı tohum yağ hidrolizinde önemli rol oynayan bitkisel lipazlar içerirler.

Enzimin katalitik etki gösterebilmesi için önce; geçici olarak enzim-substrat (ES) kompleksi oluşur ve bu geçici kompleks daha sonra ürünlere (P) dönüşürken enzimler serbest hale geçer [3].



Enzim molekülünün substratı bağladığı bölge aktif merkez olarak isimlendirilir ve bu merkez her enzim için farklıdır.

Enzimler olağanüstü bir katalitik güce sahiplerdir ve substratlarına karşı seçicilik gösterirler. Enzimler reaksiyon başlaması için gerekli olan aktivasyon enerjisini düşürürler, yani substrattan ürüne geçişte reaksiyonu hızlandırıp, dengenin çabuk yerleşmesini sağlarlar fakat dengeyi değiştirmezler. Enzim ile substrat temas yüzeyinin artması reaksiyonu kolaylaştırmakta ve hızlandırmaktadır [3].

Özel enzimler nisbeten az miktarda üretilirler ve bunlar biyokimyasal ve tıbbi araştırmalarda kullanılırlar. Bu enzimler birim maliyetleri yüksek olduğundan pahalıdırlar [3].

2.2. Enzimatik Hidroliz

Canlı hayvan ve bitkilerde bulunan yağların ana bileşenleri trigliseridlerdir ve organik katalizörler olarak etki eden enzimler yardımıyla bir seri karmaşık reaksiyon sonucu oluşurlar. Bu enzimler trigliseridlerin parçalanma reaksiyonlarında da etki gösterebilirler [1].

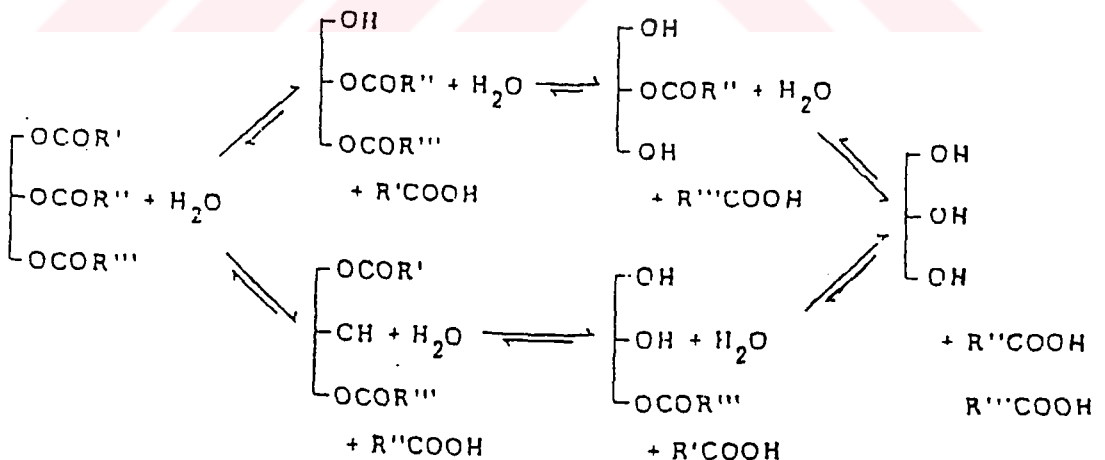
Bitkisel ve hayvansal dokularda bulunan, trigliserid yağları hidrolizleme kabiliyetine sahip olan enzimlerin bu yağlar ve diğer trigliseridler üzerindeki yaptığı etkiye enzimatik hidroliz adı verilir. Diğer grup olan hidrolitik enzimler ise sadece belli lipid yapıları üzerinde etki ederler [6].

Deuel, esteraz ile lipaz arasındaki farkı belirlemek ve bunu belirli temeller üzerine oturtmak amacıyla, trigliseridlerdeki ester bağlarının parçalanması ile monohidrik alkollerin esterlerindeki bağların parçalanmasının mekanizmalarını incelemiştir. Bu çalışmada; lipazların, trigliseridlerin parçalanmasında önemli rol oynadığı gibi basit yapıli esterlerin hidrolizinde de etkili oldukları saptanmış, ancak esterazların trigliserid yapıdaki ester bağları üzerinde herhangi bir etkileri olmadığı belirlenmiştir [6].

Yağların enzimatik hidrolizinde, trigliserid su ile reaksiyona girerek, gliserin ve üç mol yağ asidi oluşturur. Bu proseste di- ve monogliseridler de oluşmaktadır. Hidroliz reaksiyonu üç aşamda oluşmaktadır [7]:

- a) İki izomerik diglisericid oluşumu
b) α ve β monoglisericid oluşumu
c) Gliserin oluşumu

Bu reaksiyon aşağıdaki şekilde gösterilebilir:



Hidroliz reaksiyonu, yağ suda çözünmediği için su-yag arafazında gerçekleşir ve albümin, inorganik tuzlar, organik maddeler, sentetik emülgatörler gibi çeşitli katkı maddelerinin dispersiyonu etkilemesi ile reaksiyon hızı değişir. Suyun yağdaki

çözünürlüğü, yağın sudaki çözünürlüğünden daha fazla olduğundan, hidroliz reaksiyonu yağ fazında çözünmüş suyun etkisi ile oluşan homojen reaksiyonlar olarak bilinmektedir [1].

Enzimatik hidroliz reaksiyonu, 37°C gibi düşük sıcaklıklarda gerçekleştiğinden yağ yapısal olarak bozunmaya uğramaz ve böylece reaksiyon sonunda oldukça kaliteli bir ürün elde edilir. Reaksiyon atmosferik basınç ve oda sıcaklığında dikkate değer bir hız gösterir ve enerji açısından da oldukça ekonomiktir. Bu reaksiyonda kullanılan lipazların hidrolitik etkileri, trigliserid yapısındaki yağ asitlerinin zincir uzunluklarına ve doymamışlığına bağlı olarak değişir. Ayrıca reaksiyonun kompleks bir yapıda ve heterojen bir ortamda olmasından dolayı, farklı çalışma koşullarında ulaşılan sonuçlar da farklıdır. Bu durum enzimatik reaksiyonların dezavantajıdır. Bununla beraber yüksek sıcaklık ve yüksek basınç proseslerine oranla enerji tasarrufu sağlaması ve daha kaliteli ürünler elde edilmesi enzimatik hidroliz reaksiyonları üzerine pek çok araştırma yapılmasına sebep olmuştur [7].

2.3. Çalışmanın Önemi ve Literatürde Yapılan Araştırmalar

Temel yağ kimyasallarının en önemlisi ve en çok üretileni olan yağ asitleri günümüzde kullanım açısından önemli bir yere sahiptir. Yağ asitlerinin en önemli kullanım alanlarına örnek olarak; deterjan, sabun, kozmetik, boya, amin, metal sabunları ve tekstil ürünlerinin üretimi verilebilir. Dolayısıyla günlük yaşantımızın önemli bir kısmında çeşitli ürünler ve türevleri halinde karşımıza çıkan yüzlerce yağ asidinin tüketimi de hızlı olarak artmaktadır.

Günümüzde yağ asitleri üretiminde, yüksek sıcaklık (240-260°C) ve basınç (50 atm) altında gerçekleştirilen sürekli ters akım hidroliz işlemi kullanılmaktadır. Ancak bu yöntem oldukça yüksek sıcaklıkta uygulanır ve proses sırasında yüksek sıcaklık sonucu meydana gelen termal bozunmadan dolayı istenilen kalitede ürün elde edilemez. Bu nedenle yağ asitlerinin üretimi için yeni arayışlar içerisine girilmiştir.

Yağ asitlerinin çok daha ılımlı koşullarda üretimine olanak veren enzimatik yağ hidrolizi, uzun zaman endüstriyel yönden cazip bir proses olarak ele alınmamasına rağmen, biyoteknoloji alanındaki son gelişmelerin yağ teknolojisini önemli yönde etkilemesi ile tekrar gündeme getirilmiştir. Özellikle 1980'li yıllarda bu çalışmalara hız verilmiştir [6,7]. Literatürden seçilen bu konudaki bazı çalışmalar aşağıda özet halinde sunulmuştur.

Linfield ve arkadaşları; *Candida rugosa*, *Aspergillus niger* ve *Rhizopus arrhizus*'dan üretilen kuru ticari lipazların donyağı, hindistan cevizi yağı ve zeytinyağı hidroliz reaksiyonlarındaki etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar *Candida rugosa* ve *Aspergillus niger* lipazının trigliseridlerdeki hem α , hem de β mevkiindeki açıl gruplarına etki ettiklerini dolayısıyla spesifik olmadıklarını, buna karşılık *Rhizopus arrhizus* lipazının ise aksine α pozisyonundaki bağlara spesifik olarak etki gösterdiğini, dolayısıyla hidrolizlenme hızının diğer iki lipazla yapılan hidrolizlenmeden daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, *Candida rugosa* lipazı kullanılarak gerçekleştirilen donyağı, hindistan cevizi yağı ve zeytinyağı hidroliz reaksiyon hızlarının 26° ile 46°C 'ler arasında sıcaklıktan etkilenmediklerini, her üç yağın da 72 saatte %95-98 oranında hidrolizlenebileceklerini fakat zeytinyağının diğer iki yağa oranla daha hızlı hidrolizlendiğini belirtmişlerdir. Ayrıca düşük kaynama noktasına sahip çözücüler kullanılarak donyağı hidrolizinin oda sıcaklığında gerçekleştirilebileceğini de açıklamışlardır. Hidroliz reaksiyonlarına sıcaklık, pH ve enzim konsantrasyonunun etki ettiği de belirtilen çalışmada, hidroliz reaksiyonlarında oluşan serbest yağ asidi miktarı ile hem reaksiyon süresinin, hem de enzim konsantrasyonunun logaritması arasında lineer bir ilişki olduğu da saptanmıştır. İncelenen şartlar altında *Candida rugosa* lipazıyla hidroliz için en iyi substratın zeytinyağı olduğu belirtilmiştir. Aynı araştırmacılar diğer çalışmalarında yine aynı yağların *Candida rugosa* lipazı kullanılarak gerçekleştirilen hidrolizlerinde, çeşitli katkı maddelerinin ve pH'ın etkilerini incelemişlerdir. Yapılan çalışmada hidroliz reaksiyonu üzerinde Ca^{++} iyonunun inhibitör olarak etki ettiği, hidrokarbon çözücülerin ve iyonik olmayan sörfaktanların kayda değer bir etki gösterdiği, Na^{+} iyonunun ve albüminin ise önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir [8,9].

A. Svendsen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise farklı lipazların kullanıldığı ester sentezi ve hidrolizi incelenmiştir. Araştırmacılar *Candida antartica* lipazının spesifik aktivitesinin *Aspergillus* lipazından dört kat daha fazla olduğunu fakat bu enzimin kullanılması durumunda hidroliz ve sentez reaksiyonlarının alışlagelenin tersine düşük pH değerinde ve yüksek sıcaklıkta yapılması gerektiğini belirtmişlerdir [10].

Bu konuda yapılan bir diğer çalışma ise M. Mozammel ve Yamane tarafından mikrogözenekli hidrofobik zarlı biyoreaktörde, *Candida cylindracea* lipazı ile sürekli yöntemle yürütülen zeytinyağı hidrolizidir. Bu hidroliz, özel bir konfigürasyona sahip mikrogözenekli hidrofobik zarlı bir biyoreaktör içinde yapılmıştır. Zeytinyağı ve tampon çözelti sürekli olarak, ters yönde ve lipazın daha fazla absorbe olduğu bir zarla ikiye ayrılan kompartmanın içinde beslenmiştir. Bu çalışmada reaksiyonun lipaz içeren bir zar ile tampon çözeltinin ara yüzeyinde gerçekleştirildiği ileri sürülmüştür [11].

M. Bühler ve C. Wondrey'in ise yaptıkları çalışmada enzimatik yağ hidrolizinde; reaksiyon sistemini, lipaz etkinliğini ve reaksiyon kinetiğini incelemişlerdir. Burada reaksiyonun yağ-su ara faz yüzeyindeki lipazlar tarafından katalizlendiği ve sulu faz miktarının artmasıyla hidrolizlenmenin arttığı, lipaz etkilerinin yağ yapısına göre değiştiği, bazı lipazların yüksek sıcaklıkta termal inaktivasyona uğradıkları, karıştırma hızıyla reaksiyon hızının belirli bir limite kadar arttığı, hem kesikli hem de sürekli operasyonlarda hidroliz derecesinin artmasıyla hidroliz reaksiyonu hızlarının düştüğü ve hidroliz ürünlerinin substrattan ziyade enzime daha bağlı olduğu sonuçları çıkarılmıştır. Ayrıca araştırmacılar 1 atm ve 30-50°C arasında soyafasülyesi yağı ve zeytinyağının enzimatik hidrolizinde en az %95'lik bir hidrolizlenme derecesine ulaşılabileceğini ileri sürerek, denenen çok sayıda mikrobiyal lipaz arasından özellikle *Candida cylindracea* lipazının hidroliz reaksiyonlarında en etkin lipaz olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar sonucunda enzimatik yağ hidrolizinde çözülmeyi bekleyen çok sayıda temel problem olduğunu da açıklamışlardır [12].

Türkay ve arkadaşları ise hint tohumunu lipaz kaynağı olarak değerlendirdikleri çalışmalarında; zeytinyağının hidrolizinde hint tohumunun doğrudan kullanılabilceği gibi tohum sulu ekstratının, pres ve ekstraksiyon artıklarının da değerlendirilebileceğini gözlemişlerdir. Araştırmada tohumdan önce soğuk presleme sonra düşük sıcaklıkta gerçekleştirilen çözücü ekstraksiyonu ile yağ çıkarıldıktan sonra, geri kalan küspenin zeytinyağı hidrolizinde lipaz kaynağı olarak kullanılmasında daha saf bir ürün elde edilebileceğini saptamışlardır [13].

Bu konuda yapılan bir diğer çalışma ise Y. Kasugi ve H. Tanaka tarafından *Pseudomonas fluoresces* lipazı ile sürekli yöntemle yürütülen donyağı ve zeytinyağı hidroliz çalışmasıdır. Değişik tipte ters akımlı reaktörler kullanılarak yapılan bu çalışmada immobilize lipazların, emülsiyon halinde olmayan substratlar kullanıldığında, emülsiyon halindeki substratların kullanıldığı çalışmalara göre çok daha yüksek lipaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca dimetilsülfoksit gibi polar çözücülerin immobilize lipazla yürütülen donyağı hidrolizinde bir miktar artış sağladığı, hidroliz ortamında çözünen lipazla 60°C'de uygulanan hidrolizi reaksiyonlarında ise hidrolizi yavaşlattığı gözlenmiştir [14].

Bilyk ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; *Candida rugosa*, *Parcine pancreas* ve *Rhizomucor miehei* lipazlarını kullanarak değişik koşullarda ve çeşitli organik çözücülerin varlığında balıkyacağı, donyağı, soyayağı ve mısıryağının hidrolizlenmelerini incelemişler ve dietilamin, n-metil bütülin gibi sekonder aminlerle trietilamin gibi tersiyer aminlerin hidrolizlenme derecesinde önemli bir oranda artış sağladığını belirlemişlerdir. Bu araştırmada donyağı hidrolizinin oda sıcaklığı ve ılımlı karıştırma koşullarında 20 saatte, 45°C'de ise 6 saatte tamamlandığı belirlenmiştir. *Rhizomucor* lipazı kullanılarak n-metil bütülin ortamında ve 20°C'de gerçekleştirilen balıkyacağı ve bitkisel yağların hidrolizlerinin ise 20 saatte tamamlandığı gözlenmiştir. Ayrıca incelenen lipazlar arasında özellikle *Rhizomucor miehei* lipazının hidroliz reaksiyonlarında etkin olduğu da belirlenmiştir [15].

M.W. Baillergeon ve P.E. Sonnet'in yaptığı çalışmada cis-9 doymamış yağ asitlerine karşı spesifiklik gösteren *Geotrichum candidum* NRRLY-553 mantarından elde edilen ham lipaz kullanılarak donyağı, kolzayağı ve soyayağının hidroliz reaksiyonları incelenmiştir. Serbest asit ve/veya mono ve diaçilgliseridlerin üretilmesi amaçlanan bu çalışmada lipaz aktivitesi üzerinde pH'ın etkisinin olduğu ve pH=8.2'de aktivitenin maksimum olduğu daha sonra da düştüğü belirtilmiştir. Ayrıca reaksiyonun birinci dereceden reaksiyon olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmada her üç yağ hidrolizi sonucunda da cis-9 doymamış yağ asidinin diğer asitlere göre daha hızlı serbest hale geçtiği de belirtilmiştir [16].

Yapılan bir diğer çalışmada ise F. Ergan ve arkadaşları reaksiyon koşulları ve substrat konsantrasyonunun enzimatik trigliserid sentezi ve trigliserid hidroliz reaksiyonlarındaki etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar triolein üretiminin oleik asit ile reaksiyona girecek 1,2-digliserid mevcudiyetine bağlı olduğunu ve %100'lük bir sentez için esterleşme sırasında oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılması gerektiğini, hidroliz reaksiyonunda ise trioleinin diolein, monoolein ve serbest aside dönüşümünde en yüksek verimin suyun reaksiyon substratı olarak kullanılması ile elde edildiğini belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada, 1,3 seçiciliği olduğu bilinen Mucar miehei'den hazırlanan Lipozim IM-20 lipazı kullanıldığında, spesifik olmayan SP-382 lipazının kullanımına göre daha yavaş bir hızla triolein sentezi gerçekleştiği görülmüştür [17].

M.A. Virto ve arkadaşları da *Candida rugosa* varlığında donyağı ve domuzyağlarının organik bir çözücü ortamında ve yağların erime noktalarının altındaki sıcaklıklardaki hidrolizlenmelerini incelemişlerdir. Reaksiyonlar %50 substrat ve 1 g yağ için 180 lipaz U kullanılarak 2 l'lik reaktörde gerçekleştirilmiştir. %5-10 izooktan varlığında yürütülen domuzyağı hidrolizinde 24 saat sonunda, 25°C'nin altında %97, aynı koşullarda yürütülen donyağı hidrolizinde ise 31°C ve 37°C'lerde %94'lük bir hidrolizlenme derecesine ulaştığı gözlenmiştir. Farklı çözücülerin kullanılması durumunda, sadece izooktan ve n-heptan varlığında yürütülen donyağı hidroliz reaksiyonlarında hidrolizlenme derecesinin %90'ın üzerinde olduğu, çözücünün polaritesinin artması ile hidrolizlenme reaksiyonunun

yavaşladığı da gözlenmiştir. Bu sonuçlar Mukata ve arkadaşlarının, dallanmış hidrokarbonların kullanılması durumunda düz zincirli hidrokarbonlara göre daha yüksek aktivite gözlendiğini belirten çalışmaları ile uyum göstermektedir. Bu çalışmada, yüksek erime noktasına sahip yağların hidrolizinde lipazın termal bozunmasını minimuma indirmek için yağların erime noktalarının altında ve yüksek substrat konsantrasyonunda hidrolizlenmesi gerektiği, ayrıca *Candida* lipazının yağ asitlerinin triaçilgliseroldeki pozisyonları için seçicilik göstermediği, fakat cis-9 pozisyonunda çifte bağ bulunan cis-9 yağ asitlerine karşı biraz seçicilik gösterdiği de açıklanmıştır [18].

G.J. Piazza ve arkadaşları yulaf tohumu (*Avena sativa* L.) lipazının pozisyon ve yağ asidi seçiciliğini inceledikleri çalışmalarında; saf ve simetrik triaçilgliserolleri substrat olarak kullanmışlar ve hidroliz reaksiyonlarını sulu emülsiyon ortamında yürütmüşlerdir. Bu çalışmada yulaf tohumu lipazının, hem primer, hem de sekonder esterlerin hidroliz reaksiyonlarını katalizlediği ve seçiciliğin sıcaklığa bağımlı olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada açıklanan bir diğer sonuç ise yulaf tohumu lipazının trans çifte bağ içeren yağ asitlerine karşı seçiciliği dışında *Geotrichum candidum* lipazı ile benzer seçicilik gösterdiğidir [19].

Yapılan bir diğer çalışmada ise Y. Tanaka ve arkadaşları balıkyagının enzimatik hidroliz reaksiyonunda lipaz etkinliğini incelemişlerdir. Bu araştırmacılar, dokosoheksanoik asit (DHA) konsantrasyonu yüksek bir gliserid karışımı elde etmek amacı ile altı çeşit mikrobiyal lipaz kullanmışlar ve *Candida cylindracea* lipazının kullanıldığı ve %70 hidrolizlenme derecesinin olduğu reaksiyonlarda elde edilen gliserid karışımındaki DHA konsantrasyonunun orijinal balık yağındaki 3 katı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *Candida cylindracea* lipazı kullanılarak yapılan reaksiyonun iki kademede gerçekleştiğini, birinci kademede DHA içermeyen trigliseridlerin hidrolizlendiği, ikinci kademede ise DHA içeren trigliseridlerin hidrolizlendiği belirtilmiştir [20].

D. Yang ve J.S. Rhee yaptıkları bir araştırma ile DEAE-Sephadex A50, Sephadex G50, Sephadex LH-20, Amberlite IRA 94 ve XAD-7 üzerinde immobilize

edilmiş *Candida rugosa* lipazı kullanılarak zeytinyağının organik çözücü ortamında hidrolizlenmesini incelemişlerdir. Bilindiği gibi iyonik veya fiziksel adsorpsiyonla immobilizasyon en ucuz lipaz immobilizasyon yöntemidir. Bu çalışmada iyon değiştirici reçineler (DEAE-Sephadex A-50 ve Amberlite IRA 94) üzerinde immobilize (tutuklanmış) edilmiş enzimlerin, zeytinyağı hidrolizinde kullanılan başka destek maddeleri (support) üzerinde tutuklanmış enzimlere göre daha aktif oldukları görülmüştür. Ayrıca enzim içerisindeki su miktarı arttıkça stabilitenin düştüğü belirtilmiştir. %20 zeytinyağı içeren izooktan ve 25 MM trietanolamin tamponu (pH=7.0) ile yürütülen hidroliz reaksiyonunda 30°C’de yarılanma süresinin 220 saat olduğu da belirlenmiştir [21].

J. Chen ve B. Yeng’in yaptığı çalışmada ise polimer jellerle immobilize edilmiş *Rhizopus arrhizus* ve *Candida cylindracea* mikrobiyal enzimleri kullanılarak süt yağının hidrolizi incelenmiştir. Bu enzimlerin serbest enzimlere göre kısa zincirli yağ asitlerinin serbest hale geçmesinde daha etkili olduğu gözlenmiştir [22].

D.G. Hayes ve R. Kleiman’ın yaptığı çalışmada *Rhizopus arrhizus* ve *Candida cylindracea* lipazları kullanılarak izooktan varlığında *Lequerella fendleri* tohumu yağının hidrolizi incelenmiş ve *Rhizopus arrhizus* lipazının hidroksi yağ asitlerinin serbest hale geçmesinde seçicilik gösterdiği ve bu lipazla yapılan reaksiyonun *Candida cylindracea* lipazıyla yapılan reaksiyondan daha hızlı olduğu açıklanmıştır [23].

L. Dandik ve H.A. Aksoy’un yaptığı çalışmada ise çörekotu tohumu yağının yerinde enzimatik hidrolizinin reaksiyon kinetiği incelenmiştir. Çalışmada parçalanmış tohumlar 20° ile 90°C arasındaki sıcaklıklarda tutularak belirli zaman aralıklarında alınan yağ örneklerin trigliserid içerikleri ölçülmüştür. 20°, 30° ve 40°C’de elde edilen kinetik değerlerin yalancı 1. derece (pseudo first order); 50°, 60° ve 70°C’de elde edilen değerlerin yalancı 2. derece eşitliğine uyduğu, 90°C’de yapılan deney değerlerinin ise iki eşitliğe de uymadığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmada, proses sıcaklığındaki artışın yağ asidi miktarında artış sağladığı fakat yüksek sıcaklıklarda lipaz aktivitesi ve su miktarındaki azalıştan dolayı yağ asidi miktarında da düşüş görüldüğü belirtilmiştir [24].

T.N.B. Kaimal ve arkadaşları da ham hardal yağının, tersiyer bütanolün çözücü olarak kullanıldığı ortamda, *Candida cylindracea* lipazının katalitik etkisi altında hidrolizlenmesini incelemişlerdir. Bu çalışmada reaksiyon için gerekli suyun miktarı ile etkisi araştırılmış, artan su miktarıyla hem hidrolizlenme derecesinin, hem de serbest hale geçen erusik asit miktarının arttığı gözlenmiştir. Ayrıca reaksiyon sonucunda ele geçen ana ürünün diaçilgliserol olduğu ve karbon sayısı 20 ve daha yüksek olan doymuş ve doymamış yağ asitlerinin lipolize karşı bir direnç gösterdiği, serbest hale geçen asitlerinin 16-18 karbonlu olduğu belirtilmiştir [25].

Z. Saito ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise inek sütü içindeki yağ miktarı ve hidroliz arasındaki ilişki incelenmiş, çalışmada sabah ve akşam toplanan inek sütü içerisindeki yağ içeriği ve hidroliz reaksiyonu arasında herhangi bir ilişkinin olmadığı görülmüştür. Akşam toplanan sütteki yağ içeriğinin sabah toplanan süte oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle hidroliz işleminin genellikle akşam toplanan süt ile yapılmasının iyi olacağı belirtilmiştir [26].

G.J. Piazza ve M.J. Haas 2,2,4-trimetil pentanın çözücü olarak kullanıldığı soyayağının hidrolizinde yağı giderilmiş ve parçalanmış yulaf tohumunu enzim kaynağı olarak kullanmışlar ve bu yöntemin soya yağından oleik asit üretimi için kullanılabileceğini ve enzimin tekrar geri kazanılabileceğini belirtmişlerdir [27].

S. Hara ve arkadaşları da yaptıkları bir araştırma ile *Candida Cylindracea*'den elde edilen lipaz OF kullanarak soyayağı ve ketenyağının hidrolizlenmesini incelemişlerdir. Yapılan hidroliz sonucunda lipazın yağ asitleri oluşumunda seçicilik gösterdiği, seçiciliğin doymamış yağ asitleri için linolenik > linoleik > oleik, doymuş yağ asitleri için palmitik > laurik > miristik > stearik, ve doymuş ve doymamış asitler birlikte incelendiğinde ise linolenik > palmitik ve palmitoleik > oleik > eykosopentaenoik > dokosohekzoenoik sırasına göre değiştiği açıklanmıştır. Ayrıca eykosopentaenoik ve dokosohekzoenoik asit gibi poli doymamış yağ asitlerinin ketenyağı, soyayağı, zeytinyağı, ve kokoyağı gibi tipik bitkisel yağlardaki yağ asitleri ile karşılaştırıldığında çok daha az hidrolizlendikleri de belirtilmiştir [28].

Yapılan bir diğer çalışmada ise T. Taniguchi tarafından yüksek seçicilik gösteren bir lipaz ile zeytinyağının hidrolizi incelenmiştir [29].

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada; lipaz kaynağı olarak ısırgan tohumu aseton tozu kullanılarak kullanılmış kızartma yağının çeşitli reaksiyon koşullarındaki hidroliz reaksiyonu incelenmiş ve reaksiyon üzerinde etkili olabilecek faktörler belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu amaçla yağa farklı oranlarda aseton tozu ilave edilerek değişik sıcaklık ve pH değerlerinde hidroliz reaksiyonları yürütülmüştür.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan aseton tozu (ham enzim) Türkiye kökenli ısırgan tohumundan laboratuvar koşullarında izole edilmiş, kullanılmış kızartma yağı ise İTÜ Yemek Kurulu Ayazağa Kampüsü mutfağından temin edilmiştir. Kullanılmış kızartma yağının özellikleri Tablo 3.1’de, Kapiler Gaz Kromatografisi (CGC) yöntemi ile belirlenen yapısal özellikler ise Tablo 3.2’de görülmektedir.

Tablo 3.1. Kullanılmış kızartma yağının özellikleri [3].

Asit değeri (mg KOH/g)	2.32
İyot değeri (mg I/100 g)	117.82
Sabunlaşma değeri (mg KOH/g)	193.90
Kırılma indisi (n_D)	1.4758
Yoğunluk (g/cm ³)	0.9208

Tablo 3.2. Kullanılmış kızartma yağının Kapiler gaz kromatografi yöntemiyle belirlenen yağ asidi bileşimi (% ağırlık) [3].

Yağ Asidi	Bileşim
Palmitik asit ($C_{16:0}$)	9.49
Stearik asit ($C_{18:0}$)	5.62
Oleik asit ($C_{18:1}$)	31.14
Linoleik asit ($C_{18:2}$)	53.75

Tampon çözeltiler potasyum dihidrojen fosfat (1/15 mol/l) ve di-sodyum hidrojen fosfat (1/15 mol/l) çözeltileri kullanılarak hazırlanmıştır.

Deneylerde kullanılan tüm kimyasal maddeler Merck ürünüdür.

3.2. Deney Düzenegi ve Kullanılan Cihazlar

Enzimatik hidroliz reaksiyonu, ısıtıcı üzerine konulmuş bir su banyosuna daldırılmış, kontakt termometre, termometre ve mekanik karıştırıcı ile teçhiz edilmiş üç boyunlu, 250 ml hacimli cam bir balonda gerçekleştirilmiştir. Isıtıcı olarak Framo-Geratetechnik D 7821 Reisenbach/Hochschwarzwald 1 seri numaralı sıcaklık kontrollü manyetik karıştırıcılı ısıtıcı, karıştırma işlemi için ise IKA labortechnik RW20 D2M seri numaralı mekanik karıştırıcı kullanılmıştır. Sıcaklık $\pm 1^{\circ}\text{C}$ hassasiyet ile kontrol edilmiştir. Karıştırma hızı tüm reaksiyonlarda 500 devir/dak'da sabit tutulmuştur.

Tohumların parçalanması ve aseton tozu hazırlanmasında, 1 litre hacimli cam hazneli Braun marka parçalayıcı kullanılmıştır.

3.3. Hidroliz Reaksiyonunun Yürütülmesi

Hidroliz reaksiyonu için 80 gram yağ ve 80 ml tampon çözelti reaksiyon balonuna alınarak ısıtılmış ve karışım istenilen sıcaklığa ulaştığında enzim kaynağı

ilave edilmiştir. Bu koşullar altında reaksiyon gerçekleştirilirken belirli zaman aralıklarında alınan numuneler 90°C sıcaklıktaki su banyosunda 15 dakika ısıtılarak enzimin inaktif hale geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu numuneler santrifüjlenerek yağ fazı ile lipaz kaynağının birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Ayrılan yağ fazını kurutmak için susuz Na₂SO₄ ilave edilerek, karışım son kez santrifüjlenmiştir. Berrak yağ fazından alınan örneklerin 0.1 g/10 ml kloroform olacak şekilde çözeltisi hazırlanarak, bileşimleri TLC-FID kombine sistemi olan latroscan TH10 cihazı ile saptanmıştır. Analiz işleminde yürütücü sistem olarak Petrol eteri: Dietil eter:Asetik asit (70:30:2) kullanılmıştır. Örneklerin TLC-FID sistemindeki analizi için hidrojen gazı debisi 160 ml/dak, hava debisi 2200 ml/dak ve tarama hızı 30 sn/tarama olarak seçilmiştir. Ürünlerin serbest yağ asidi içeriklerinden asit değerleri, elde edilen asit değerlerinden de aşağıdaki formüle göre hidrolizlenme dereceleri hesaplanmıştır.

$$\text{Hidrolizlenme derecesi} = 100 (AV_2 - AV_1) / (SV - AV_1)$$

Burada AV₁ ve AV₂ sırasıyla başlangıçtaki ve belirli t anındaki asit değerlerini, SV ise kullanılmış kızartma yağının sabunlaşma değerini göstermektedir.

3.4. Aseton Tozu Hazırlanması

Deneylerde, O.A. Afolabi ve arkadaşlarının Vernonia galamensis tohumu ile geliştirdikleri yöntem kullanılarak ısırgan tohumundan aseton tozu (ham enzim) hazırlanmıştır [30].

Aseton tozu hazırlanması için, 1 litre hacimli, cam haznesi +4°C'de soğutulmuş parçalayıcıya her defasında 100 gram tohum konulmuş ve içine +4°C'de soğutulmuş 200 ml aseton ilave edilmiştir. Bu karışım tuz-buz karışımı içinde soğutulan 1000 ml'lik bir behere alınmıştır. Parçalayıcı içersinde kalan kalıntı, 150 ml aseton ile çalkalanarak bu karışıma ilave edilmiş ve karışım 1 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra düşük yoğunluklu maddeler dekante edilerek vakum filtresinde süzölmüştür. Beherde kalan tohum artıkları 2 kez 250 ml aseton ile yıkanıp düşük yoğunluklu maddeler filtre kekine ilave edilmiştir. Filtre keki tuz-buz

karişımı içersinde soğutulan 1000 ml'lik bir behere alınıp, 2 kere her defasında 150 ml aseton ile daha sonra 2 kere 100 ml aseton ile yıkanmıştır. Düşük yoğunluklu maddeler dekante edilerek vakum filtresinde süzölmüştür. Elde edilen toz filtre kağıdına iyice yayılarak eker ocak içinde kurutulmuş ve kullanılıncaya kadar buzdolabında saklanmıştır. Aseton tozu olarak isimlendirilen bu toz ısırgan tohumundan elde edilen ham enzimdir ve herhangi bir saflaştırma yapılmadan deneylerde lipaz kaynağı olarak kullanılmıştır.

Aseton ile çöktürme yönteminde 100 gram ısırgan tohumundan ortalama 19.2 g aseton tozu elde edilmiştir.

3.5. Isırgan Tohumu Lipazının Hidroliz Reaksiyonunda Kullanımı

Enzimatik hidroliz reaksiyonları, yukarıda açıklanan yöntem ile üretilen ham lipaz kullanılarak optimum şartlar belirlenecek şekilde yürütölmüştür. Bu amaçla, reaksiyonlar öncelikle sıcaklık 40°C'de pH=8.0'de sabit tutularak ham enzim miktarı yağın ağırlıkça %25'i, %30'u, %35'i ve %40'i olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar daha sonra en yüksek dönüşümün elde edildiği; yağın %40'ı kadar ham enzim kullanılarak; 30°C,35°C,40°C,45°C ve 50°C'de ve pH=8.0 olan tampon çözelti ile gerçekleştirilmiş ve bu enzimin kullanılabileceği optimum sıcaklık belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki bölümlerinde ise reaksiyonlar pH'ın enzim aktivitesi, dolayısıyla hidrolizlenme derecesi üzerindeki etkisini görebilmek amacıyla pH=5.0, pH=6.0, pH=7.0 ve pH=8.0 değerlerindeki tampon özeltiiler ile yürütölmüştür. Tüm hidroliz reaksiyonlarında reaksiyon süresi 9 saat olarak seçilmiştir.

3.5.1. Ham Enzim Miktarının Hidroliz Reaksiyonuna Etkisi

Fosfat tampon çözeltisi (pH=8.0) varlığında 40°C'de yağın %25, %30, %35 ve %40'ı kadar aseton tozu kullanılarak yürütölen hidroliz reaksiyonlarında elde edilen hidrolizlenme dereceleri Tablo 3.3'de, ürün bileşimleri ve serbest asit

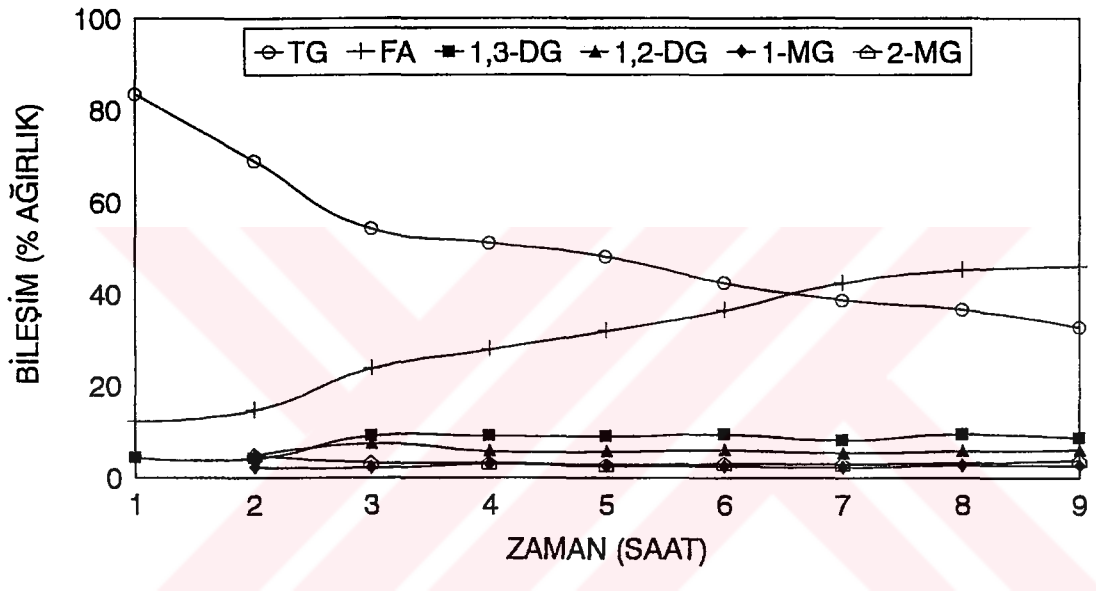
miktarlarının zamana göre değişimi ise Şekil 3.1-3.5'de sunulmuştur. Tablo ve şekillerden görüldüğü gibi incelenen koşullarda ham enzim miktarı arttıkça hidrolizlenme derecesi ve ürünün serbest asit miktarı artmaktadır. %25 enzim kullanımında ürünün asit içeriği 3. saatte yaklaşık %24, 9. saatte %46 iken bu değerler %40 enzim kullanımında sırası ile %50 ve %76'ya yükselmiştir. %40 enzim kullanımında yaklaşık 7 saatte dengeye ulaşılmıştır.

Farklı miktarlarda aseton tozu ile yürütülen bu reaksiyonlarda elde edilen tüm ürünlerdeki 2-MG/1-MG oranları yaklaşık olarak 1:1'dir. Diglisidler için ise 1,3-DG/1,2-DG oranı yaklaşık olarak 2'dir.

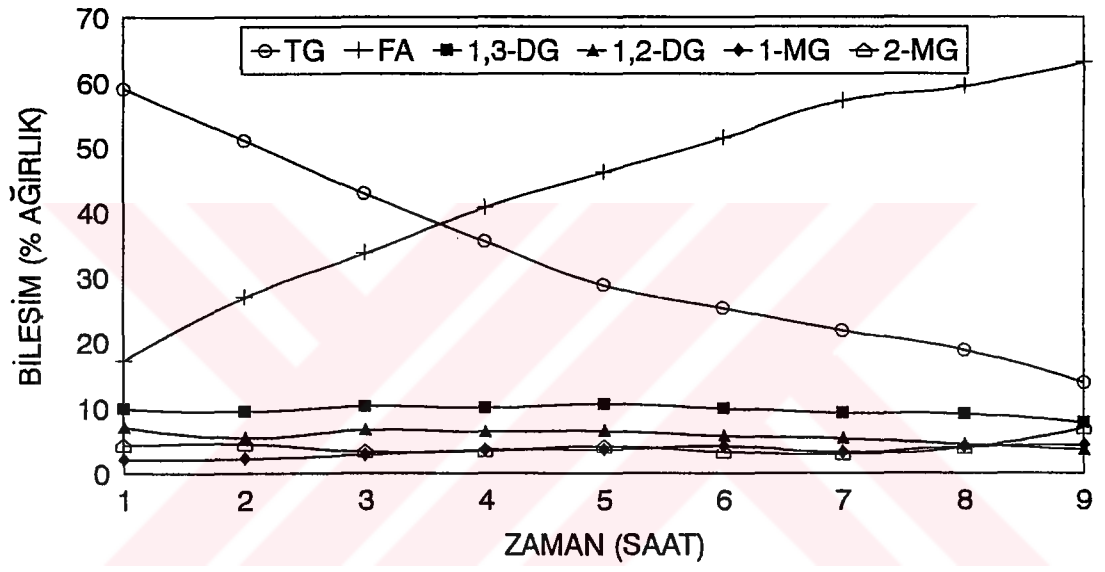
Tablo 3.3. Farklı enzim oranlarında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonlarında hidrolizlenme derecesinin zamana göre değişimi (Sıcaklık=40°C, pH=8.0).

Zaman (saat)	% 25	% 30	% 35	% 40
Başlangıç	0	0	0	0
1	11.57	16.80	--	19.24
2	14.15	27.02	33.32	37.49
3	23.62	34.14	44.21	51.11
4	28.04	41.52	49.70	57.80
5	32.23	47.15	55.95	62.44
6	36.99	52.72	61.71	70.66
7	43.29	58.76	64.39	76.25
8	46.28	61.15	68.19	--
9	47.10	65.05	71.20	78.95

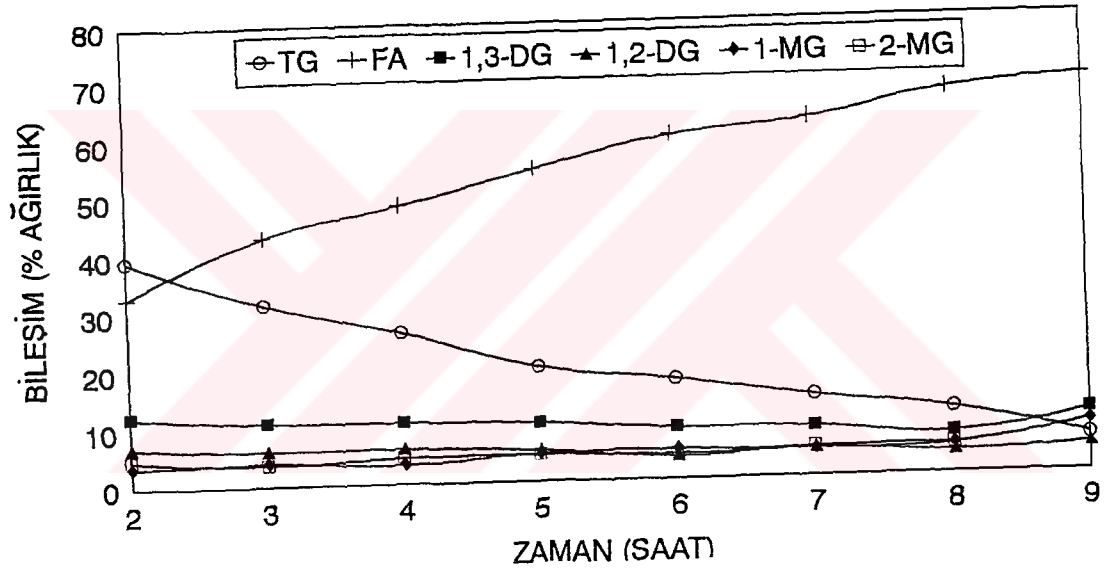
Tablo ve şekillerdeki değerlerden görülebileceği üzere incelenen koşullarda en uygun aseton tozu miktarının yağın ağırlıkça %40'ı kadar olduğu belirlenmiştir.



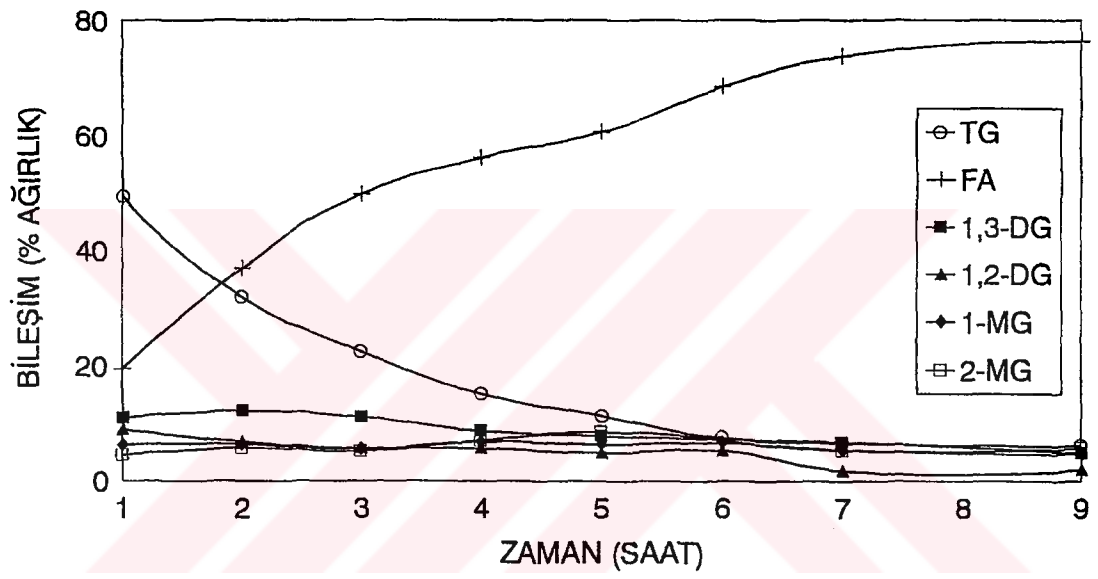
Şekil 3.1. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde ürün bileşiminin zamanla değişimi (Enzim miktarı = %25, pH=8.0, T=40°C).



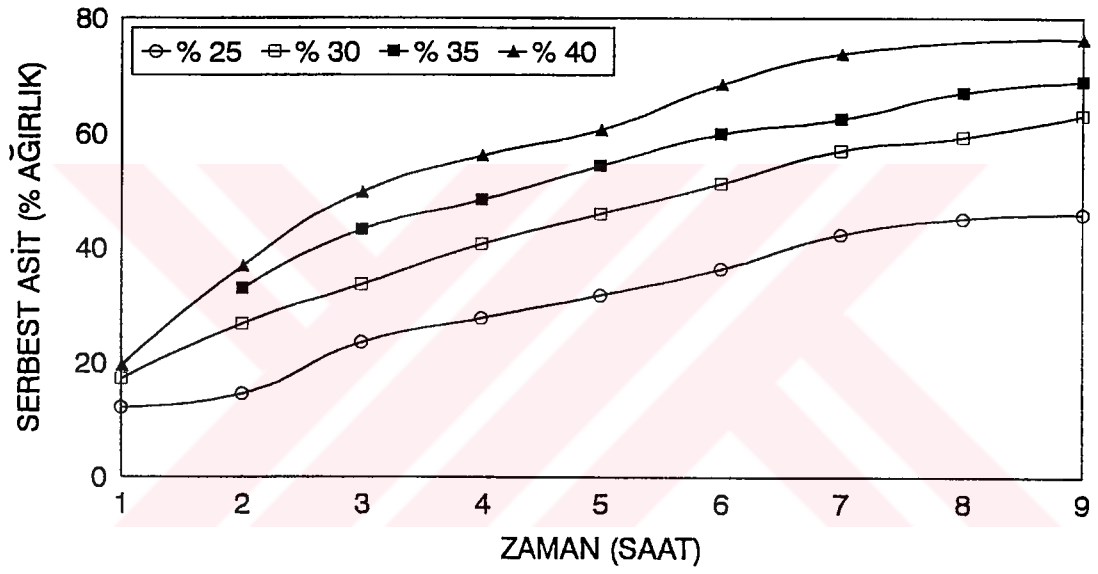
Şekil 3.2. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde ürün bileşiminin zamanla değişimi (Enzim miktarı = %30, pH=8.0, T=40°C).



Şekil 3.3. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde ürün bileşiminin zamanla değişimi (Enzim miktarı = %35, pH=8.0, T=40°C).



Şekil 3.4. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde ürün bileşiminin zamanla değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0, T=40°C).



Şekil 3.5. Aseton tozu miktarının ürün asit miktarına etkisi
(pH=8.0, T=40°C).

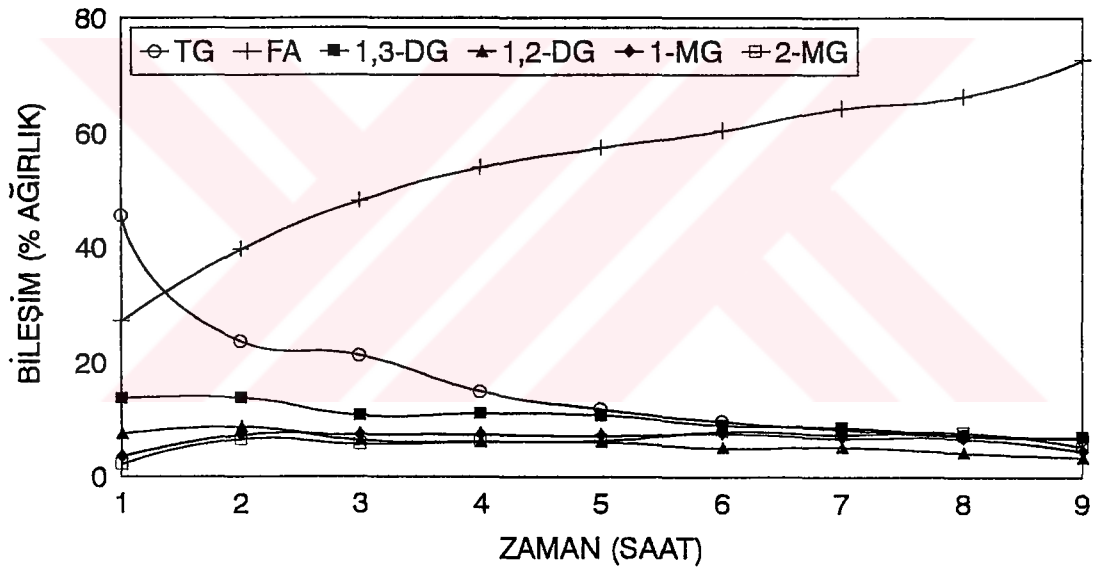
3.5.2. Enzimatik Hidroliz Reaksiyonunda Sıcaklığın Etkisi

Hidroliz reaksiyonları, sıcaklığın etkisini belirlemek amacı ile pH=8.0 ve yağın ağırlıkça %40'ı kadar aseton tozu kullanılarak 30°C, 35°C, 40°C, 45°C ve 50°C'de gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda elde edilen hidrolizlenme dereceleri Tablo 3.4'de, ürün bileşimlerinin ve asit değerlerinin zamana göre değişimi ise Şekil 3.1 ve Şekil 3.6-3.10'da görülmektedir.

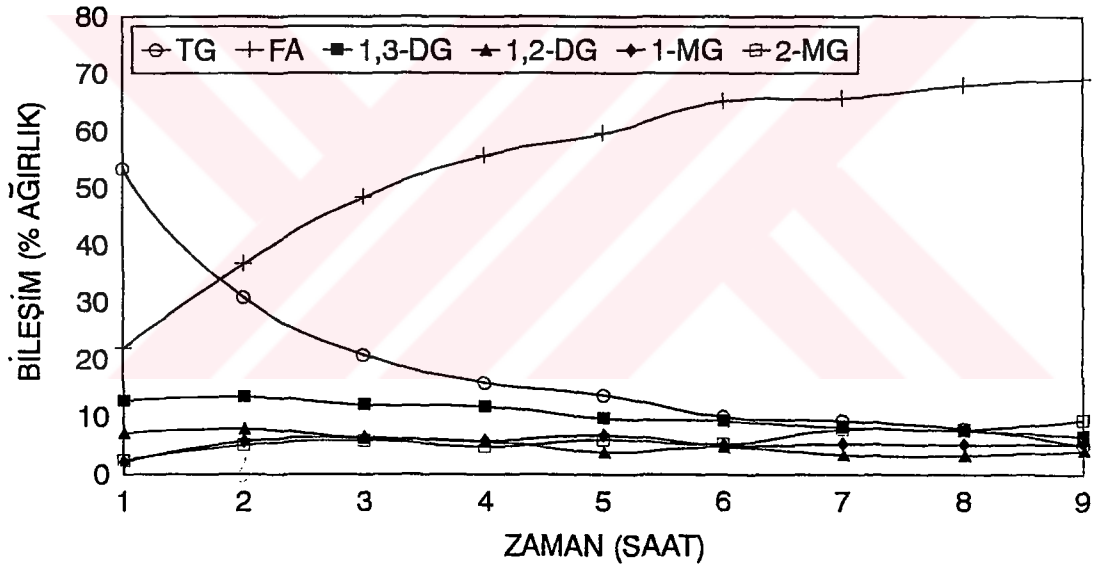
Tablo 3.4. Kullanılmış kızartma yağının ısırgan tohumu aseton tozu ile hidrolizinde sıcaklığın etkisi ve hidrolizlenme derecelerinin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0).

Zaman (saat)	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
Başlangıç	0	0	0	0	0
1	27.42	21.86	19.24	24.85	21.39
2	40.40	37.37	37.49	33.44	37.04
3	49.36	49.56	51.11	41.00	44.37
4	55.54	57.22	57.80	48.61	52.52
5	59.10	61.26	62.44	53.50	55.15
6	62.24	67.18	70.66	59.70	63.99
7	66.19	67.76	76.25	66.43	66.28
8	68.44	70.08	--	69.51	68.09
9	75.07	71.24	78.95	72.94	68.95

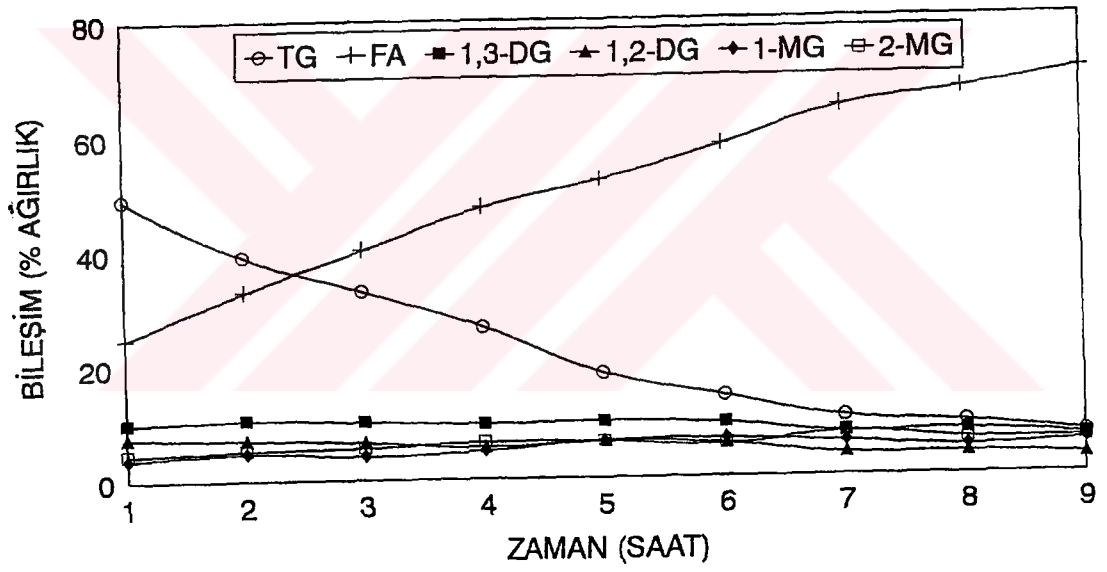
Elde edilen sonuçlara göre, yağın ısırgan tohumu lipazının katalitik etkisi altında ilk 5 saatte 30°C-40°C'ler arasındaki hidrolizlenme hızları yaklaşık olarak eşittir. Ancak 40°C'de 5. saatten sonra hidrolizlenme hızı artmış ve 9 saatlik bir reaksiyon sonunda yaklaşık olarak %79'luk bir hidrolizlenme derecesine ulaşılmıştır. 45°C ve 50°C'lerde başlangıçta düşük olan hidrolizlenme dereceleri 6. saatten sonra 30°C ve 35°C'deki değerlere yaklaşmıştır. 9 saatlik bir reaksiyon sonunda en yüksek serbest asit içeriği 40°C'de ve %79 olarak gözlenmiştir.



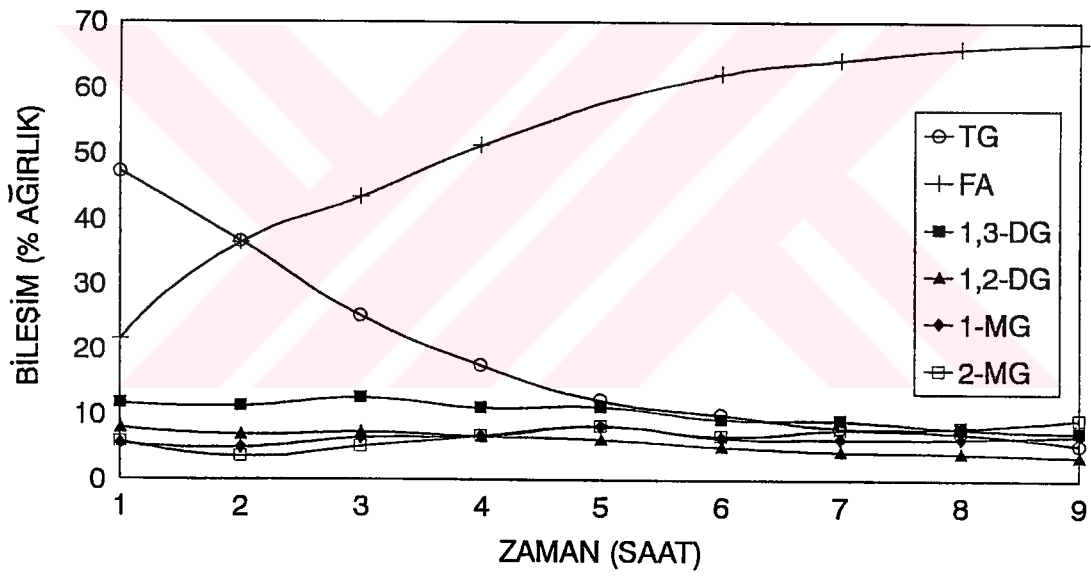
Şekil 3.6. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0, T=30°C).



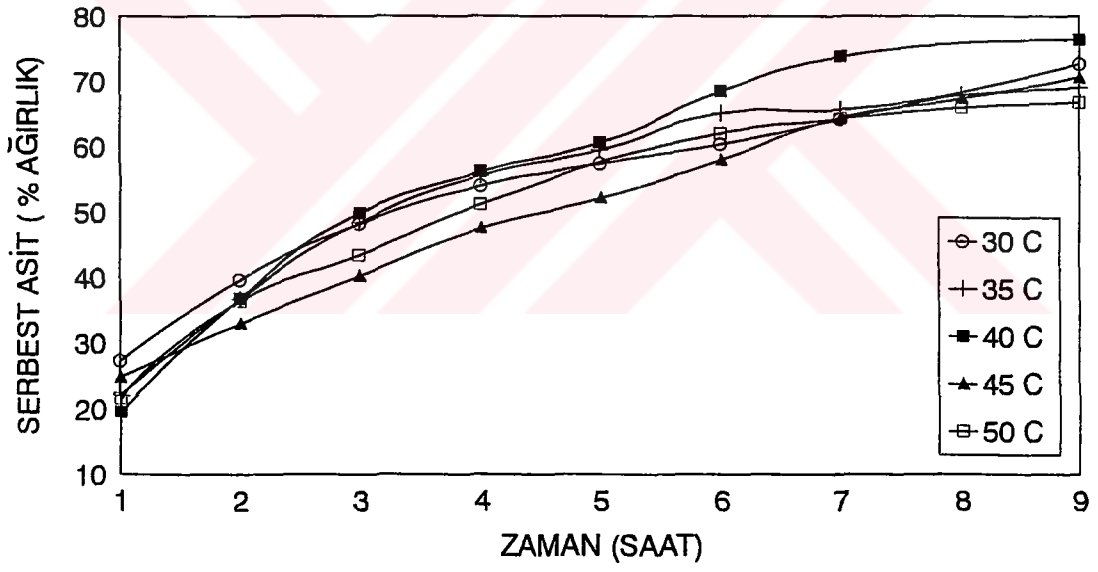
Şekil 3.7. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0, T=35°C).



Şekil 3.8. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0, T=45°C).



Şekil 3.9. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0, T=50°C).



Şekil 3.10. Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlarda ürün asit miktarlarının zamanla değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0).

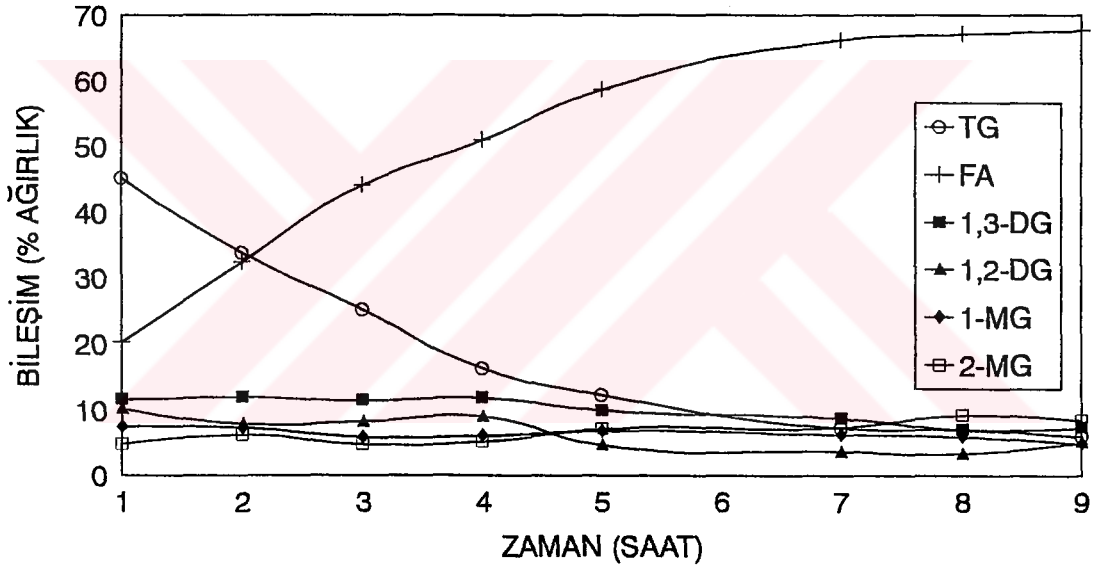
3.5.3. Enzimatik Hidroliz Reaksiyonunda pH'ın Etkisi

Isırgan tohumu aseton tozu miktarı %40 (yağa göre) ve sıcaklık 40°C'de sabit tutularak pH'ın hidroliz reaksiyonundaki etkisini araştırmak için, pH'ları 5.0-8.0 arasında değişen fosfat tampon çözeltileri kullanılarak yürütülen hidroliz reaksiyonlarında elde edilen hidrolizlenme dereceleri Tablo 3.5'de, ürün bileşimlerinin ve serbest asit miktarlarının zamana göre değişimleri ise Şekil 3.1 ve Şekil 3.11-3.14'de görülmektedir. pH=6.0'da yapılan incelemelerde ürünün ayrılmasında karşılaşılan zorluklar nedeni ile ilk 2 saatteki örneklerin bileşimleri tekrarlı sonuç vermemiştir. Bu nedenle grafik ve tablolarda bu değerler verilmemiştir.

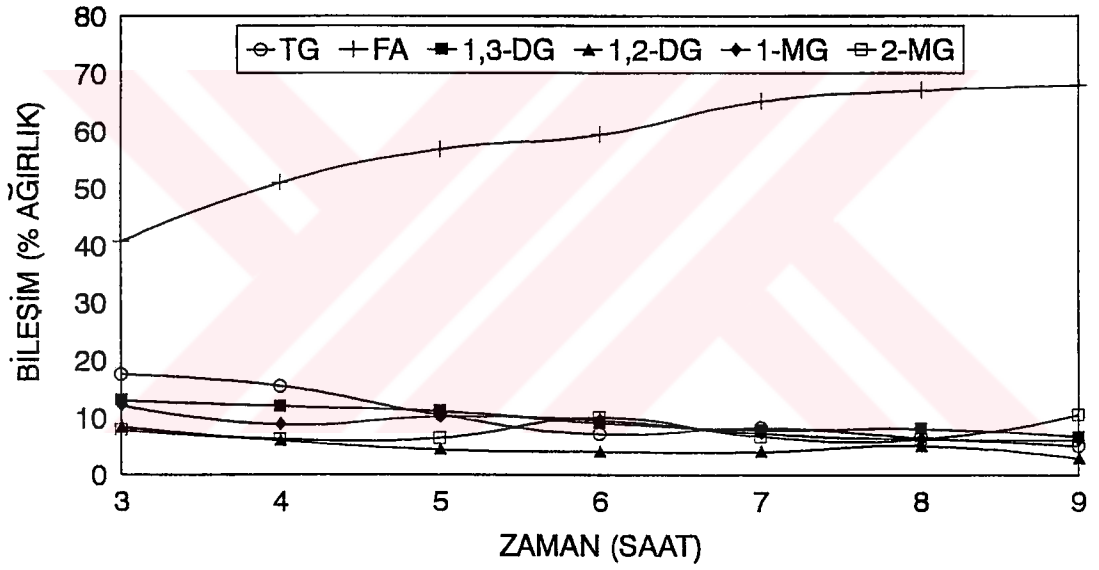
Tablo 3.5. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde pH'ın hidrolizlenme derecesine etkisi (Enzim miktarı = %40, sıcaklık=40°C).

Zaman (saat)	pH=5.0	pH=6.0	pH=7.0	pH=8.0
Başlangıç	0	0	0	0
1	20.07	--	22.16	19.24
2	32.88	--	39.14	37.49
3	45.14	41.53	52.76	51.11
4	52.32	52.34	54.59	57.80
5	60.37	58.44	58.74	62.44
6	57.39	61.20	70.96	70.66
7	68.31	67.26	73.41	76.25
8	69.24	69.25	67.18	--
9	69.92	70.15	69.51	78.95

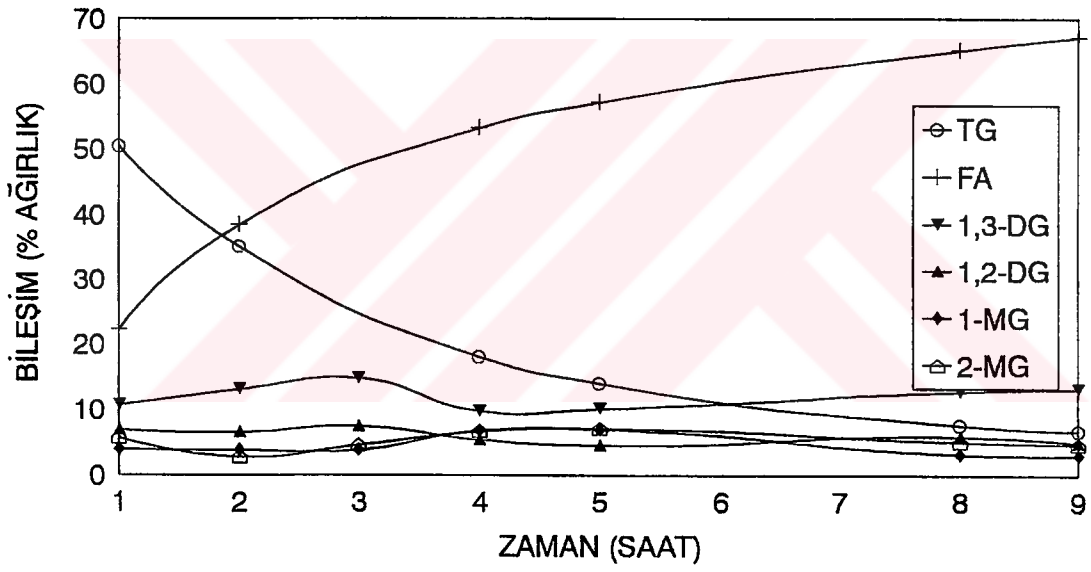
Elde edilen sonuçlara göre; incelenen koşullarda pH'ın önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Dengenin yaklaşık 8 saatte olduğu bu reaksiyonlarda gözlenen en yüksek serbest asit içeriği %76'dır ve pH=8.0'de 9 saatlik bir reaksiyon sonunda belirlenmiştir.



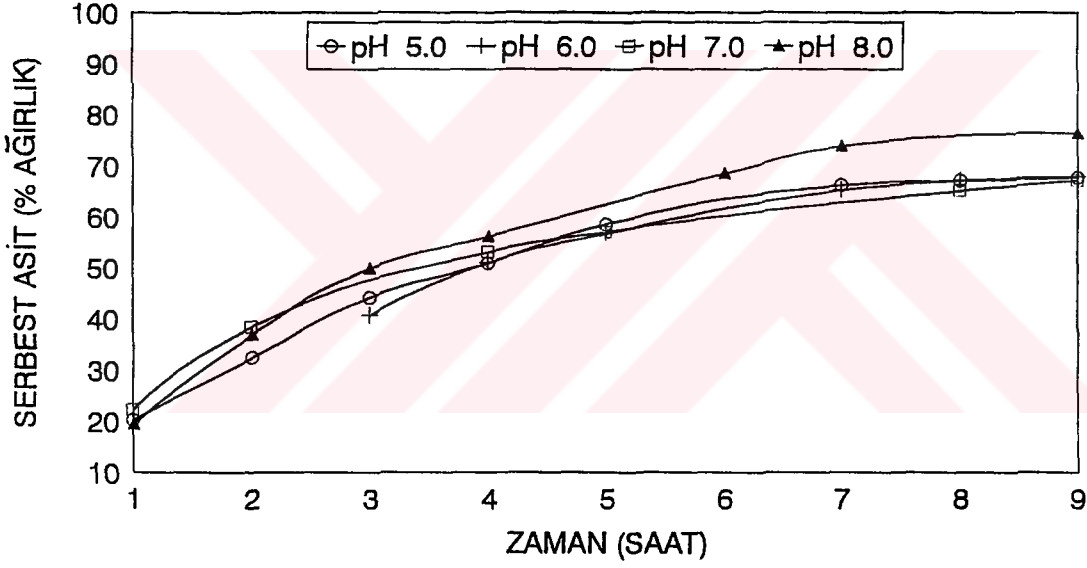
Şekil 3.11. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=5.0, T=40°C).



Şekil 3.12. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=6.0, T=40°C).



Şekil 3.13. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidroliz ürünü bileşiminin zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=7.0, T=40°C).



Şekil 3.14. Farklı pH değerlerindeki fosfat tampon çözeltiler ile gerçekleştirilen reaksiyonlarda elde edilen ürünlerin asit miktarının zamana göre değişimi (Enzim miktarı = %40, $T=40^{\circ}\text{C}$).

3.5.4. Reaksiyon Kinetiği

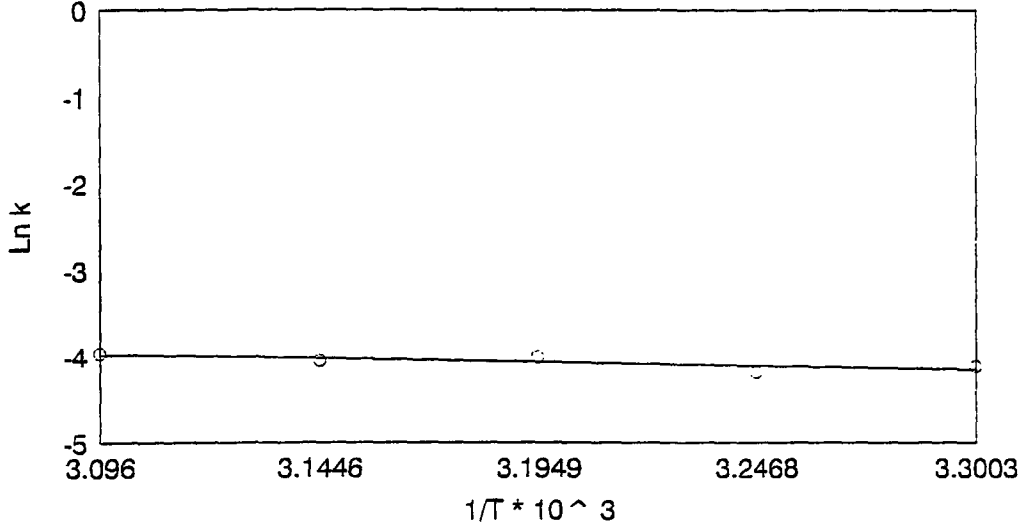
Çalışmanın bu bölümünde, ısırgan tohumu ham lipazı ile gerçekleştirilen, kullanılmış kızartma yağının optimum enzim miktarı ve pH'da uygulanan, hidrolizlenme reaksiyonunun kinetiği incelenmiştir. Bu amaçla farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen reaksiyonlardan elde edilen ürünlerin trigliserid içeriklerinden faydalanılarak reaksiyon hız sabitlerinin, reaksiyon mertebesinin ve aktivasyon enerjisinin belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla hidroliz reaksiyonlarının mertebesinin 1. ve 2. dereceden olduğu kabul edilip $\ln C - \ln C_0 = k \cdot t$ ve $1/C - 1/C_0 = k \cdot t$ diferansiyel eşitlikleri kullanılarak $\ln C$ ve $1/C$ 'nin zamana göre değişimleri grafik üzerinde gösterilmiştir. Denklemlerde görülen k reaksiyon hız sabiti, t zaman, C_0 başlangıçtaki TG konsantrasyonunu, C ise t anındaki TG konsantrasyonunu ifade etmektedir. Deneysel değerlerin türetilen bu eşitliklere uygulanmasında en küçük kareler yönteminden yararlanılmış ve korelasyon katsayısı (r), determinasyon katsayısı (r^2) ve standart sapma belirlenmiştir. Bu değerlendirmelere göre enzimatik hidroliz reaksiyonunun mertebesinin 2. derece eşitliğine uyduğu belirlenmiştir. İncelenen hidrolizlenme reaksiyonunda sıcaklığın reaksiyon hızı üzerindeki etkisi Tablo 3.6'da görülmektedir.

Tablo 3.6. Kullanılmış kızartma yağının enzimatik hidrolizinde reaksiyon hız sabitlerinin sıcaklığa göre değişimi (Enzim miktarı = %40, pH=8.0).

Sıcaklık	Reaks. Hız Sabiti*, k	r	r^2	Standart Sapma
30°C	0.0162326	0.997702	0.9954092	0.0386139
35°C	0.0151725	0.9994957	0.9989916	0.0386193
40°C	0.0181175	0.9967811	0.9935726	0.0469302
45°C	0.0173571	0.9987068	0.9974152	0.0257048
50°C	0.01893	0.9974531	0.994927	0.0374258

* : Reaksiyon hız sabitinin birimi (k) = (% ağırlık)⁻¹ (saat)⁻¹

$\ln k$ 'nın $1/T$ 'ye göre değişimi Şekil 3.15'de verilmiştir.



Şekil 3.15. Sıcaklığın hidroliz reaksiyonu hız sabitine etkisi.

Görüldüğü gibi, 30°-50°C'ler arasında ve incelenen koşullarda aktivasyon enerjisi çok düşüktür.

Bu kinetik çalışmada ardışık reaksiyonlardan meydana gelen hidroliz reaksiyonu tek kademeli bir reaksiyon gibi kabul edilmiş ve incelemelerde su fazlası ile çalışıldığı için suyun etkisi dikkate alınmamıştır.

Bu nedenle kinetik çalışmaların daha derinlemesine incelenmesi gerekmektedir.

BÖLÜM 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışma ile lipaz kaynağı olarak ısırgan tohumundan elde edilen aseton tozunun kullanıldığı enzimatik yağ hidrolizi reaksiyonunda optimum koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda enzim miktarının hidrolizlenme derecesinde önemli bir etkisinin olduğu gözlenmiştir.

Enzim miktarı arttıkça hidrolizlenme derecesi ve ürünün serbest asit miktarı artmıştır. İncelenen koşullarda en uygun aseton tozu miktarının yağın ağırlıkça %40'ı kadar olduğu belirlenmiştir. Farklı miktarlarda aseton tozu ile yürütülen bu reaksiyonlarda elde edilen tüm ürünlerdeki 2-MG/1-MG oranları yaklaşık olarak 1:1'dir. Digliseridler için ise 1,3-DG/1,2-DG oranı yaklaşık olarak 2'dir.

Isırgan tohumu lipazının katalitik etkisi altında, 30°-40°C'ler arasındaki hidrolizlenme hızlarının yaklaşık olarak eşit olduğu belirlenmiştir. Ancak en yüksek miktarda serbest asit içeren ürün 40°C'de elde edilmiştir. 45°-50°C'lerde başlangıç hızlarının daha düşük olduğu 6. saatten sonra 30°-35°C'deki değerlere yaklaştığı da gözlenmiştir.

Bu çalışmada, hidrolizlenme reaksiyonuna incelenen koşullarda pH'ın önemli bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. 7 saat sonunda gözlenen en yüksek serbest asit oluşumu (~ %74) pH=8.0'de görülmüştür.

Çalışmanın diğer bir bölümünde, ısırgan tohumu lipazı varlığında gerçekleştirilen kullanılmış kızartma yağının hidrolizlenme reaksiyonunun kinetiği incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre deneysel değerlerin ikinci mertebe hız ifadesine uyduğu görülmüştür.

Bu konuda daha sonra yapılacak çalışmada karıştırma hızı, tampon çözelti miktarı ve çeşitli katkı maddelerinin etkisinin incelenmesi faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] DANDİK, L., ARIÖĞLU, G., AKSOY, H.A., The Enzymatic Hydrolysis of Used Frying Oil By Native Lipase, Appl. Biochem.Biotechnol., 42, 119-126, (1993).
- [2] TOKMAN, N., EL, N., Kullanılmış Kızartma Yağının Enzimatik Hidrolizinde Tohum Miktarı ve Katkı Maddelerinin Etkisi, Bitirme Ödevi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul,(1993).
- [3] ÇERÇİÖĞLU, N., Enzim İzolasyonu ve Katalitik Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul, (1995).
- [4] AVCIBAŞI, G.Y., Domuz Ciğeri ve Bezelye Tohumundan Diamin Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul, (1991).
- [5] BATUHAN, F., Enzimolojiye Genel Bakış, Bitirme Ödevi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul, (1990).
- [6] MARKLEY, K.S., Fatty Acids, Part 3, 1996-2013, Krieger Publishing Company, Florida, (1983).
- [7] ROBERT, W.J., (Editor), Fatty Acids in Industry Processes, Properties, Derivates, Applications, 51-72, Marcel Dekker, Inc., New York, (1989).
- [8] LINFIELD, W.M., OBRIEN, S.D., SEROTA, S., BARAUSKOS, R.A., Lipid-Lipase Interactions. I. Fat Spliting With Lipase From

Candida rugosa, J. Am. Oil Chem. Soc., 61, 6, 1067-1071, (1984).

- [9] LINFIELD, W.M., BARAUSKOS, R.A., SIVIERI, L., SERATO, S., STEVENSONSR, R.W., Enzymatic Fat Hydrolysis and Synthesis, J. Am. Oil Chem. Soc., 61, 2, 191-195, (1984).
- [10] SVENDSEN, A., PATHAR, S.A., *Candida antarctica* Lipase Variants, PTC Int. Appl. WO 94 01, 541, 1994, C.A. 120: 293005 b, (1994).
- [11] HOO MOLAMMEL, M., YAMANE, T., SHIMIZU, S., Continuous Hydrolysis of Olive Oil By Lipase In Microporous Hydrophobic Membrane Bioreactor, J. Am. Oil Chem. Soc., 62, 4, 1016-1020, (1985).
- [12] BÜHLER, M., WAN PREY, C., Enzymatic Hydrolysis of Fats, HENKEL-Referate 123, 29-35, (1987).
- [13] BOR, T., ERİM, M., TÜRKAY, S., Hint Tohumu Lipazı ile Bitkisel Yağların Enzimatik Hidrolizi, 5. Kimya ve Kimya Mühendisliği Sempozyumu, Ankara, (1988).
- [14] KASUGİ, Y., TANAKA, H., Continuous Hydrolysis of Oil By Immobilized Lipase In A Countercurrent Reactor, Biotechnol. Bioeng., 36, 617-622, (1990).
- [15] BILYK, A., BISTLINE, R.G., HAAS, M.J., FEAIRHELLER, S.H., Lipase-Catalyzed Triglycerid Hydrolysis In Organic Solvent, J. Am. Oil Chem. Soc., 68, 5, 320-323, (1991).
- [16] BAILLARGEON, M.W., SONNET, P.E., Selective Lipid Hydrolysis By *Geotrichum Candidum* NRRL Y-553 Lipase, Biotechnol. Lett., 13, 12, 871-874, (1991).

- [17] ERGAN, F., TRANI, M., ANDRE, G., Use of Lipases In Multiphasic Systems Solely Composed of Substrates, J. Am. Oil Chem. Soc., 68, 6, 412-417, (1991).
- [18] VIRTO, M.D., LASCARAY, J.M., SOLOZABAL, R.D., RENOBALLES, M., Enzymic Hydrolysis of Animal Fats In Organic Solvents At Temperatures Below Their Melting Points, J. Am. Oil Chem. Soc., 68, 5, 324-327, (1991).
- [19] PIAZZA, G.j., BILYK, A., BROWER, D.P., HAAS, M.J., The Positional And Fatty Acid Selectivity Of Oat Seed Lipase In Aqueous Emulsions, J. Am. Oil Chem. Soc., 69, 10, 978-981, (1992).
- [20] TANAKA, Y., HIRANO, J., TADASHI, F., Concentration of Docosohexaenoic Acid In Glyceride By Hydrolysis Of Fish Oil With *Candida cylindracea* Lipase, J. Am. Oil Chem. Soc., 69, 12, 1210-1214, (1992).
- [21] YANG, D., RHEE, J.S., Continous Hydrolysis Of Olive Oil By Immobilized Lipase In Organic Solvent, Biotechnol. Bioeng., 40, 748-752, (1992).
- [22] CHEN, J., YANG, B., Enhancement Of Release Of Short-Chain Fatty Acids From Milk Fat with Immobilized Microbial Lipase, J. Food Science, 57, 3, 781-782, (1992).
- [23] HAYES, D.G., KLEIMAN, R., Recovery of Hydroxy Fatty Acids From *Lesquerella Oit* With Lipases, J. Am. Oil Chem. Soc., 69, 10, 982-985, (1992).
- [24] DANDÍK, L., AKSOY, H.A., The Kinetics Of Hydrolysis Of *Nigella Sativa* (Black Cumin) Seed Oil Catalyzed By Native Lipase In Ground Seed, J. Am. Oil Chem. Soc., 69, 12, 1239-1241, (1992).
- [25] KAIMAL, T.N.B., PRASAD, R.B.N., CHANDRASEKHARA RAO, T., A Novel Lipase Hydrolysis Method To Concentrate Erucic Acid

Glycerides In Cruciferae Oils, *Biotechnol. Lett.*, 15, 4, 353-356, (1993).

- [26] SAITO, Z., Relations Among Lipolysis Lipase Activity, And Fat Content In Cow Milk, *Rakunoc Kogaku, Shokuhin No Kenkyu*, 41, 5, A 173-A 179, 1992, C.A. 118:253474w, (1993).
- [27] PIAZZA, G.J., HAAS, M.J., Rapit Fat and Oil Splitting Using A Lipase Catalyzed Found In Speeds U.S. Pat. Appl. US 855-805 15 Aug. 1992, Appl. 23 Mar. 1992, C.A. 118:58244 d, (1993).
- [28] HARA, S., TAKAHIRO, T., YOICHIRO, T., Fatty Acid Selectivity Of Microbial Lipase, *Seskei Daigaku Kogakubu Kogaku Hokoku*, 54, 3637-3645, 1992, C.A. 118:37815a, (1993).
- [29] TANIGUCHI, T., Apparatus For Fat And Oil Hydrolysis And Reaction Method, *Jpn. Kokoi Tokkyo Koko Jp* 05, 179, 284 [93, 179, 284], C.A.120:10715x, (1994).
- [30] AFOLABI, O.A., OLOGUNDE, M.O., ANDERSON, W.A., READ, J.S., DACOSTA, M.D., EPPS, F.A., AYORINDE, F.O., The Use of Lipase (Acetone Powder) From *Vernonia Galamensis* In The Fatty Acid Analysis Of Seed Oils, *J.Chem. Tech. Biotechnol.*, 51, 41-46, (1991).

ÖZGEÇMİŞ

Nilgün TOKMAN 1972 yılında Afyon'da doğdu. İlköğrenimini Afyon Atatürk İlkokulu'nda, orta tahsilini Afyon Ali Çetinkaya Kız Meslek Lisesi'nde, lise tahsilini Afyon Lisesi'nde tamamladı. 1989 yılında girdiği İ.T.Ü. Kimya-Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nden 1993 yılında lisans derecesi aldı ve Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrencisidir.