

66508

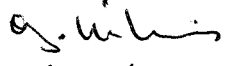
İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

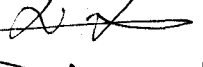
**ÇÖREKOTU (NİGELLA SATİVA L.) TOHUMLARINDAN
LİPAZ ENZİMİNİN EKSTRAKSİYONU**

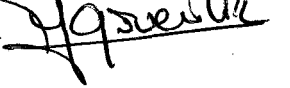
**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Müh. Selahattin KARAKAZAN**

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi : 9 Haziran 1997

Tezin Savunulduğu Tarih : 26 Haziran 1997

Tezin Danışmanı : Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN 

Diğer Jüri Üyeleri : Prof.Dr. Nuran DEVECİ 

Doç.Dr. Yüksel GÜVENİLİR 

HAZİRAN 1997

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, çörekotu (*Nigella sativa* L) tohumlarından lipaz enziminin tampon çözeltiler ile ekstraksiyonu incelenmiştir.

Çalışmalarımın her kademesinde yakın ilgi ve desteğini benden esirgemeyen Değerli Hocam, Sayın Prof.Dr.Güldem ÜSTÜN'e yardımlarından dolayı Sayın Prof.Dr.Selma TÜRKEY'a, Yük.Müh.Aylin AKOVA'ya ve tüm kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı mensuplarına teşekkür ederim.

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

Haziran, 1997

Selahattin KARAKAZAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
BÖLÜM 1. ÇALIŞMANIN AMACI	1
BÖLÜM 2. TEORİK ÇALIŞMALAR	2
2.1.Lipaz Enzimlerinin Uygulanma Alanları ve Üretimleri Hakkında Genel Bilgi	2
2.2. Bitkisel Lipaz Enzimleri Üzerinde Literatürde Yeralan Çalışmalar.....	6
2.2.1. Tahıl Lipazları Üzerinde Yapılmış Çalışmalar	6
2.2.2. Yağlı Tohum Lipazları ile Diğer Bitkisel Lipazlar Üzerinde Yürütülmüş Çalışmalar	8
2.3. Çörekotu Bitkisi ve Tohumları Hakkında Bilgi	11
2.4. Çörekotu Tohumlarının Lipaz Kaynağı Olarak Biyoteknolojik Proseslerde Biyoteknik Proseslerde Kullanılması Üzerinde Yapılmış Çalışmalar	13
BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	15
3.1. Kullanılan Ham Maddeler	15
3.1.1. Çörekotu Tohumlarının Karakterisasyonu	15
3.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	16
3.2. Çalışma Yöntemi	18
3.2.1. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu	18
3.2. Çalışma Yöntemi	18
3.2.2. Lipaz Ekstraktının Protein İçeriğinin Belirlenmesi	18
3.2.3. Lipaz Ekstraktının Hidroliz Aktivitesinin Saptanması	19
3.2.4. Çörekotu Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Çimlenmiş Tohumlardan Lipaz Enzimi Ekstraksiyon Yöntemi	20

3.2.5. Çörekotu Lipaz Enziminin Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesinde Uygulanan Prosedür	21
3.2.6. Lipaz Ekstraktlarından Lipaz Enziminin Çöktürülmesi ve Saflaştırılmasında Uygulanan Yöntemler	22
3.2.6.1. Aseton İle Çöktürme Yolu İle Lipaz Enziminin Saflaştırılması	22
3.2.6.2. Amonyum Sülfat İle Fraksiyonlama Yöntemine Göre Lipaz Enziminin Saflaştırılması	23
3.3. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Saflaştırılması	23
3.3. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu İçin Uygun Ekstraksiyon Yönteminin Seçimi	24
3.4. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonuna Çimlenmenin Etkisi.....	26
3.5. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonuna Tampon Çözelti Cinsi ve pH'nın Etkisi	28
3.6. Çörekotu Lipaz Enziminin Optimum pH ve Sıcaklığının Saptanması	33
3.7. Çörekotu Lipaz Ekstraktlarından Lipaz Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması	37
BÖLÜM 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	50

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil : 3.1. Lipaz Ekstraktlarının Protein İçeriklerinin Tampon Çözelti pH'ı ile Değişimi.....	31
Şekil : 3.2. Lipaz Ekstraktlarının Total Aktivite Değerlerinin Tampon Çözelti pH'ı ile Değişimi.....	31
Şekil : 3.3. Lipaz Ekstraktlarının Spesifik Aktivite Değerlerinin Tampon Çözelti pH'ı ile Değişimi.....	31
Şekil : 3.4. Çörekotu Lipaz Enziminin Aktivitesinin pH ile Değişimi.....	34
Şekil : 3.5. Çörekotu Lipaz Enziminin Aktivitesinin Sıcaklık ile Değişimi.....	36

TABLO LİSTESİ

Tablo : 3.1. Denizli Yöresi Çörekotu Tohumlarının	
Kimyasal Bileşimi.....	16
Tablo : 3.2. Farklı pH Değerlerinde Fosfat Tampon	
Çözeltilerinin Hazırlanma Prosedürü	17
Tablo : 3.3. Farklı pH Değerlerinde Tris-HCl Tampon	
Çözeltilerinin Hazırlanma Prosedürü.....	17
Tablo : 3.4. Yağsız Çörekotu Tohumlarından Lipaz	
Ekstraksiyonuna Ekstraksiyon Yönteminin Etkisi.....	25
Tablo : 3.5. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin.....	
Ekstraksiyonuna Çimlenmenin Etkisi.....	25
Tablo : 3.6. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin	
Ekstraksiyonuna Fosfat Tampon Çözelti pH'nın Etkisi...29	
Tablo : 3.7. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin	
Ekstraksiyonuna Tris-HCl Tampon Çözelti	
pH'nın Etkisi.....	29
Tablo : 3.8. Çörekotu Tohumlarından pH 6 Fosfat	
Tamponu ile Ekstrakte Edilmiş Lipaz	
Enziminin Aktivitesinin pH ile Değişimi.....	33
Tablo : 3.9. Çörekotu Tohumlarından pH 9 Fosfat Tamponu	
ile Ekstrakte Edilmiş Lipaz Enziminin	
Aktivitesinin pH ile Değişimi.....	35
Tablo : 3.10. Çörekotu Tohumlarından pH 6 ve pH 9	
Fosfat Tamponu ile Ekstrakte Edilmiş	
Lipaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Sıcaklıkla	
Değişimi.....	36
Tablo : 3.11. Çörekotu Tohumlarından Fosfat Tampon	
Çözeltileri ile Elde Edilmiş Ekstraktlardan	
Lipaz Enziminin Aseton ile Çöktürülecek	
Saflaştırılması.....	38

Tablo : 3.12. Çörekotu Tohumlarından Fosfat (pH6) Tampon	
Çözeltilisi ile Elde Edilmiş Ekstrakttan,.....	
Lipaz Enziminin Amonyum Sülfat ile Çök-.....	
türülerek Saflaştırılması.....	38



ÖZET

Son beş yılda lipaz enzimlerinin, deterjan ve deri sanayiinde yağların biyolojik hidrolizinde; yağ sanayiinde istenilen özelliklerde sıvı yağ ve margarin üretimi için yağların modifikasyonunda ve kimyasal yolla başarısız çok çeşitli organik sentezlerin gerçekleştirilmesinde kullanılmış olması, endüstriyel lipaz enzimlerinin karakterizasyonu ve üretimi üzerine çalışmaların hızlanmasına neden olmuştur. Literatürde, mikrobiyal ve hayvansal orijinli lipazlar üzerinde çok sayıda çalışma bulunmasına karşılık, bitkisel lipazlarla ilişkin sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır.

Bu çalışmada, çörekotu tohumlarından tampon çözeltiler ile lipaz enziminin ekstraksiyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla, orijinal ve çimlenmiş çörekotu tohumları Fosfat ve Tris-HCL tampon çözeltileri ile ekstrakte edilmiştir. Çimlenmenin, tampon çözelti pH'nın ve cinsinin ekstraksiyon verimine ve elde edilen lipaz ekstraktlarının aktivitelerine olan etkilerinin belirlenmesiyle, optimum ekstraksiyon koşulları saptanmıştır.

Çimlenmenin, lipaz enziminin ekstraksiyon verimini 1,4 kat ve aktivitesini ise 2 kat arttırdığı belirlenmiştir. Çimlenmiş tohumlarla yürütülmüş ekstraksiyon deneylerinde, tampon çözelti pH'nın ekstraksiyon verimi ve lipaz aktivitesine büyük etkisi olduğu saptanmıştır. Fosfat tampon çözeltisi için pH 6, Tris-HCl için pH 7 optimum ekstraksiyon pH'ları olarak belirlenmiştir. pH 6 fosfat tampon çözeltisi ile %21 verimle spesifik aktivitesi 0.64 U/mg protein olan lipaz enzimi elde edilirken, Tris-HCl (pH 7) tampon çözeltisi ile çalışıldığında elde edilen lipaz enziminin verimi %18 ve spesifik aktivitesi 0.74 U/mg protein olmaktadır.

Çörekotu lipaz enziminin optimum sıcaklığının 40°C olduğu; pH 6 ve pH 9'da iki optimum pH değeri gösterdiği de belirlenmiştir.

EXTRACTION OF LIPASE ENZYME FROM BLACK CUMIN NIGELLA SATIVA L) SEEDS

SUMMARY

Lipases (or acylglycerol ester hydrolases, EC 3.1.1.3) are unique enzymes and they are extensively used as additives in detergents (to hydrolize fats under alkaline conditions); in the production of enhanced flavor additives (to release short chain fatty acids from butterfat feedstocks); in the synthesis of several valuable chemical compounds which could not be produced by chemical reactions and in the manufacture of engineered fats with desired nutropharmaceutical and/or functional properties (to change the qualitative and quantitative profile of fatty acid residues).

Selectivity of certain lipases for or against particular fatty acids/acyl moieties has been utilized for the enrichment of such fatty acids or their derivatives from naturally occurring mixtures via selective hydrolysis, esterification and interesterification. For example, the polyunsaturated fatty acids, especially Eicosapentaenoic acid (20:5-EPA) and Docosahexaenoic acid (22: 6-DHA) have been reported to have beneficial effects in cardiovascular diseases, autoimmune disorders and other inflammations, such as arthritis, asthma. The main source of these fatty acids is marine oils and due to complex nature of fish oils, EPA and DHA could not be separated from fish oils by conventional separation methods. The ability of the some lipases to discriminate against EPA and DHA has been utilized in the production of concentrates enriched in EPA and DHA.

The different physiological and pharmaceutical activities for both enantiomers of one molecule are well known in medical chemistry. As examples, S-phenylalanin is bitter but the R-isomer is sweet; R-talidomide is a good sedative drug but S-isomer is teratogenic; S-verapamil is a strong controller of certain kinds of cardiac arrhythmia and the R-verapamil is a potent antitumoral agent. This different or opposite activity of both enantiomers is a real problem because there are more than 500 drugs currently marketed as racemic mixture with negligible information available on the properties of the individual stereoisomers. Due to the enantioselectivity of certain lipases to the one of the isomer, lipases have succesfully used in the synthesis of chiral drugs over the last ten years.

Lipases can be obtained from mammals, yeasts, bacterias and higher plants. To date, most of the industrial lipase enzymes have been produced from fungal resources and they are well characterized. However, lipases from higher plants have not yet been investigated in this regard and they may display properties different to those from fungal resources and they could be exploited for industrial or technical purposes.

Cereal grains and oilseeds are cheap and alternative sources of lipases. Seeds generally contain proteins and depending on the plant species, mainly starch or triacylglycerols as food reserve for germination. In the mobilization of these three major reserves during germination, they are hydrolyzed initially by specific proteases, amylases and lipases, respectively. Most investigations on plant lipases have been carried out on oleaginous seeds in which lipase activity is generally found to become prominent upon germination. Oilseed including, sunflower, cotton, corn, rape, mustard contained only alkaline lipase activity, which increased drastically during germination. Castor bean contains acid lipase in dormant seeds. In addition to the acid lipase, alkali lipase was found in germinating castor bean endosperm. The pattern of acid and alkaline lipases in castor bean did not seem to be common in other oil seeds.

Lipase from germinating seedlings of oilseed rape has been used as biocatalyst for esterification and interesterification of lipids.

In recent studies conducted at chemical Technologies in chemical engineering department, *Nigella Sativa* (Black cumin) seeds have been shown as a good source of lipase enzyme which can be an effective biocatalyst in hydrolysis and esterification reactions of triglycerides.

Nigella sativa L., also known as black cumin or fennel flower, is a member of the Ranunculaceae family and native to some parts of the mediterranean region. It is cultivated in India and Turkey, the major plantation areas being Afyon, Burdur and Isparta. Presently, the seeds are sold at local and export markets for use as condiment or native medicine; furthermore, about 5 tonnes per year of seed oil is being exported in recent years for similar purposes.

In this study, the extraction and the characterization of lipase enzyme from *Nigella Sativa* seeds were investigated. The extraction was performed by phosphate and Tris-HCl buffer solutions of different pH values. The effects of pH and the types of the buffer solutions on the yield and the activity of the lipase extracts were examined.

Samples of Denizli origin *Nigella sativa* seeds were purchased from a local market in Istanbul. Moisture content was determined by oven-drying at 105°C. Total nitrogen content was determined using the standard Kjeldahl method. Crude protein was expressed as 6.25xN. Crude fiber was determined according to the standard ADCS method, by calculating the loss in weight of dried residue remaining after digestion of a fat-free sample with 0.25 M H₂SO₄ and 0.6 M NaOH under specified conditions. Ash content was determined by incineration of the sample in a muffle furnace at 600°C for 16 h. Total fat content was obtained by the soxhlet extraction

method using hexane as described by ADCS method. Carbohydrate content was obtained by subtracting the sum of protein, fat, ash and moisture from 100.

The proximate composition of *Nigella sativa* seeds indicated that seeds were composed of 23.3% protein, 35.4% oil, 9.4% moisture, 4.0% ash, 6.7% crude fiber and the rest being composed of other carbohydrates. The crude fiber content of 6.7% in black cumin seeds makes it a source of dietary fiber which would be helpful in reducing gastrointestinal disorders.

The lipase extracts were obtained as follows: 60 g seeds were homogenized for 20 min using a blender with 300 ml buffer solution at 4°C. The homogenate was filtered through nylon cloth. The homogenate was then centrifuged for 30 min at 10,000 g, yielding supernatant liquid and crude particulate fraction. The supernatant liquid is called as "lipase extract" throughout this text. The protein content of lipase extract was determined spectrophotometrically according to the biuret method using a Randox Total Protein Reagent. Bovine serum albumin was used for establishing the standard curve. Lipase activity of extract was determined by the titrimetric method using olive oil emulsion. For preparation of the substrate, 5 g olive oil, 5 g gum arabic and 95 mL 0.89% (W/V) NaCl solution were emulsified with a blender at room temperature for two times 5 minutes. Emulsions were always prepared immediately before use. The assay mixture for lipase activity contained 5 mL substrate emulsion, 0.5 mL 0.1 M CaCl₂ solution, 1 mL lipase extract (containing 5-10 mg of protein) and 0.89% NaCl solution, made up to a final volume of 10 mL. The mixture was incubated at 37°C in a shaker for a period of 10 min. The reaction was stopped by adding 20 mL of ethanol/acetone (1:1,V/V) mixture. The fatty acids liberated were measured by titration with 0.05 N KOH using a thymolphthalein as an indicator. Corrections were made for endogenous fatty acid production (assay mixture without substrate emulsion) and nonenzymatic fatty acid production (assay mixture without enzyme preparation). The lipase activity was expressed as μ mol fatty acids released per mg protein in minute.

To investigate the effect of germination on the protein content and specific activity of the lipase extract, set of experiments was conducted with germinating seeds. *Nigella sativa* seeds were soaked in water for 24 hr at 26°C. The end of this imbibition period was designated day zero of germination. Germination was carried out in moist papers at 26°C in darkness for seven days. The seed samples, taken during the germination, were extracted with water and analyzed for protein and lipase activity assays. The results indicated that the maximum lipase activity in lipase extract was reached at day 4 of seedling growth. Therefore, the subsequent experiments were conducted with 4 days germinated seeds.

To see the effects of pH and the types of buffer on the protein content and activity of the lipase extracts, two sets of extraction studies were conducted with phosphate and Tris-HCl buffer solutions. The pH of the solutions was changed from 5 to 10 and from 6 to 9 for phosphate and Tris-HCl buffer solutions, respectively. It was observed that the solubility of the seed proteins was minimum at pH 7 for both buffer solutions. With decreasing or increasing the pH, the protein content of the

lipase extract increased. The lipase extract obtained by pH 6 phosphate buffer displayed maximum lipase activity whereas the highest activity was observed in the lipase extract obtained by pH 7 Tris-HCl.

Tris-HCl solutions dissolved relatively less amount of protein from seeds than those of phosphate solutions, but the lipase extracts obtained by Tris-HCl buffer solutions exhibited higher specific activity than those of corresponding solutions obtained by phosphate solutions. This fact may be explained by the selective dissolving of lipase containing proteins in Tris-HCl buffer solutions. The optimal extraction pH was established as 6 and 7 for phosphate and Tris-HCl buffers, respectively. In conclusion, we can say that phosphate and Tris-HCl buffers are suitable buffers for extraction of lipase enzyme from *Nigella sativa* seeds.

Studying by pH 6 phosphate and pH 7 Tris-HCl buffer solutions, enzyme proteins could be extracted from seeds in a yield of 21 and 18 % based on protein content of seeds, respectively. The corresponding extracts had lipase activities of 0.64 and 0.74 U/mg protein, respectively.

The lipase extract in pH 6 phosphate buffer was further purified separately by acetone and ammonium sulphate precipitation methods.

Pure acetone was added dropwise to 100 ml lipase extract, containing 1177 mg proteins with a specific activity of 0.64 U/mg protein, until the crystals were seen. Then the mixture was held -15°C for 30 min. The precipitate thus obtained was separated by centrifugation at 10,000 rpm for 15 min and redissolved in phosphate buffer (pH 6) solution. The resulting lipase solution contained 727 mg proteins, and its specific activity was found to be 1.85 U/mg protein. This treatment increased the lipase activity about 3-fold.

The another 200 ml sample of the same lipase extract was also concentrated by adding ammonium sulphate to a definite concentration (0-30 %, 30-60 %, and 60-80 %) and incubated at 4°C for 30 min. The precipitates thus obtained were separated by centrifugation at 10,000 rpm for 15 min. These precipitates were then divided into two equal parts. One part was dissolved in Tris-HCl (pH 6) and the other was dissolved phosphate (pH 6) buffer solutions. The results indicated that the ammonium sulphate fractionation method gave the best results. The protein fraction precipitated at 60-80 % ammonium sulphate saturation, exhibited 10.71 U/mg protein of activity, in Tris-HCl solution.

Finally, the optimum pH and temperature of the *Nigella sativa* lipase were determined. The titrimetric method was also used for the determination of the pH optimum of lipase activity. The test mixture contained in a final volume of 10 mL:

5 mL olive oil emulsion, 0.5 mL 0.1 M CaCl_2 solution, 0.8 mL enzyme extract and 3.7 mL buffer, adjusted to different pH values varying from 4 to 10. For the determination of optimum temperature, samples of lipase extract were incubated at 30, 35, 40, 45, 50 and 55°C separately for 30 min in previously determined optimum pH. Then, the lipase assays of these samples were determined by the same method explained above. Two lipases were found in extracts from *Nigella sativa* seeds, like castor beans. Acid lipase had optimal activity at pH 6. Alkaline lipase displayed high activity at pH 9. The results also showed that the activity of the acid lipase was about three times that of alkaline lipase. The optimum temperature of *Nigella sativa* lipase enzyme was found to be 40°C.

As conclusion, phosphate and Tris-HCl buffer solutions can be used for extraction of lipase enzyme from *Nigella sativa* seeds.

BÖLÜM 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Lipaz enzimlerinin endüstriyel olarak, deterjan ve deri sanayiinde yağların biyolojik hidrolizinde; kağıt sanayiinde zift probleminin giderilmesinde; yağ sanayiinde istenilen özelliklerde sıvı yağ ve margarin üretimi için yağların modifikasyonunda ve kimyasal yolla üretilen çok çeşitli organik maddelerin sentezinde kullanılır olması, lipaz enzimlerinin üretimi ve karakterizasyonu üzerine çalışmaların hızlanmasına neden olmuştur.

Literatürde, mikroorganizma ve hayvansal orijinli lipazlar üzerinde çok sayıda çalışma bulunmasına karşılık, bitkisel lipazlara ilişkin sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Endüstriyel lipazların büyük bir yüzdesi mikroorganizmalardan üretilmektedir. Halbuki bitkisel lipaz kaynakları daha ucuzdur ve bu kaynaklardan lipaz eldesi ileri genetik teknikler gerektirmemektedir.

Bu nedenle, bu çalışmada potansiyel bir lipaz kaynağı olan çörekotu tohumlarından lipaz enziminin eldesi ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Çörekotu tohumlarından lipaz enzimi, pH 5-10 aralığında tampon çözeltiler kullanılarak ekstrakte edilmiş ve ekstraksiyon verimi ile ekstraktın lipaz aktivitesine, pH'ın ve tampon çözelti cinsinin etkisi incelenmiştir. Ekstraksiyon deneyleri orijinal ve çimlenmiş tohumlarla ayrı ayrı yürütülmüş ve çimlenmenin ekstraksiyona olan etkisinde araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre saptanan optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen lipaz enziminin saflaştırılması ve enzim karakteristiklerinin saptanması yapılmıştır.

BÖLÜM 2. TEORİK ÇALIŞMALAR

2.1.Lipaz Enzimlerinin Uygulanma Alanları ve Üretimleri Hakkında

Genel Bilgi

Lipazlar (Triaçilgliserol açilhidrolazlar, EC 3.1.1.3), birbirlerine peptid bağları ile bağlanmış amino asitlerini içeren çok büyük, kompleks protein molekülleridir. 20 ana amino asitten oluşurlar. Polipeptid zincirindeki amino asitlerinin sayısı 100 ila birkaç bin arasında değişir [1]. Doğal olarak, lipaz enzimleri yaşayan her organizmada bulunur. Esas fonksiyonları, hücrelerde bulunan depo yağlarını gliserin ve yağ asitlerine parçalamaktır. Açığa çıkardıkları yağ asitleri daha sonra canlıların biyolojik çevrimlerinde önemli rol oynayan Asetil-CoA'nın sentezlenmesinde kullanılır [2].

Lipaz enzimleri, canlı organizma dışında, sulu ortamda yağların hidrolizinde başarılı olduğu kadar [3-5], anhidrik koşullarda mono, di ve trigliseridlerin oluşumunu[6,7]. ve yağların esterleşme ve ester değiştirme reaksiyonlarını (8-10) etkin bir şekilde katalizlerler. Yağların bu enzimatik reaksiyonlarla kolaylıkla modifiye edilebilmesi, özellikle margarin sanayiinde yağ formülasyonlarının çeşitlenmesine imkan sağlamıştır [11, 14].

Alkali koşullarda [15], mikroemülsiyon ve solvent ortamında da lipaz reaksiyonlarının yüksek verimle gerçekleştirilebilmesi, yüksek ergime noktalı yağların endüstriyel ürünlere dönüşümünü [15-18] ve çok sayıda normal kimyasal proseslerle eldesi yapılamıyan kıymetli kimyasal maddelerin sentezlenmesi imkanını ortaya çıkarmıştır [19].

Endüstriyel lipaz enzimleri, yağ ve margarin sanayii dışında, deterjan sanayiinde yağların alkali koşullarda hidrolizinde; deri sanayiinde derilerden yağ giderilmesinde

ve kağıt sanayiinde önemli problemlerden biri olan "zift oluşumunu" önleyici olarak efektif bir şekilde kullanılmaktadır [15].

Lipaz enzimlerinin en önemli özelliklerinden biri de reaksiyonlarda spesifiklik göstermeleridir. Substrat ve yağ asitleri spesifikliği [20-23]; pozisyon spesifikliği [24, 25] ile stereo ve enantiospesifiklikleri [26-28] lipaz enzimlerinin reaksiyon kabiliyetini, dolayısıyla önemini arttırmaktadır.

Balık yağlarında bulunan polidoymamış yağ asitlerinden eikosapentaenoik asit (20:5-EPA) ve dokosaheksaenoik asit (22:6-DHA)'ın, kalp hastalıklarını ve bağışıklık sistemi bozukluklarını önleyici ve tedavi edici etkilerinin saptanması, son 10 yılda balık yağlarından EPA ve DHA'nın izolesi ve konsantre edilmesi üzerindeki çalışmaları hızlandırmıştır [29]. Bu polidoymamış yağ asitlerinin balık yağlarından kazanılması, kimyasal yöntemlerle mümkün olamamaktadır. Bazı lipaz enzimlerinin (*Candida rugosa*, *Mucor Michei*) EPA ve DHA'ye negatif spesifiklik göstermesi, bu asitlerin balık yağlarından izole edilmesinde olumlu sonuçlar alınmasını sağlamıştır [30-33].

EPA ve DHA asitlerine benzer şekilde beslenme ve medikal özelliklerinden dolayı linoleik asitin [34], eşekotu (*Evening primrose*), boraj (*Borago officinalis*) ve *mortierella* cinsi mikroorganizmalardan eldesinde de lipaz enzimlerinin linoleik aside negatif spesifiklik göstermesi kullanılan yöntemlerin esasını teşkil etmektedir [35-36].

Lipaz enzimlerinin enantiospesifikliği, en az yağ asitleri spesifikliği kadar önemli olup, özellikle ilaç sanayiinde son yıllarda büyük gelişmelere olanak sağlamıştır [37]. Enantiospesifiklik, lipaz enziminin rasemik karışımlarda, karışımda bulunan molekül formülleri birbirine eşit, fakat atomların üç boyutlu yerleşimi birbirlerinin ayna aksi olan izomerlerden birine ilgi göstermesi ve onunla reaksiyona girebilmesidir. İlaç sanayiinde, günümüzde 500'den fazla ilaç formülünde, rasemik karışımlar kullanılmaktadır. Enantioizomerlerinin farmasötik aktiviteleri ve yan etkileri birbirlerinden farklı olup, kullanılan tüm rasem karışımları için bu özellikler

tam olarak saptanmış değildir. Örneğin, S-fenilalanin acı iken R-izomeri tatlıdır; S-anfetamin kilo verdirici ve uyarıcı etki gösterirken, R-izomeri inaktiftir; S-verapamil kalp atışları düzenleyicisi olarak etkili iken R-izomerinin tümör oluşumunu önleyici vazife görmektedir. En çarpıcı örnek ise talidomid'dir. R-talidomid sakinleştirici aktivitesine sahiptir. S-talidomid izomerinin ise embriya oluşumunda bozucu etkileri olduğu, sakat doğan çocuklardan sonra farkedilmiştir [37]. 1992-2000 yılları arasında bu karışımlardan etkin izomerlerin ayrılması veya sadece o izomerin sentezlenmesi Amerika Birleşik Devletlerinde kanunlaşmıştır. Enantioizomerlerin ayrılması veya sentezlenmesinde lipaz enzimlerinin kullanılabilmesi, lipazların enantiospesifik olarak üretilmesi yolundaki çalışmaların hızlanmasına yol açmıştır [37].

Lipaz enzimlerinin üretiminde hayvansal dokular, mikroorganizmalar ve bitkisel kaynak olarak tahıl taneleri ve yağlı tohumlar kullanılabilir. Hemen hemen tüm endüstriyel lipaz enzimleri toprakta bulunan mikroorganizmalardan üretilmektedir [15]. Bu mikroorganizmalar bakteriler, küfler, mayalar olabilir. Sadece bir mikroorganizmadan, üretim yöntemleri değiştirilerek 1000'den fazla enzim elde edilebilir. Enzim üretiminde ilk aşama belli bir enzim tipini üretebilecek en uygun mikroorganizmayı seçmektir. Mikroorganizma soyu (strain) bulunduğunda, fermentasyon tekniği ile kültüre edilir. Kültür ortamı, mikroorganizmaların gereksindiği ana besin maddelerini ve istenen enzimin sentezi için gerekli indükleyici maddeleri içerir. Fermentasyon esnasında, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak sadece istenilen enzimin sentezlenmesini sağlayacak mutant seri aranılır ve bulunur. İstenilen mutant seride hücrelerin büyümesi sağlanır. Lipaz enzimleri genellikle hücrelerden kültür ortamına geçebilen ekstraselüler enzimler olduğundan, fermentasyon bittiğinde, ekstraselüler enzimler hücrelerden filtrasyon veya santrifüjlemeyle ayrılabilirler [38].

Hayvan dokularından lipaz enziminin üretilmesinde, doku, bozunumu en aza indirmek amacıyla ölümden mümkün olduğunca hemen sonra alınır ve soğukta saklanır. Kesinlikle enzim olmayan maddeler (örneğin, yağ dokuları, bağ dokuları..)

çıkarılır. Geriye kalan dokunun, enzimin bulunduğu yere bağlı olarak, izotonik ortamda homojenizasyon, vakum içinde dondurma ve eritme, sonikasyon veya diğer kurutma teknikleri ile bütün plazma ve intraselüler membranları parçalanır. Parçalanmış hücrelerden enzim, su/tuz çözeltisi/solvent ile ekstrakte edilir [38].

Bitkisel kaynaklardan lipaz enziminin eldesi, temel maddenin türüne göre önemli ölçüde değişir. Tahıl unundan enzim, unu sulu ortamda karıştırarak; içi yumuşak olan organlardan (örn. patates), küçük kıyılmış parçaların direkt tülbentten süzülmesiyle; yapraklardan ve diğer bitki dokularından blender (döner parçalayıcı) kullanılarak doğrudan ortam içerisinde homojenizasyonu veya fibröz kökler gibi daha sert dokular, havanda kum ya da cam tozu ile dövülmesini takiben blenderda homojenize edilmesiyle elde edilebilir. Genellikle enzim ekstraksiyonunda su kullanılırsa da, enzimin plazma ve hücre içi membranlara veya lipidlere bağlı olması durumunda, ekstraksiyon ortamı olarak tuzlu çözelti, deterjan ilave edilmiş su veya solventte kullanılmaktadır. Ekstraksiyonda seçilen yöntem, yalnızca parçalanmış hücrenin tipine ve enzimin hücre içerisindeki yerine değil, aynı zamanda bu enzimin özelliklerine de bağlıdır [38]. Her durumda, hücre artıkları santrifüjleme ile ayrılırken, ekstrakte edilen enzimin çözelti içinde kalmasını sağlamak amacıyla ortamın pH ve organik çözücü derişimi özenle seçilmelidir.

Mikroorganizmalardan, hayvansal dokular veya bitkisel kaynaklardan elde edilen lipaz ekstraktları daha sonra, ekstraksiyon sıvısına geçen mono ve oligosakkaridlerden, nükleotidlerden, serbest amino asitlerden vb. çözeltide kalan diğer maddelerden çöktürülerek kurtarılır. Proteinlerin çöktürülmesi, ortamın pH'ı ve ortamdaki organik ve tuz konsantrasyonlarını değiştirilerek sağlanır [39-40]. Örneğin, pH enzimin izoelektrik noktasına ayarlanabilir (izoelektrik çöktürme); solvent ilavesi ile ortamın dielektrik sabiti değiştirilerek çöktürme (aseton ile çöktürme) yaptırılabilir veya yüksek bir tuz konsantrasyonunda proteinlerin sudaki çözünürlüğü azaltılarak çökmesi (amonyum sülfatla fraksiyonlama) sağlanabilir.

Lipaz enzimleri, çöktürme yoluyla ön saflaştırma işleminin sonrasında, istenildiğinde ileri derecede saflaştırılabilir. İleri saflaştırma yöntemleri olarak, elektroforez, iyon

değişim kromatografisi, jel filtrasyonu ve afinite kromatografisi yöntemlerinin biri veya birkaçı kullanılabilir. Genellikle enzimlerin tam bir karakterizasyonu istendiği koşullarda bu işlemler uygulanır. Bizim çalışma amacımızın dışında olduğu için, burada bu yöntemler hakkında açıklayıcı bilgi verilmemiştir.

2.2. Bitkisel Lipaz Enzimleri Üzerinde Literatürde Yeralan Çalışmalar

Literatürde bitkisel lipazlar üzerinde yapılmış çalışmalar iki alt bölümde toplanmıştır.

1.Bölümde tahıl lipazları, 2.Bölümde yağlı tohum ve diğer bitki tohumları lipazları ile yürütülmüş çalışmalar hakkında bilgi verilmiştir:

2.2.1. Tahıl Lipazları Üzerinde Yapılmış Çalışmalar

Tahıl tanelerinde genel olarak %10 civarında proteinin %60-80 oranında nişasta ile birlikte bulunması enzim ekstraksiyonunda sorun yarattığından tahıl lipazları üzerine yapılmış sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır.

Buğday lipazının izolasyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili ilk çalışma 1948 yılında Singer ve Hofstee [41] tarafından yayınlanmıştır.

Dratron ve arkadaşları [42] ile Tavener ve Laidman [43], çimlenmemiş buğday tohumlarında lipaz aktivitesinin çok düşük olduğunu, çimlenme esnasında aktivite artışı gözlemlendiğini, pH 7-9 arasında aktivitenin Ca^{++} iyonları etkisiyle maksimuma çıktığını saptamışlardır. Araştırmacılar, buğday lipazının 1,3-Spesifik özellik gösterdiğini de beyan etmişlerdir.

Literatürde, arpa, çavdar ve darı lipazları üzerinde yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır. Yulaf, tahıllar arasında en yüksek protein içeriklisidir ve diğerlerine kıyasen enzimlerce de zengindir [44]. Enzim zenginliğini, lipaz enzimi üzerine yapılmış çalışmalardan da görmekteyiz. Yulaf lipazı, ilk kez Martin ve Peers [45] tarafından incelenmiştir. Araştırmacılar lipaz enziminin, optimum pH'nın 7,4 olduğunu ve doymamış yağ asitlerine spesifikliğini bulduğunu ortaya çıkarmıştır.

Lipaz enziminin yulaf çekirdeğinde homojen dağılmadığı, daha çok kariyopsise yakın bölümde ve aleron tabakasında zenginleşmiş bulunduğu [46, 47] ve aktivitesinin çimlenme sürecinde önemli miktarda arttığı yapılan çalışmalarla tarafından saptanmıştır [48, 49].

Yulaf lipazı üzerindeki çalışmaların bir kısmı gıda amaçlı yulaf ürünlerinin kullanımında, lipaz enziminin sebep olduğu açılışmanın (ransidite) önlenmesi ile alakalıdır [50, 51].

Yulaf tohumlarının enzim kaynağı olarak, yağların hidrolizinde ve esterleştirilmesinde kullanımı ile ilgili iki çalışmaya rastlanmıştır. Lee ve Hammond [52] nemlendirilmiş yulaf kariyopsislerinin yağların hidroliz ve interesterifikasyon reaksiyonlarında etkin katalizör görevi gördüğünü ortaya çıkarmışlardır. Piazza ve Farrell [53] ise, öğütülmüş yulaf tohumları ile solventli ortamda hint yağından %90 verimle risinoleik asit elde etmeye muvaffak olmuşlardır.

Mısır tohumları, lipaz açısından incelendiğinde, diğer tahıllar gibi normal koşullarda inaktif, çimlenme sürecinde aktivite kazanmaktadır [54]. Çimlenmiş tohumlardan ekstrakte edilen lipazın optimum pH aktivitesi 7,5 olarak belirlenmiş iken, kök sürgünlerinde asit ve alkali lipaz enzimlerinin bulunduğu Aman ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir [55]. Araştırmacılara göre, asit lipazın optimum pH'ı 6, alkali lipazın optimum pH'ı ise 8,6'dır. Aktivite açısından asit lipazın alkali lipaz aktivitesinin yarısı kadar aktivite gösterdiği de saptanmıştır.

Tahıllar arasında en sistematik lipaz incelenmesi pirinç kepeği üzerinde yürütülmüştür. Japonya Kyushu Üniversitesi, Ziraat Fakültesinde bir grup araştırmacı, pirinç kepeğinden 0,01 M CaCl_2 (pH6) çözeltisi ile lipaz enzimini ekstrakte ettikten sonra, amonyum sülfat saflaştırmasını takiben DEAE-Selüloz, Sephadex-G-75 ve CM-Sephadex C-50 kolonlarından geçirerek saflaştırmışlardır. 1kg yağsız pirinç kepeğinden %3,6 verimle, spesifik aktivitesi 4,7 U/mg protein olan lipaz enzimi elde

etmişlerdir [56]. Lipaz enziminin molekül ağırlığı 40.000 ve 33.000 olan iki lipaz enzimi karışımı olduğunu saptadıktan sonra, araştırmacılar her iki lipaz enziminin optimum pH'ının 7,5-8 arasında olduğunu ve lipazların kısa zincirli yağ asitlerine spesifiklik gösterdiğini saptamışlardır [57-59].

2.2.2. Yağlı Tohum Lipazları ile Diğer Bitkisel Lipazlar Üzerinde Yürütülmüş Çalışmalar

Doğal olarak kuru bitkisel tohumlarda lipaz aktivitesi gözlenmediği halde, hint tohumlarının aktif lipaz enzimi içerdiği, çimlenme esnasında lipaz aktivitesinde beklenilenin aksine aktivite kaybının olduğu Ory ve arkadaşlarının çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır [60]. Ory ve araştırma grubu tarafından ayrıca tohumlarda asidik karakterde bulunan lipaz enziminin optimum pH'ının 4.1 olduğu; yağların hidrolizinde 1,3-Spesifik enzim davranışı gösterdiği ve özellikle kısa zincir uzunluğundaki yağ asitlerine seçici davranışta bulunduğu da belirlenmiştir [61, 63].

Muto ve Beevers [64] çimlenmiş hint tohumlarının endosperminde asit lipaz yanında alkali lipaz enziminde bulunduğunu saptamışlardır. Asit lipazın optimum pH'ı 5.0, alkali lipazın ise 9'da olup, çimlenmenin 2.gününde asit lipaz maksimum aktiviteye erişirken, alkali lipaz ise 3.ila 5.gün arasında yüksek aktivite kazanmaktadır. Araştırmacılar, asit lipaz aktivitesinin alkali lipaz aktivitesinin 2 katı kadar olduğunu ve alkali lipazın sadece monogliseridler hidroliz etme kabiliyetinde olduğunu da ortaya çıkarmışlardır.

Marriott ve Northcote [65], çimlenmemiş hint tohumlarında da alkali lipaz bulunduğunu; Anan'eva ve Rudyuk [66] ise, hint tohumlarından pH 11'de 0.025 NH₄OH ile lipaz ekstraktının elde edilmesi durumunda hint tohumu lipazının pH 3.8 ; pH 5.4 ve pH 8.2'de üç optimum gösterdiğini beyan etmişlerdir.

Hint tohumlarının lipaz kaynağı olarak, 50°C'nin altında ve pH 4'de yağların hidrolizinde kullanımında, 24 saatlik sürede %97,3 hidroliz verimi elde edilebilmektedir [67, 68].

İTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalında, son 8 yılda, Türkiye kökenli hint tohumlarının biyokatalizör olarak kullanımı ile yürütülmüş çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Adana yöresinden temin edilmiş hint tohumlarından pH 4 sodyum hidrojen fosfat-sitrik asit tampon çözeltisi ile ekstrakte edilen lipaz enzimi zeytinyağı, ayçiçek yağı, keten yağı ve tung yağının hidrolizinde kullanılmıştır. Hidroliz reaksiyonlarında, tung yağının dışında, hidroliz dereceleri %90 olarak saptanmıştır [69]. Bu reaksiyonların hidroliz kinetikleri de incelenmiştir [70].

Hint tohumu lipaz enziminin adsorpsiyon ile Celite üzerine immobilizasyonu çalışmalarında, hazırlanan immobilize hint lipazı örneklerinin tekrarlı olarak kullanımında aktivite kaybı olmadığı ve solvent ortamında da zeytinyağının hidrolizinde kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır [71].

Hint tohumu lipaz enzimi, yağların esterleşme reaksiyonunda da etkin aktivite göstermiştir. Oleik asitin butanol ile esterleştirilmesinde, pH 5 tampon çözelti ile ön işlem görmüş hint tohumu pres artıklarının katalizörlüğünde, 3 saat içinde %45 verimle ester elde edilmiştir [72]. Benzer şekilde, ön işlem görmüş hint tohumu pres artıklarının gliserin ile oleik asit arasındaki esterleşme reaksiyonunda da önemli bir katalitik aktivite gösterdiği saptanmıştır [73, 74].

Huang ve Moreau [75]'nin fındık (*Arachis hypogaea*), ayçiçeği (*Helianthus annuus*), salatalık (*Cucumis sativus*), pamuk (*Gossypium hirsutum*), mısır (*Zea mays*) ve domates (*Lycopersicon esculentum*) tohumları ile yürüttükleri çalışmalarda, incelenen her tohumun çimlenme esnasında alkali lipaz aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir.

Vernonica anthelmintica [76] tohumlarından ekstrakte edilmiş lipaz enziminin, diğer tohumlara benzer şekilde, alkali lipaz aktivitesine sahip olduğu ve optimum pH'ının 7.5-8 arasında bulunduğu ve hidroliz reaksiyonlarında substrat ve pozisyon spesifikliği göstermediği de tespit edilmiştir.

Tohumlardan ekstrakte edilen lipaz ekstraktlarının lipaz aktiviteleri, ekstraksiyon koşullarına göre değişim gösterebilir. Örneğin, sadece alkali lipaz aktivitesi olduğu söylenen ayçiçeği tohumlarından [75], fosfat-sitrat tampon çözeltisi ile pH 8'de ekstraksiyonun yapılması ile, ekstraktta asit lipaz aktivitesi de (pH 4 optimum) bulunabilmektedir [66].

Cruciferae ailesinden rapiska ve hardal lipazları üzerinde literatürde yeralan çalışmalarda, çimlenmiş rapiska ve hardal tohumlarında pH 8.5-9 da maksimum aktivite gösteren alkali lipazlar bulunduğu saptanmıştır [77, 79]. Mukherjee ve araştırma grubu, çalışmalarını rapiska lipazının spesifikliği ve biyoteknolojik uygulamaları üzerinde sürdürmektedir. Araştırmacılar, rapiska lipazının 1,3-pozisyon spesifikliğine sahip olduğunu [80] ve genel olarak cis-4 ve cis-6 doymamış yağ asitlerine negatif spesifiklik gösterdiğini [81] belirlemişlerdir. Bu özelliğinden faydalanarak, rapiska lipazı ile eşekotu (evening primrose oil) yağından γ -linolenik asidin konsantre olarak eldesinde başarılı olmuşlardır [81]. Aynı grup, rapiska lipazının immobilize veya aseton tozu formunda, esterleşme ve interesterleşme reaksiyonlarında da yüksek katalizleme etkisinin bulunduğunu saptamışlardır [82, 83].

Literatürde, *Nigella damascena*, *Urtica dioica* ve *Chelidonium majus* tohumlarının da lipaz aktivitesi görüldüğü gösterdiği kaydına rastlanmıştır [84].

2.3. Çörekotu Bitkisi ve Tohumları Hakkında Bilgi

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 ziraatı da yapılmaktadır. Tohumlarının ve yağının antibakteriyel ve terapik etkilerinden dolayı, idrar söktürücü, gaz giderici olarak kullanımı yaygındır. Yakın doğu ve Hindistan'da baharat olarak da tüketilmektedir [85].

Çörekotu, Haziran-Temmuz ayları arasında yeşil-açık mavi renkli çiçekler açan, 20-40 cm. boyunda bir yıllık otsu bir bitkidir. Gövdesi dik ve kısa tüylüdür. Yaprakları gövdeye alttakiler saplı, üsttekiler ise sapsız olarak alternant düzende bağlanmışlardır. Yaprakları çok parçalıdır ve herparça 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. Dizi organ 5 karpelden yapılmıştır. Ovarium üste ve karpellerin hemen hemen uca kadar birleşmesinden ötürü 5 gözlü gözükür. Stilus 5 tane ve uzunca gaga görünümündedir. Meyva, içi tohum dolu şişkin bir kapsül şeklindedir. Tohumlar siyah renkli, oval şekilli ve 3 yüzlüdür. Kumlu toprakları seven bitkinin tohum hasatı Ekim ayında yapılır, dekar başına tohum verimi 170-240 kg'dır. Türkiye'de *Nigella sativa* L, *Nigella damascena* L ve *Nigella arvensis* L türleri bulunur ve ençok Afyon, Burdur ve Isparta yöresinde yetişir [85].

Çörekotu tohumlarının kimyasal bileşiminde, yüksek oranda yağ ve protein bulunmaktadır. İzmir yöresine ait çörekotu tohumlarının %32 yağ, %20.2 protein, %6.6 elyaf, %4.0 kül ve %37.4 karbonhidrattan ibaret olduğu Nergiz ve ötleş tarafından belirlenmiştir [86]. Tohumların külünde yüksek miktarda potasyum ve kalsiyum bulunduğu da saptanmıştır.

Çörekotu tohumu proteinlerinin yapısında, 15 amino asit (alanin, valin, glisin, izolösin, lösin, pirolin, treonin, serin, aspartik asit, metionin, fenilalanin, glutamik asit, tirosin, lisin ve arginin) bulunduğu saptanmıştır [87]. Tohum proteinlerin arginin, lisince diğer yağlı tohumlara kıyasen çok zengin olması çok önemli bir bulgudur. Tohumların potansiyel protein kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermektedir [88].

Türkiye kökenli çörekotu tohumlarının B₁, B₆ ve niasin vitaminince zengin olduğu da bilinmektedir [86].

Çörekotu tohumları, %0.5-1.5 arasında uçucu yağlar içermektedir ve bu yağ p-cymena, d-limonen, karvon, d-sitronellol ve sitronel asetat'ca zengindir. Çörekotu uçucu yağlarında nigellon, timokinon ve timolhidrokinon bileşikleri de bulunmakta olup, bu bileşiklerin antibakteriyel özelliğinin yanında, artrit, astım ve kalp rahatsızlıklarına tedavi edici etkisi olduğu klinik olarak saptanmıştır [85].

Çörekotu tohumlarında %30-40 oranında yağ bulunmaktadır. Çörekotu yağı oleik-linoleik grubu yağ olup, oleik ve linoleik asit miktarı toplam yağın %80'ini teşkil etmektedir. Konya, Denizli ve Kütahya yöresi çörekotu yağlarında, %20-22 olcik, %60-63 linoleik, %12-13 palmitik ve %1'den az linolenik asit bulunduğu tespit edilmiştir [89]. Oleik-linoleik sınıfı yağ olması nedeniyle, çörekotu yağının kıymetli yağ kimyasallarının (yağ asitleri metil esterleri, yağ alkoller, alkanolamidleri, sakkaroz ve diğer esterlerin) üretiminde kullanılacağı gibi, yarı-kuruyan yağ olma sıfatı ile de yüzey kaplama sanayiinde kullanılması söz konusudur. Çörekotu yağı potansiyel yağ kaynağı olarak da düşünülmelidir.

Çörekotu yağı %1-5 arasında sabunlaşmayan madde içermektedir. Esas olarak β -sitosterol (%70), campesterol ve stigmasterol'den ibaret olan bu fraksiyon, sentetik hormonların üretimine de uygundur [85].

Çörekotu yağının antioksidan madde içeriğinde yüksektir. Yağın gramı başına yaklaşık 1800 μg polifenoller ve 350 μg tokoferol bulunmakta olup, tohumlardan metanol ile ekstrakte edilen antioksidan ekstraktının soya ve ayçiçek yağına sentetik antioksidan BTH'den daha fazla oksidatif stabilite sağladığı saptanmıştır [90]. Antioksidan özelliğinden dolayı, çörekotu tohumları bu alanda da önemli bir hammaddedir.

2.4. Çörekotu Tohumlarının Lipaz Kaynağı Olarak Biyoteknolojik Proseslerde Kullanılması Üzerinde Yapılmış Çalışmalar

Çörekotu tohumlarının yüksek lipaz aktivitesine sahip olduğu ve biyokatalizör olarak yağ reaksiyonlarında kullanılabilirliği İTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalında yürütülmüş çalışmalarla saptanmıştır [89, 91-97]. Son 7 yılda bu konuda yapılmış çalışmalar aşağıda özetlenmiştir:

Çörekotu tohumlarının, çimlenme koşulları dışında da yüksek lipaz aktivitesi gösterdiği, öğütülmüş tohumlarda otohrolizinin etkisiyle serbest yağ asitleri miktarının %50'lere ulaştığı Üstün ve arkadaşları [89], tohumlardaki nemin yükseltilmesiyle in-situ hidroliz derecesinin %70'e erişebildiği Dandik ve Aksoy tarafından deneysel olarak belirlenmiştir [91]. Dandik ve Aksoy, in-situ hidroliz reaksiyonunun 20-40°C arası 1.mertebe, 50-70°C'larda ise 2.mertebe reaksiyon mekanizmasına göre gerçekleştiğini de saptamışlardır [92].

Kıldırın ve arkadaşları [93], çörekotu tohumlarının tane büyüklüğünün in-situ enzimatik hidrolize olan etkisini incelemiştir. 425 μm 'dan daha küçük tanelerde 7 saat sonunda serbest yağ yüzdesinin %46'a eriştiğini, 850 μm 'den büyük tanelerle çalışılma durumunda ise serbest yağ miktarının ancak %11'e yükselbildiğini bulmuşlardır.

Dandik ve Aksoy [94, 95] öğütülmüş çörek otu tohumları ve pres artığını kullanarak pH 6 ve 50'da, kullanılmış yağ hidrolizini %95 hidroliz derecesinde

gerçekleştirmişlerdir. Kullanılmış yağ kullanılan bu çalışmada, ortama katılan noniyonik deterjanın hidrolize etkisi olmadığını da saptamışlardır [95].

Oleik asit ile metanolün esterleşmesinde, 45°C'de metanol/yağ oranının 1/1.5 olması durumunda, toplam ağırlığın %50'si kadar pres artığı çörekotu'nun kullanılması ile %50 verimle ester oluşturulmuştur [95].

Çörekotu tohumlarının pres artığı, gliserin ile oleik asitin esterleşmesinde de etken katalizör etkisi göstermiştir [95]. Gliserin/oleik asit oranının 4/1 olması durumunda, 45°C'de ve %45 pres artığı kullanımında, elde edilen ester karışımında % 16 triolein, %37 diolein ve %31 monoolein olduğu belirlenmiştir. Reaksiyonun, sıcaklığının 55°C çıkarılması ve reaktanların stokiometrik oranda kullanılmasıyla triolein miktarının %82'e yükseldiği de aynı araştırmacılar tarafından belirlenmiştir [96].

Gliserin ile ayçiçeği yağı yağ asitleri arasındaki esterleşme reaksiyonunda 55°C'de ve stoikometrik reaktan oranında, %45 çörekotu pres artığı katalizörlüğünde %78'lik trigliserid oluşumu sağlanabilmiştir [96].

Dandik ve Aksoy [97], çörekotu lipazını aseton tozu formunda kullanarak da kızartma yağının gliseroliz reaksiyonunu gerçekleştirmeye muvaffak olmuşlardır. Reaksiyon sonucunda, %29 monogliserid ve %32 digliserid karışımı elde etmişlerdir.

BÖLÜM 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Ham Maddeler

3.1.1. Çörekotu Tohumlarının Karakterizasyonu

Bu çalışmada kullanılan çörekotu tohumları Denizli yöresine ait olup, İstanbul Mısır Çarşısı'ndan temin edilmiştir. Tohumlar 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) standard AOCS (American Oil Chemists' Society) yöntemlerine göre belirlenmiştir [98]. 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'da 16 saat yakılması sonucu elde edilen bakiye üzerinden hesaplanmıştır. Kül komponentlerinin analizi yapılmamıştır.

Tohumların yağ ve protein içeriklerinin belirlenmesinde standard 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 dönüştürme faktörü ile çarpımından protein yüzdesi hesaplanmıştır.

Ham elyaf (crude fiber) yüzdesinin bulunmasında, önce yağı giderilmiş tohumlardan 0,25 M H_2SO_4 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, hem elyaf yüzdesinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

Çörekotu tohumlarının karbonhidrat içeriği ise: $100 - (\text{nem} + \text{yağ} + \text{protein} + \text{kül})$ eşitliğine göre hesaplama yolu ile 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 tohumlarından lipaz enziminin ekstraksiyonuna pH'ın, tampon çözelti cinsinin etkisinin incelendiği bu çalışmada, fosfat ve Tris-HCl tampon çözeltileri ile çalışılmıştır.

Fosfat tamponu çözeltilerinin hazırlanmasında, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (1/15 mol/L) ve sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) (1/15 mol/L) stok çözeltilerinden faydalanılmıştır. pH 5,6,7,8 değerlerinde fosfat tampon çözeltileri, Tablo 3.2'de gösterilen miktarlarda KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 stok çözeltilerinin karışımı ile hazırlanmıştır. pH 9 ve 10 fosfat tampon çözeltileri ise pH 8 tampon çözeltisinin pH'ı 0.5 N NaOH ilavesi ile 9 ve 10'a ayarlanması ile elde edilmiştir.

TABLO: 3.2. Farklı pH Değerlerinde Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanma Prosedürü.

pH	KH ₂ PO ₄ Çözeltisi (mL)	Na ₂ HPO ₄ Çözeltisi (mL)
5	99.2	0.8
6	88.9	11.9
7	41.3	58.7
8	3.7	96.3

Tris-HCl tampon çözeltilerinin hazırlanmasında ise Tris(hidroksimetil) amino metan (0.2 mol/L) ve HCl (0.1 mol/L) stok çözeltileri kullanılmıştır. pH 7.2, 8 ve 9 değerlerinde Tris-HCl tampon çözeltileri, Tablo 3.3'de verilen miktarlarda Tris ve HCl stok çözeltileri karışımı ile hazırlanmıştır. pH 6 tamponu ise pH 7.2 tampon çözeltisinin pH'ı 0.5 N HCl ile 6'a ayarlanması ile elde edilmiştir.

TABLO: 3.3. Farklı pH Değerlerinde Tris-HCl Tampon Çözeltilerinin Hazırlanma Prosedürü.

pH	Tris Çözeltisi (mL)	HCl Çözeltisi (mL)
7.2	44.7	55.3
8	27.9	72.1
9	5.3	94.7

Çörekotu tohumlarının analizinde; elde edilen lipaz ekstraktlarının protein içeriklerinin ve lipaz aktivitelerinin saptanmasında kullanılan çözücüler ve kimyasal maddeler Merck firmasının saf ürünleridir.

3.2. Çalışma Yöntemi

3.2.1. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu

3.2. Çalışma Yöntemi

3.2.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çörekotu tohumlarından lipaz ekstraktlarının eldesinde, ilk aşamada 60 gram tohum 1 litre hacmindeki blender'da (Braun, mx82 model, Frankfurt, Almanya) 0°C'ye soğutulmuş 300 mL su veya tampon çözelti içerisinde homojenize edilmiştir. Karıştırma yüksek devirde 20 dakika sürdürülmüş ve karıştırma esnasında sıcaklığın 25°C'yi geçmemesine dikkat edilmiştir. Elde edilen homojenat, daha sonra katı kısımlarından uzaklaştırılması için naylon çoraptan süzölmüştür. Çorap üstünde kalan katı partiküller 4x25 mL 0.1 M CaCl₂ çözeltisi ile yıkanmış ve yıkama suları da filtrata ilave edilmiştir. Elde edilen filtrat ve yıkama suları, çalışmamızda "lipaz ekstraktı" olarak isimlendirilmiştir. Ekstraktın hacmi okunduktan sonra, ekstraktın protein içeriği ve lipaz aktivitesi tayin edilmiştir.

3.2.2. Lipaz Ekstraktının Protein İçeriğinin Belirlenmesi

Ekstraktların protein içeriği, Biüret yöntemine [99] göre Randox Total Protein Reaktifi (Randox Lab. Ltd., Antrim, İngiltere) kullanımı ile spektrometrik olarak belirlenmiştir.

1 mL lipaz ekstraktına 1 mL 0.66 M perklorik asit çözeltisi ilave edilmiş ve önce tüm proteinin çökmesi sağlanmıştır. 10 dakika sonra bu katı sıvı karışımı, 10 000 rpm devir hızında 10 dakika santrifüjlenmiş, sıvı tabakası dekante edildikten sonra santrifüj tübünde kalan protein çökeleği 1 mL suda (veya pH 7.2 fosfat tamponunda) çözölüp üzerine 3 ml biüret reaktifi katılmıştır. 30 dakika bekletildikten sonra çözeltinin 546 nm dalga boyundaki absorbansı okunmuştur.

Bovine albumin standardı protein kalibrasyon eğrisinin çıkarılması için kullanılmıştır. Mililitresinde 1,2,4,6,8 ve 10 mg albumin bulunacak şekilde hazırlanmış albumin çözeltilerinin absorbans değerlerinden, protein miktarı ile okunan absorbans değerleri arasındaki lineer bağıntının matematiksel eşitliği belirlenmiştir. Elde edilen eşitlik:

$$P = 19.4553 (A) - 0.7899$$

dir. Burada:

P = mg/ml cinsinden protein miktarı,

A=Okunan absorbans değeri'dir.

3.2.3. Lipaz Ekstraktının Hidroliz Aktivitesinin Saptanması

Enzim terminolojisine göre 1 ünite enzim aktivitesi (4), "optimum koşullarda dakikada 1 μ mol substrat parçalanmasına sebep olan aktivite" olarak tanımlanmaktadır. Bu tanıma göre, 1 ünitelik lipaz aktivitesi (u) μ mol yağ asitleri/dak), dakikada trigliseridlerden 1 μ mol yağ asitlerini açığa çıkaran enzim miktarıdır. Bu tanım saf enzimlerle çalışıldığında bir mana taşımaktadır. Saf olmayan enzimlerde ise, spesifik aktivite ve total aktivite tanımları daha anlamlıdır. Total aktivite, belli bir miktar enzim içeren numunenin, bir dakika zarfında trigliseridlerden açığa çıkardığı yağ asitlerinin μ mol miktarı, spesifik aktivite ise numunede, 1 mg protein tarafından dakikada trigliseridlerden açığa çıkarılan yağ asitlerinin μ mol miktarıdır.

Aktivite tayininde, substrat olarak 58 mM zeytinyağı emülsiyonu kullanılmıştır. Emülsiyon, 5 gram zeytinyağı, 5 gram arap zıncı ve 95 ml %0.89'luk NaCl çözeltisinin blenderda beşer dakika iki kez karıştırılmasıyla hazırlanmıştır.

5 ml zeytinyağı emülsiyonuna, 0.5 mL 0.1 M CaCl_2 ve 1 mL lipaz ekstraktı (5-10 mg protein içeren) katıldıktan sonra karışım %0.89'luk NaCl çözeltisi ile hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır. Karışım 37°C'da sabit hızda çalışan bir çalkalayıcı da 30 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra reaksiyon karışımına, 20 ml etilalkol-aseton

(1:1, hacmen) karışımı ilave edilerek enzim inaktive edilmiş ve hidroliz reaksiyonu sonucu zeytinyağından açığa çıkan yağ asitleri, 0,05 N NaOH ile timolftalein indikatörüne karşı titre edilerek bulunmuştur. Paralel olarak yürütülen tüm deneylerde, aynı koşullarda sabit deneme de yapılmıştır.

Reaksiyon sonunda 1 dakikalık zaman içerisinde açığa çıkan yağ asitlerinin μmol cinsinden miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Yağ asitleri} = \frac{(S_1 - S_2) \times C \times 1000}{30}$$

($\mu\text{mol/dak}$)

Burada:

S_1 = Numune için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

S_2 = Şahit için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

C = NaOH konsantrasyonu (mol/L)

Lipaz ekstrakt örneklerinin spesifik aktiviteleri ise aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{Serbest yağ asitleri (} \mu\text{mol/dak)}}{\text{Örneğin protein içeriği (mg)}}$$

Total aktivite değerleri ise, saptanan spesifik aktivite değerinin numunenin içerdiği toplam protein miktarı ile çarpılmasıyla bulunmuştur.

3.2.4. Çörekotu Tohumlarının Çimlendirilmesi ve Çimlenmiş Tohumlardan

Lipaz Enzimi Ekstraksiyon Yöntemi

Çimlenmenin ekstraksiyon verimine ve ekstraktın lipaz aktivitesine etkisinin incelendiği deneysel çalışmalarda çimlenmiş tohumlar kullanılmıştır. Çimlenme, Hassanien ve Mukherjee'nin [79] rapiska ve bakla tohumlarına uyguladıkları çimlenme koşullarında gerçekleştirilmiştir. 24 saat 24°C'de suda ıslatılmış tohumlar,

daha sonra nemli süzgeç kağıtları arasında 26°C'da ve karanlıkta bekletilmiştir. Tohumlarda 3.günden sonra sürgünlerin oluştuğu, 7.günde ise sürgünlerin 1-2 cm'a ulaştığı gözlenmiştir.

Çimlenmiş tohumlardan lipaz enziminin ekstraksiyonu, Bölüm 3.2.1'de açıklanan orijinal tohumlara uygulanan yöntemle göre yapılmıştır. Elde edilen lipaz ekstraktlarının protein içeriği ve lipaz aktiviteleri de yine Bölüm 3.2.2. ve 3.2.3'de açıklanan yöntemlere göre saptanmıştır.

3.2.5. Çörekotu Lipaz Enziminin Optimum pH ve Sıcaklık Değerlerinin Belirlenmesinde Uygulanan Prosedür

Belirlenen optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen lipaz ekstraktı kullanılarak, lipaz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği pH değeri (değerleri) belirlenmiştir. Bunun için, 5 mL 0.1 M CaCl_2 çözeltisi, 0.8 mL lipaz ekstraktı ve 3.7 mL istenilen pH değerinde tampon çözelti ilave edilerek son hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır. Karışım 37°C'da sabit hızda çalışan bir çalkayıcı da 30 dakika karıştırılmıştır. Hidroliz sonucu açığa çıkan yağ asitleri Bölüm 3.2.3'de açıklanan aktivite tayin yöntemine göre belirlenmiş ve lipaz enziminin incelenen pH değerindeki aktivitesi saptanmıştır. pH 4-10 arasında yukarıda açıklanan yöntemle göre enzimin aktivite değerleri bulunmuştur. Deneysel olarak saptanan bu aktivite değerlerinin pH'a göre değişim grafiği çizilerek çörekotu lipaz enziminin etkin aktivite gösterdiği pH aralığı ve optimum pH yani maksimum aktivite gösterdiği pH değeri (veya değerleri) grafik üzerinden belirlenmiştir.

Çörekotu tohumları lipaz enziminin optimum sıcaklık değerinin bulunmasında da belirlenen optimum pH değerinde (veya değerlerinde) enzimin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık saptaması yapılmıştır. 30-55°C arasında, optimum pH'da hazırlanan zeytinyağı, CaCl_2 , lipaz ekstraktı ve tampon çözelti içeren bir seri karışıma, yukarıda açıklanan aktivite tayin yöntemi aynen uygulanmış ve her sıcaklık derecesinde enzimin gösterdiği aktivite değeri saptanmıştır. Deneysel olarak saptanan bu aktivite değerlerinin sıcaklığa göre değişim grafiği çizilerek çörekotu

lipaz enziminin optimum sıcaklığı yani en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık grafik üzerinden belirlenmiştir.

3.2.6. Lipaz Ekstraktlarından Lipaz Enziminin Çöktürülmesi ve Saflaştırılmasında Uygulanan Yöntemler

Lipaz enzimlerinin esas olarak protein yapısında olması nedeniyle, ekstraktlardan lipaz enziminin çöktürülmesi ve dolayısıyla saflaştırılmasında, proteinler için kullanılan yöntemlerden "aseton ile çöktürme" ve "amonyum sülfat ile fraksiyonlama" yöntemleri denenmiştir.

3.2.6.1. Aseton ile Çöktürme Yolu ile Lipaz Enziminin Saflaştırılması

Yöntemin esası, proteinlerin sulu çözeltilerine, suda çözünebilen ve ortamın dielektrik sabitini önemli derecede azaltabilecek kadar düşük dielektrik sabitine haiz solventlerin katılmasıdır. Bu solventler su ile proteinler arasındaki elektriksel bağları zayıflatarak proteinlerin dispersiyonunu önlerler ve böylece proteinlerin sudaki çözünürlüklerini azaltarak çökmelerini sağlarlar. Metilalkol ve özellikle aseton bu yöntem için en uygun solventlerdir. Metanole nazaran asetonun daha ucuz olması ve daha saf üretilmesi, asetonun tercih edilme nedenleridir.

Lipaz ekstraktlarından lipaz enziminin çöktürülmesi için, 200 mL ekstrakt üzerine -15°C civarında büretten damla damla aseton ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Kristallenmenin görüldüğü anda, ilave edilen aseton hacmi okunmuş ve karışım 30 dakika bekletilmiştir. Çökelek, 10 000 rpm devir hızında 15 dakika santrifüjlenerek çözeltiden uzaklaştırılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Aseton çökeleği daha sonra pH 6 fosfat tampon çözeltisinde çözülmüş, çözünmeyen maddeler 10 000 rpm devirde 15 dakika santrifüjlenerek uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen berrak çözeltilerin protein içerikleri ile lipaz aktiviteleri saptanmıştır.

3.2.6.2. Amonyum Sülfat ile Fraksiyonlama Yöntemine Göre Lipaz Enziminin Saflaştırılması

3.2.6.2. Amonyum Sülfat ile Fraksiyonlama Yöntemine Göre Lipaz Enziminin Saflaştırılması

Yöntemin esası, proteinlerin sudaki çözünürlüğünün, elektrolit ilavesiyle azaltılması yolu ile protein çöktürülmesidir. Elektrolit olarak her iyonik tuz bu amaçla kullanılabilirse de amonyum sülfat ucuz ve suda yüksek çözünürlük göstermesinden dolayı en fazla kullanılan tuzdur.

Deneylerimizde amonyum sülfat ile fraksiyonlama 3 kademede gerçekleştirilmiştir [39].

1.Kademede, %30 amonyum sülfat doygunluk derecesinde çalışılmıştır. 200 mL lipaz ekstraktına, 35,2 gram katı amonyum sülfat katılmış ve çözünene kadar karıştırılmıştır. Çözelti 4°C'da 30 dakika karıştırılarak bekletilmiştir. Bu esnada çöken proteinler, 10 000 devir hızında 15 dakika santrifüj edilerek sıvı fazdan ayrılmıştır. Böylece elde edilen protein çökeleği %30 fraksiyonu olarak adlandırılmış ve analiz için saklanmıştır.

2.Kademede, 1.kademedan gelen berrak sıvı fazla çalışılmıştır. Berrak çözeltinin %60 amonyum sülfat doygunluk derecesine erişebilmesi için, içersinde 19.8 g amonyum sülfat/100 mL oranında amonyum sülfat çözölmüştür. Çözelti yine 4°C'da 30 dakika bekletilmiş ve süre sonunda çöken proteinlerin sıvı fazdan uzaklaştırılması için 10 000 rpm devir hızında 15 dakika santrifüjlenmiştir. Bu kademede elde edilen çökelek, %30-60 fraksiyonu olarak adlandırılmış ve analiz için saklanmıştır.

3.Kademede ise, 2.kademede elde edilmiş berrak sıvı faz kullanılmıştır. Bu kez çözeltinin %80 amonyum sülfat doygunluk derecesine ulaşması için içersinde 14.3 g amonyum sülfat/100 mL oranında amonyum sülfat çözölmüştür. İlk iki kademede uygulanan işlemler tekrarlandığında, nihai olarak elde edilen protein çökeleği %60-80 fraksiyonu olarak adlandırılmış ve analiz için saklanmıştır.

Her üç kademede elde edilen protein çökelekleri eşit iki kısma bölündükten sonra, ayrı ayrı fosfat (pH 6) ve Tris-HCL (pH 6) tampon çözeltilerinde çözülmüştür. Çözünmeyen kısımlar santrifüjle uzaklaştırılmış ve elde edilen berrak çözeltilerin protein içerikleri ve lipaz aktiviteleri saptanmıştır.

3.3. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonu İçin

Uygun Ekstraksiyon Yönteminin Seçimi.

Çörekotu tohumlarından lipaz enziminin ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi için bir seri ön deneme yapılmıştır. Bu denemelerde yağsız tohum kullanılmış ve ekstraksiyon pH 5 fosfat tampon çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Tohumlardan yağ giderilmesinde iki yöntem denenmiştir. Bir örnek, konvansiyonel soxhlet cihazında 6 saat süre ile hekzanla ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Diğer üç örnek ise soğukta hekzan ile 4 kez ekstrakte edilmişlerdir. Soğukta hekzan ile yağı giderilmiş 40 gram civarı tohumlar üzerine, çözücü/tohum oranı 5/1 (hacim/ağırlık) olacak şekilde fosfat tamponu katıldıktan sonra, örnekler blenderda 10 dakika, manyetik karıştırıcı ile 1 saat ve 2 saat süre ile ayrı ayrı karıştırılmıştır. Soxhletle yağı giderilmiş tohum örneği ise yine aynı oranda fosfat tamponu ile manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra her örnek, çoraptan süzölmüş, çorap üzerinde kalan katı bakiye su ile yıkanmış ve yıkama suları da filtrata ilave edilmiştir. Böylece elde edilen lipaz ekstraktları, 10 000 devirde 15 dakika santrifüjlendikten sonra, protein içerikleri ve lipaz aktivilerinin saptanması için analiz edilmişlerdir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.4 toplu olarak verilmiştir.

TABLO: 3.4. Yağsız Çörekotu Tohumlarından pH 5 Fosfat Tampon Çözeltilisi ile Lipaz Enziminin Ekstraksiyonuna Ekstraksiyon Yönteminin Etkisi.

Yağ giderme yöntemi	Lipaz ekstraksiyon yöntemi	Ekstrakt hacmi (mL)	Ekstrakte edilen protein		Ekstraktın lipaz aktivitesi	
			Miktar (mg)	Verim (%)	Total aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)
Soğukta hekzan ile	Manyetik karıştırıcı ile 1 saat karıştırma	146	1975	14.1	577	0.29
	Manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırma	142	2239	15.9	933	0.42
	Blenderda 10 dak. karıştırma	172	2589	18.9	1061	0.41
Soxhlet cihazında hekzan ile	Manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırma	140	3801	26.9	1067	0.28

Tablo 3.4 verilen sonuçların incelenmesinden, soğukta hekzan ile yağsızlaştırılmış tohumlardan en fazla proteinin blenderda karıştırma esnasında ekstrakte edilebildiği anlaşılmaktadır. Bu ekstraktın lipaz aktivitesi de pratik olarak manyetik karıştırıcı ile 2 saat karıştırma sonunda elde edilen ekstraktın spesifik aktivitesine eşittir. Sonuç olarak, blenderda 10 dakika içerisinde ekstraksiyon yürütmekle, zaman ve protein içeriği açısından avantaj sağlanmaktadır.

Soxhlet cihazında yağsızlaştırılmış tohumlardan elde edilmiş ekstraktın protein içeriği, blenderda ekstrakte edilmiş örneğin protein içeriğine göre %150 daha fazla olmasına karşın, ekstraktın lipaz aktivitesi mukayese edilen örneğe göre %30 daha düşüktür. Bu durum, soxhlet ekstraksiyonu sırasında 6 saatlik sürede tohumların 60-70°C'da tutulmasının bir sonucudur. Sıcaklık etkisiyle selüloz zarlarında yumuşamanın gerçekleşmiş olması müteakip protein ekstraksiyonu kolaylaştırmış, buna karşılık lipaz enziminin 60-70°C sıcaklıkta uzun süre kalması aktivitesinde kısmi kayıba yol açmıştır.

Elde edilen bu sonuçlara göre, ekstraksiyonun blenderda yapılmasına karar verilmiş ve tez boyunca ekstraksiyon, Bölüm 3.2.1.'de açıklanan çalışma yöntemine göre yapılmıştır.

3.4. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonuna Çimlenmenin Etkisi.

Bitkisel lipaz kaynağı olan tahıllar ve yağlı tohumlarda (hint tohumu dışında) normal koşullarda lipaz aktivitesi görülmez. Tahıl taneleri ve tohumlar lipaz aktivitesine çimlenme esnasında sahip olurlar. Çimlenme koşullarında, ilk aşamada metabolik proteinler diye adlandırılan albumin ve globulin proteinlerinin miktarında artış ve metabolik enzimlerin (lipaz dahil) sentezlenmesi gerçekleşir. Birinci aşama ortalama 3-5 gün devam eder ve bu zaman içerisinde enzimler en yüksek aktivite düzeyine erişirler. Çimlenmenin ikinci aşamasında, bitki gelişimi için depo proteinleri olan prolamin ve glutelinlerin degradasyonu başlar ve metabolik enzimler (lipaz dahil) aktivite kaybederler [44].

Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalında yapılmış çalışmalarla, çörekotu tohumlarının hint tohumuna benzer şekilde, çimlenme dışı koşullarda da lipaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiş durumdadır [89, 91]. Çalışmamızın bu bölümünde ise, yukarda açıklanan çimlenme sürecinin lipaz açısından çörekotu tohumlarında nasıl gerçekleştiğinin belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla, tohumlar 7 gün boyunca çimlenme koşullarında bekletilmiştir. Çimlenmenin 1., 4. ve 7. gününde alınan tohum örnekleri su ile ekstrakte edilmiştir. Literatüre göre, lipaz enzimlerinin en konsantre bulunduğu protein fraksiyonu suda çözünme gösteren albuminlerdir [44]. Tohumlardan öncelikle albumin ekstrakte edebilmek amacıyla, deneylerimizde çözücü olarak su kullanılmıştır. Ekstraksiyon yönteminin seçiminde 40 gram yağsız tohum örneklerinin kullanılmış olmasından dolayı, sonuçların mukayese edilebilmesi için bu ve bundan sonraki bölümlerde, 40 gram yağsız tohuma eşdeğer 60 gramlık orijinal tohum örnekleri ile çalışılmıştır.

Çimlenmiş tohumlardan su ile ekstrakte edilen lipaz ekstraktlarının, protein içerikleri ve lipaz aktiviteleri deneysel olarak belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 3.5'de sunulmuştur.

TABLO: 3.5.Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonuna Çimlenmenin Etkisi.
(60 g orijinal tohum 300 mL su ile ekstrakte edilmiştir).

Çimlenme Süresi (gün)	Ekstrakte miktarı (ml)	Ekstrakte edilen protein		Lipaz aktivitesi	
		Miktar (mg)	verim (%) ^a	Total aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)
1	230	1337	9.6	710	0.53
4	255	1862	13.3	2056	1.10
7	260	4450	31.8	1299	0.29

Tablo 3.5'den açıkça görüldüğü üzere, çimlenme süresi uzadıkça suda çözünen proteinlerin miktarında önemli artış olmaktadır. 7.günde ekstrakte edilebilen protein 1.güne nazaran 3 kat daha fazladır. Lipaz aktivitesi ise 7.günde 1.günkü değerinin yarısına düşmektedir. En yüksek lipaz aktivitesi 4.günde görülmekte olup, 1.günkü

aktiviteye göre 2 kat daha fazladır. Sonuçlar, diğer bitkisel tohumlarda görülen çimlenme sürecinin çörekotu tohumlarında da benzer şekilde yürüdüğünü göstermiştir.

Alınan bu sonuçlar ışığında, tampon çözeltileri ile yürüttüğümüz deneylerde tohumların çimlenme süresi 4 gün olarak saptanmıştır.

3.5. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonuna Tampon Çözelti Cinsi ve pH'ının Etkisi.

Daha önce açıklandığı üzere, lipaz enzimleri metabolik proteinler olan albumin (suda çözünen) ve globulin (tuz çözeltilerinde çözünen) fraksiyonlarında bulunmaktadır [44]. Tohumlardan lipaz enzimini mümkün olduğu kadar yüksek verimle elde etmek amacıyla, albumin ve globulinleri birlikte ekstrakte edebilecek tampon çözeltiler ile çalışılmıştır. Tampon çözelti olarak fosfat ve Tris-HCl çözeltileri seçilmiş olup, bu bölümde tampon çözelti cinsinin ve pH'ının protein ekstraksiyon verimine ve elde edilecek ekstraktların lipaz aktivitelerine olan etkileri incelenmiştir.

Deneylerimizde, 4 gün çimlenmiş tohumlar pH 5, 6, 7, 8, 9 ve 10 fosfat tampon çözeltileri ile pH 6, 7, 8 ve 9 Tris-HCl tampon çözeltileri ile ayrı ayrı ekstrakte edilmiştir. Elde edilen tüm lipaz ekstraktlarının protein içerikleri ve lipaz aktiviteleri saptanmıştır. Fosfat tampon çözeltileri ile elde edilen ekstraktlara ait sonuçlar Tablo 3.6; Tris-HCl tampon çözeltileri ile elde edilen ekstraktların sonuçları da Tablo 3.7'de verilmiştir.

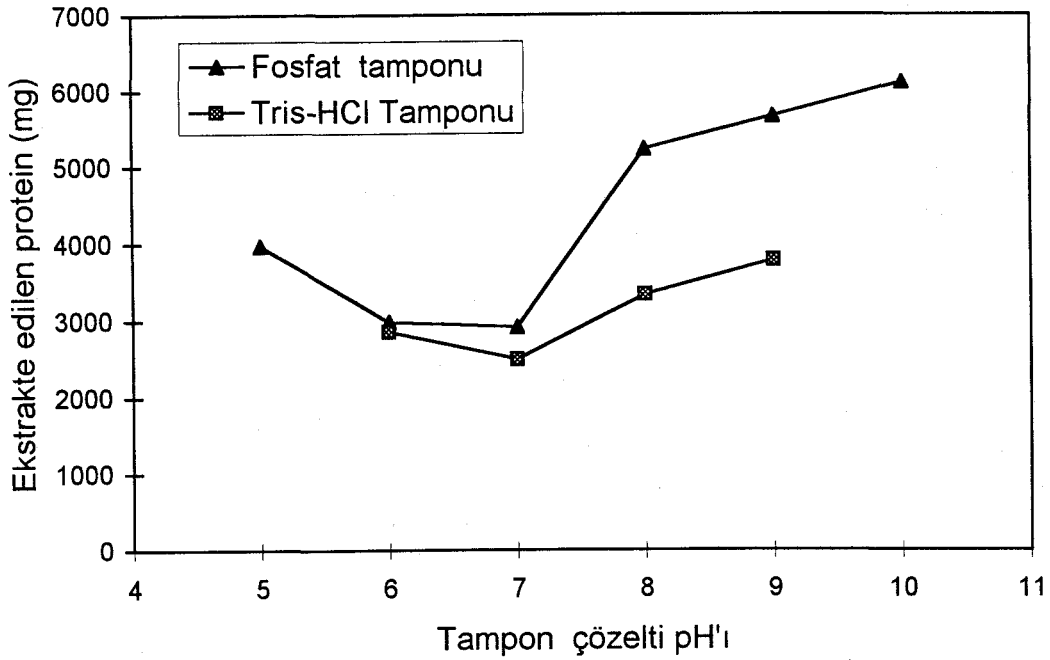
Kullanılan tampon çözelti cinsinin ve pH'ının tohumlardan protein ekstraksiyon verimine olan etkisinin daha net görülmesi için Tablo 3.6 ve 3.7'deki verilerden, ekstrakte edilen protein miktarının çözelti pH'ı ile değişim grafiği Şekil 3.1'de verilmiştir.

TABLO: 3.6. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonunda Fosfat Tampon Çözelti pH'ının Etkisi.

Tampon çözelti pH'ı	Ekstrakt miktarı (mL)	Ekstrakte edilen protein		Lipaz aktivitesi	
		Miktar (mg)	Verim (%)	Total aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)
5	263	3980	28.5	1900	0.48
6	253	2978	21.3	1898	0.64
7	238	2918	20.9	1748	0.6
8	226	5233	37.4	1828	0.35
9	220	5663	40.5	1669	0.30
10	226	6105	43.7	844	0.14

TABLO: 3.7. Çörekotu Tohumlarından Lipaz Enziminin Ekstraksiyonuna Tris-HCl Tampon Çözelti pH'ının Etkisi.

Tampon çözelti pH'ı	Ekstrakt miktarı (ml)	Ekstrakte edilen protein		Lipaz aktivitesi	
		Miktar (mg)	Verim (%)	Total aktivite (U)	Spesifik aktivite (U/mg protein)
6	255	2858	20.4	2010	0.70
7	240	2491	17.8	1843	0.74
8	243	3336	23.9	1968	0.59
9	250	3780	27.0	1374	0.36



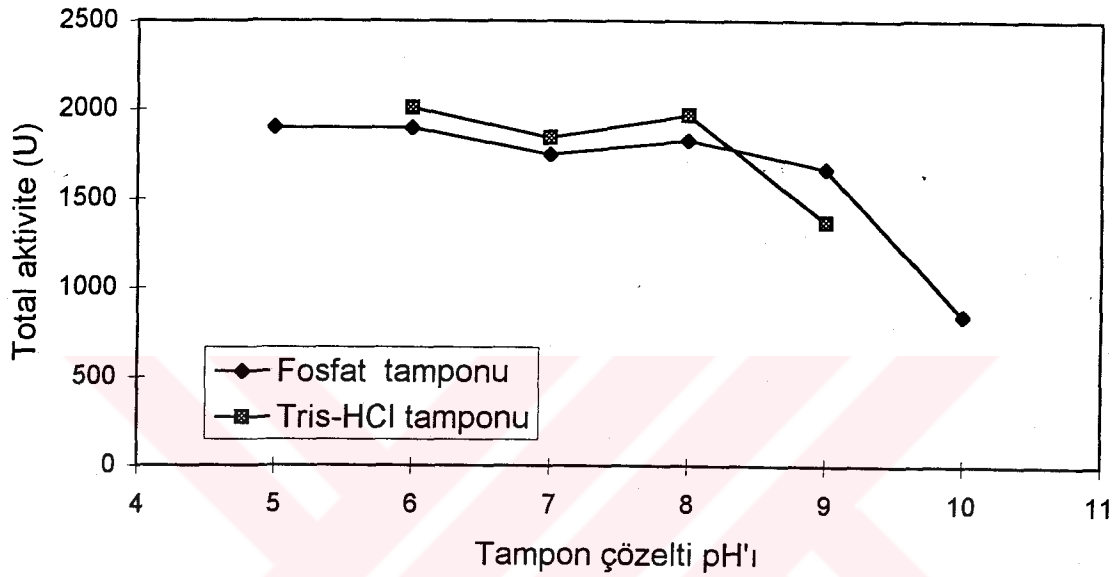
ŞEKİL: 3.1. Lipaz Ekstraktlarının Protein İçeriklerinin Tampon Çözelti pH'ı ile Değişimi.

Şekil 3.1'in incelenmesiyle, her iki tampon çözelti için nötral pH'da protein ekstraksiyonunun en az gerçekleştiği, ortamın asitliği veya bazikliği arttıkça ekstrakte edilebilen protein miktarında artma olduğu görülmektedir. Nötral tampon çözeltiler ile çalışıldığında, minimum protein ekstrakte edilebilmiş olması beklenen bir olaydır. Metabolik proteinlerden albumin isoelektrik noktası pH 4-4.5, globulin ve depo proteinlerinden glutelin'in ise pH 6,5-7 dir [88]. Tohumda bulunan globulin ve glutelin proteinlerinin pH 7 de minimum çözünme göstermesi nedeniyle toplam ekstrakte edilen protein miktarı da minimum olmuştur. pH düştükçe çözünen globulin miktarında artmaktadır. pH 5'de ise, depo proteini glutelinde çözünmeye başladığından, çözünen protein miktarında büyük artış olacağı beklenilmektedir [44]. Bu nedenlerle, örneğin pH 5 fosfat tampon çözeltisi ile pH 7'ye göre %135 daha fazla protein elde edilmiştir.

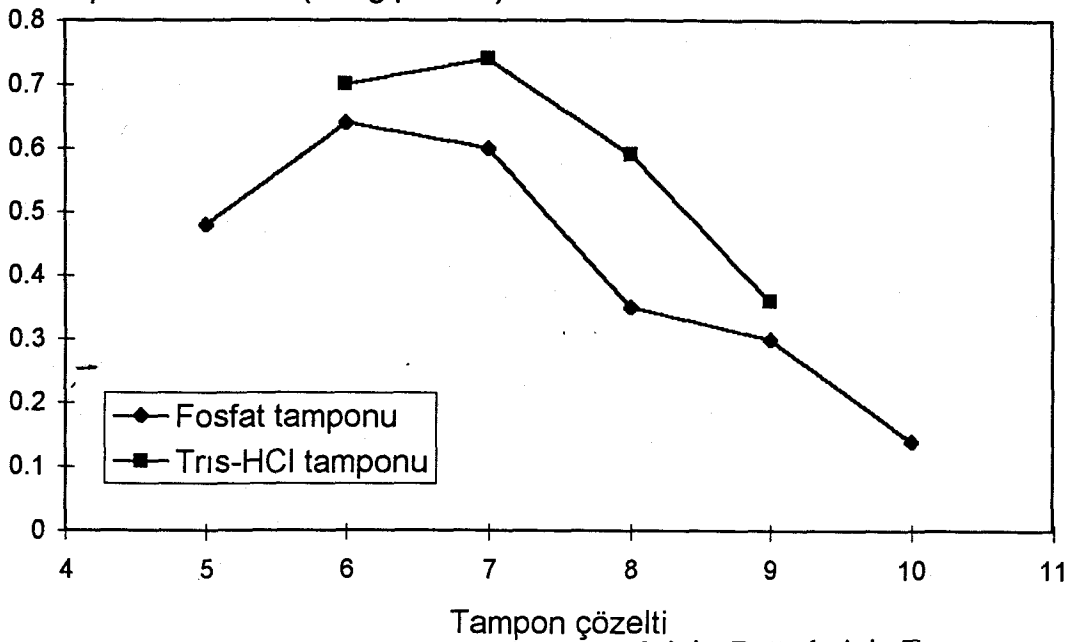
Alkali pH'larda tüm protein fraksiyonları (albumin, globulin ve glutelin) yüksek çözünürlük gösterdiğinden, alkali tampon çözeltileri ile elde edilmiş lipoz ekstraktlarının protein içeriklerinde yükselme görülmektedir. Fosfat tampon çözeltisi ile pH 9'da, pH 7'ye göre %200 daha fazla protein elde edilmiştir.

Protein çözmede her iki tampon çözeltinin davranışlarında, şekil üzerinde eğilim olarak paralellik görülüyorsa da, fosfat tampon çözeltilerinin çözücü etkisinin Tris-HCl çözeltilerine göre, her pH değerinde, daha yüksek olduğu deneysel olarak belirlenmiştir. Örneğin, pH 9'da, fosfat tampon çözeltisi ile çörekotu tohumlarında bulunan proteinin %40.5'u çözeltiye alınabilmiş, aynı koşullarda Tris-HCl tampon çözeltisi ile ekstrakte edilen proteinin verimi ancak %27'e ulaşmıştır.

Her iki tampon çözelti ile farklı pH larda elde edilmiş lipaz ekstraktlarının lipaz aktiviteleri ile çözelti pH'ları arasında etkileşimi irdelleyebilmek için, Tablo 3.6 ve 3.7'de verilmiş sonuçlardan faydalanarak, lipaz ekstraktlarının total ve spesifik aktivitelerinin tampon çözelti pH'ı ile değişim eğrileri, her iki tampon çözelti için, Şekil 3.2 ve 3.3'de gösterilmiştir.



ŞEKİL: 3.2. Lipaz Ekstraktlarının Totol Aktivite Değerlerinin
Tampon Çözelti pH'ı ile Değişimi.
spesifik aktivite (U/mg protein)



ŞEKİL: 3.3. Lipaz Ekstraktlarının Spesifik Aktivite Değerlerinin Tampon
Çözelti pH'ı ile Değişimi.

Şekil 3.2 ve 3.3'de gösterilen pH ile aktivitelerin değişim eğrilerinden, fosfat tampon çözeltileri için, yüksek total aktivite gösteren lipaz ekstraktları pH 5,6 ve 8'de elde edilebildiği görülmektedir. Aynı ekstraktlar spesifik aktivite açısından incelendiğinde ise, en yüksek spesifik aktivite gösteren lipaz ekstraktı ise pH 6'da elde edilmiş olandır. Bu durum, pH 5 ve pH 8'de çözünmeye başlayan ve lipaz enzimi içermeyen glutelin proteinlerinin ekstraktlarda yeralmasının bir sonucudur. Glutelinler, ekstraktların protein içeriklerini arttırmakta dolayısıyla çözeltilerin spesifik aktivitelerinde düşmelere neden olmaktadır. En düşük spesifik aktivite pH 10'da elde edilmiş ekstraktta görülmektedir. Bu olay, glutelinler yanında, lipaz enziminin bu yüksek pH'da aktivite kaybı ile de alakalı olmalıdır. Genel olarak enzimler, düşük asitli ortamlarda ($\text{pH} < 4$) ve yüksek alkali ortamlarda ($\text{pH} > 8$) dayanıksızdır. Enzim cinsine göre kısmen veya tamamiyle denatüre olurlar [100]. Çörekotu lipazı için pH 9'da stabilite kaybının başladığı, pH 10'da ise kısmen denatüre olduğu söylenebilir.

Sonuçlarımıza göre, fosfat tamponu ile en yüksek spesifik aktiviteli ekstraktlar pH 6-7 aralığında elde edilebilmektedir. pH 6'da protein ekstraksiyon veriminin %21.3, pH 7'de ise %20.9 olduğu da dikkate alınmasıyla, fosfat tamponu ile lipaz ekstraksiyonunun optimum çalışma pH'ı 6 olarak belirlenmiştir.

Tris-HCl tampon çözeltileri ile elde edilen lipaz ekstraktlarının total ve spesifik aktivite değerleri, pH 6-8 arasında fosfat tamponu ile elde edilmiş ekstraktlara göre daha yüksektir.

Aynı pH aralığında, Tris-HCl tampon çözeltisi ile fosfat tampon çözeltilerine göre daha az protein ekstrakte edilmiştir (bak. Şekil 3.1). Daha az proteinin daha yüksek aktivite göstermesi, Tris-HCl'in albumince zengin protein fraksiyonlarını seçimli olarak ekstrakte ettiğini ortaya çıkarmaktadır. Muhtemelen, glutelin proteinlerini de kısmen çözebilmektedir. pH 9'da, Tris-HCl ile en düşük aktiviteli lipaz ekstraktının elde edilmesi de yine lipaz enziminin pH 9'da stabilite kaybı ile ilgili olmalıdır.

Tris-HCl ile en yüksek spesifik aktiviteli lipaz ekstraktı pH 7'de elde edilmiştir ve uygun ekstraksiyon pH aralığı 6-7 arasındır.

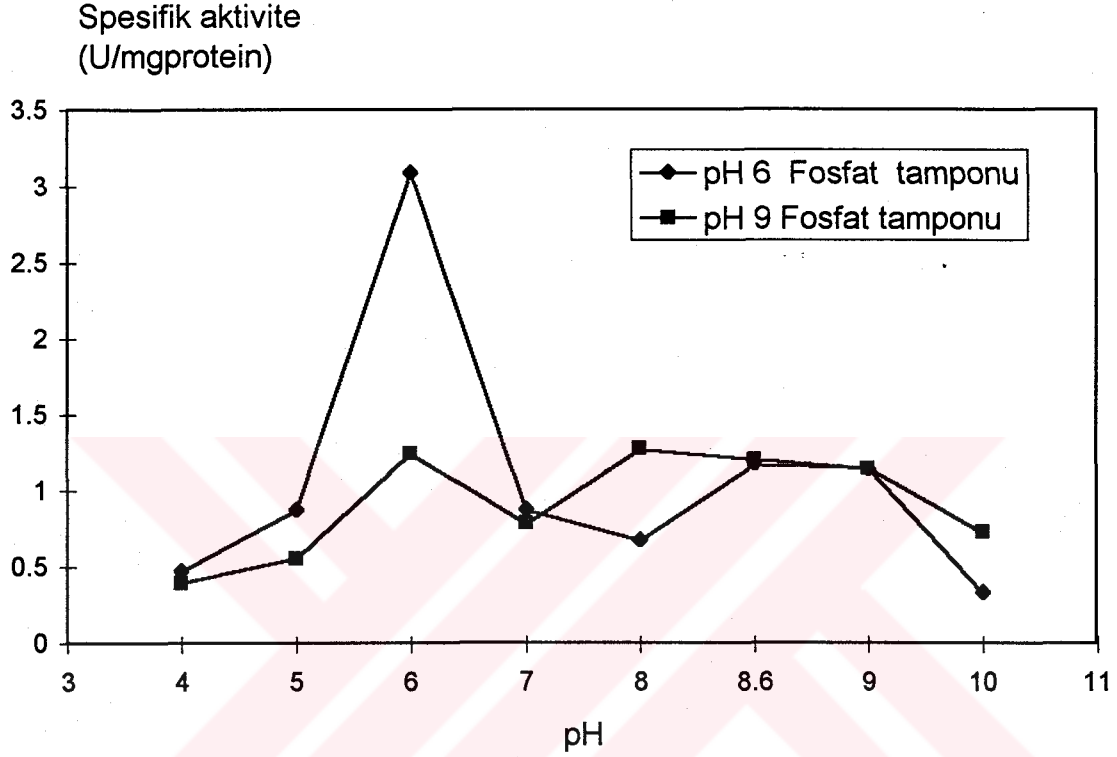
Sonuç olarak, çörekotu tohumlarından lipaz enziminin ekstraksiyonun da tampon çözelti pH'ının büyük etkisi olduğu saptanmıştır. Fosfat ve Tris-HCl tampon çözeltileri için bu pH 6-7 aralığı en uygun ekstraksiyon aralığıdır. Fosfat tampon çözeltisi için optimum ekstraksiyon pH'ı 6, Tris-HCl için pH 7 olduğu sonucuna varılmıştır. Protein ekstraksiyon verimi gözönüne alındığında, fosfat tampon çözeltileri ile çalışmanın daha uygun olacağı sonucu da ortaya çıkarılmıştır.

3.6. Çörekotu Lipaz Enziminin Optimum pH ve Sıcaklığının Saptanması

Çörekotu tohumlarından pH 6 fosfat tamponu ile elde edilen lipaz ekstraktının optimum pH değerinin saptanması için, pH 4-10 aralığında bir seri deneme yapılmıştır. Örneklerin spesifik aktiviteleri Bölüm 3.2.5'de açıklanan yöntemle göre, Tris-HCl tampon çözeltileri kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.8'de verilmiştir. Enzim aktivitesinin pH ile değişim eğrisi Şekil 3.4'de görülmektedir.

TABLO: 3.8. Çörekotu Tohumlarından pH 6 Fosfat Tamponu ile Ekstrakte Edilmiş Lipaz Enziminin Aktivitesinin pH ile Değişimi

pH	Spesifik aktivite(U/mg Protein)
4	0.47
5	0.87
6	3.09
7	0.87
8	0.67
8.6	1.17
9	1.14
10	0.33



ŞEKİL: 3.4. Çörekotu Lipaz Enziminin Aktivitesinin pH ile Değişimi.

Şekil 3.4'den, pH 6 fosfat tamponu ile elde edilen lipaz ekstraktının iki optimum pH'ı, gösterdiği, 1. optimum pH'ının 6'da, 2. optimum pH'ının 8 ila 9 arasında muhtemelen 8,6 da olduğu görülmektedir. Çörekotu tohumlarının asit lipaz aktivitesi alkali lipaz aktivitesinin yaklaşık 2,5 katı kadardır. Literatürden, rapiska, ayçiçeği, pamuk, domates, hardal, pirinç ve yulaf tohumlarının sadece alkali lipaz enzimi içerdikleri ve optimum pH'larının 7,5-9 arasında değiştiği bilinmektedir [75]. Asit ve alkali lipazlara mısır köklerinde (optimum pH'lar 5 ve 8.6)/(55) ve hint tohumunda (optimum pH'lar 5 ve 9) (64) rastlanmıştır. Hint tohumunda asit lipazın aktivitesi alkali lipazın yaklaşık 2 katıdır [64]. İncelediğimiz çörekotu lipaz enzimi, inzim karakteristikleri açısından da hint tohumuna benzemektedir.

Çörekotu tohumlarının asit ve alkali lipaz enzimlerinin içerdiği belirlendikten sonra, pH 9 fosfat tamponu ile elde edilen lipaz ekstraktında da optimum pH taraması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.9'da verilmiş, pH ile lipaz aktivitesinin değişim eğrisi Şekil 3.4'de ilave edilmiştir.

Çörekotu tohumlarından alkali fosfat tamponu ile ekstrakte edilen lipaz enzimi, benzer şekilde iki pH optimumu göstermiştir. Asit lipazın optimum pH'ı yine 6, alkali lipazın optimum pH'ı ise 8'e çok yakın, muhtemelen 8, olarak saptanmıştır. Alkali koşullarda elde edilen lipaz enzimlerinin asit ve alkali lipaz aktiviteleri ise pratik olarak birbirlerine eşit bulunmuştur.

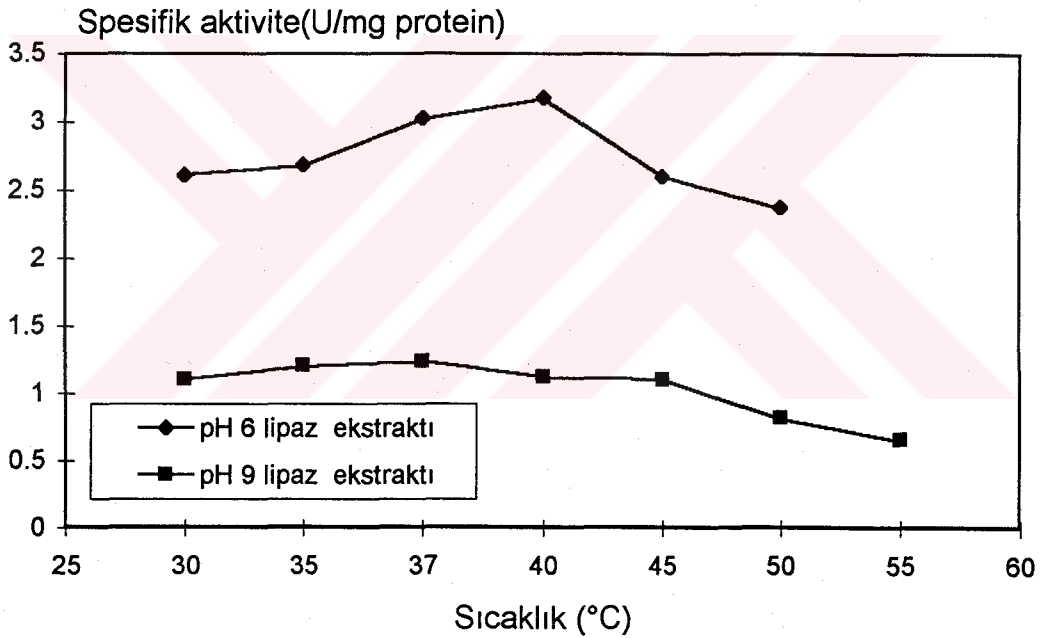
TABLO: 3.9. Çörekotu Tohumlarından pH 9 Fosfat Tamponu ile Ekstrakte Edilmiş Lipaz Enziminin Aktivitesinin pH ile Değişimi.

pH	Spesifik Aktivite (U/mg Protein)
4	0.39
5	0.55
6	1.24
7	0.78
8	1.27
8.6	1.20
9	1.14
10	0.72

Çörekotu lipaz enziminin optimum sıcaklığının belirlenmesinde, pH 6 ve pH 9 fosfat tampon çözeltileri ile elde edilmiş lipaz ekstraktları kullanılmıştır. Herbir ekstraktan alınmış numuneler, Tris-HCl tampon çözeltisi ile optimum pH'a ayarlanmış ve 30-55°C arasında zeytinyağı emülsiyonu ile 30 dakika sürede reaksiyona sokulmuşlardır. pH 6 ekstraktı için optimum pH 6; pH 9 ekstraktı için optimum pH 8 olarak seçilmiştir. Her iki seri deneme sonucunda elde edilen neticeler Tablo 3.10'da birlikte verilmiştir. Lipaz enziminin aktivitesinin sıcaklıkla değişim grafiği ise Şekil 3.5'de gösterilmiştir.

TABLO: 3.10 Çörekotu Tohumlarından pH 6 ve pH 9 Fosfat Tamponu ile Ekstrakte Edilmiş Lipaz Enzimlerinin Aktivitelerinin Sıcaklıkla Değişimi.

Sıcaklık (°C)	Spesifik aktivite (U/mg protein	
	ph 6 ekstraktı	ph 9 ekstraktı
30	2.61	1.10
35	2.68	1.20
37	3.02	1.23
40	3.17	1.12
45	2.60	1.10
50	2.37	0.81
55	-	0,65



ŞEKİL: 3.5. Çörekotu Lipaz Enziminin Aktivitesinin Sıcaklık ile Değişimi.

Şekil 3.5'den, pH 6 fosfat tampon çözeltisi ile elde edilmiş lipaz enziminin optimum sıcaklığının 40°C olduğu ve sıcaklığın yükselmesi ile hızlı bir aktivite kaybı gösterdiği anlaşılmaktadır. pH 9 fosfat tampon çözelti ile ekstrakte edilmiş lipaz enziminde ise bariz bir optimum sıcaklık gözlenmemektedir. 30-50 °C arasında aktivite göstermektedir. 50°C'den sonra aktivite kaybı başlamaktadır.

3.7. Çörekotu Lipaz Ekstraktlarından Lipaz Enziminin İzolasyonu ve Saflaştırılması.

Fosfat tampon çözeltileri ile farklı pH'larda ekstrakte edilmiş lipaz enzimlerinin çözeltiden izolasyonu ve bu işlem esnasında saflaştırılması amacıyla, elde edilen lipaz ekstraktlarından lipaz enzimlerinin çöktürülmesinde iki farklı yöntem uygulanmıştır. Asetonla çöktürme ve amonyum sülfat ile fraksiyonla yöntemine göre çöktürülen proteinlerden, özellikle asidik lipaz enzimi ekstrakte etmek için, elde edilen çökelekler fosfat (pH 6) çözeltisi ile tekrar ekstrakte edilmişlerdir.

Asetonla çöktürme yöntemine göre lipaz enziminin kısmen saflaştırılması sürecinde, alınmış deneysel sonuçlar Tablo 3.11'de topluca verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, her lipaz ekstraktında enzimin saflaştırılabildiği, saflaştırma yüzdesinin ekstraktın içerdiği protein fraksiyonlarının cinsine bağlı olarak % 230-330 arasında değişim gösterdiği anlaşılmaktadır. En yüksek oranda saflaştırma, pH 7 tampon çözelti ile elde edilmiş lipaz ekstraktında görülmektedir. Aseton çökeleklerinin tekrar ekstraksiyonunda eğer Tris-HCl (pH 6) tampon çözeltisi kullanılsa idi, bu durumda 4 kat saflaştırma elde edilebilecektir.

pH 6 fosfat tampon çözeltisi ile çörekotu tohumlarından elde edilmiş lipaz ekstraktına, Amonyum sülfat fraksiyonlaması uygulanmış ve alınan sonuçlar Tablo 3.12'de gösterilmiştir. Amonyum sülfat ile daha seçimli olarak protein çöktürülmesi gerçekleştirilmiştir. %30 amonyum sülfat doygunluk derecesinde çöktürülen protein miktarı az olduğundan analiz edilememiştir. % 60-80 amonyum sülfat doygunluk derecesinde çöktürülmüş proteinlerin lipaz enzim içeriği, % 30-60 doygunluk derecesinde çöktürülmüş proteinlere göre daha yüksektir. Tris-HCl tampon çözeltisinin lipaz enzimi içeren proteinleri fosfat tamponuna nazaran daha iyi çözebildiği sonuçlardan açıkça anlaşılmaktadır. Tris-HCl ile lipaz enziminin aktivitesinde orijinal ekstraktın aktivitesine oranla, 16 kat artış sağlanabilmiştir.

Lipaz enziminin saflaştırılmasında uygulanmış iki yöntemin karşılaştırılmasından, lipaz saflaştırılmasında amonyum sülfat ile fraksiyonlama yönteminin aseton ile çöktürme yöntemine göre daha iyi sonuçlar verdiği ortaya çıkarılmıştır.

TABLO: 3.10. Çörekotu Tohumlarından Fosfat Tampon Çözeltileri ile Elde Edilmiş Ekstraktlardan Lipaz Enziminin Aseton ile Çöktürülerek Saflaştırılması.

Lipaz Ekstraktının				Saflaştırılmış Lipaz Çözeltisinin		
pH'ı	Protein içeriği (mg/100 ml)	Spesifik aktivitesi (U/mg protein)	Aseton çökeleği (mg)	Protein içeriği (mg)	Spesifik aktivitesi (U/mg protein)	Lipaz enzimin saflaştırılması (kat)
5	1513	0.48	677	341	1,29	2.69
6	1177	0.64	1131	727	1.85	2.89
7	1161	0.6	1374	883	1.97	3.28
8	2315	0.35	1672	583	1.13	3.23
9	2832	0.30	1718	750	0.72	2.40
10	2701	0.14	2097	680	0.32	2.29

TABLO: 3.11 Çörekotu Tohumlarından Fosfat (pH6) Tampon Çözeltisi ile Elde Edilmiş Ekstraktan, Lipaz Enziminin Amonyum Sülfat ile Çöktürülerek Saflaştırılması. (Ekstraktın Protein İçeriği, 1177 mg/100 ml; Spesifik Aktivitesi 0,64 U/mg Protein'dir).

Amonyum sülfat doygunluk derecesi	Çökelek miktarı (ms)	Saflaştırılmış lipaz çözeltileri					
		Fosfat (pH 6) çözeltisi			Tris-HCl (pH 6) çözeltisi		
		Protein içeriği (mg)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Lipaz saflaşması (kat)	Protein içeriği (mg)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Lipaz Saflaşması (kat)
% 30	61	-	-	-	-	-	-
% 30-60	1364	1278	3.72	5.81	983	4.66	7.28
% 60-80	576	397	4.90	7.66	350	10.71	16.73

BÖLÜM 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın birinci bölümünde Denizli yöresi çörekotu tohumlarının kimyasal bileşimi saptanmıştır.

Türkiye kökenli çörekotu tohumlarının, Tablo 3.1'de verilen bileşimi incelendiğinde, tohumların %23 protein ve %35 yağ içeriği ile protein ve yağ açısından zengin olduğu görülmektedir. Bu çalışmada, Lipaz kaynağı olarak kullanılabileceği gösterilen çörekotu tohumları protein ve yağ üretiminde de potansiyel bir kaynaktır.

Bu çalışmada, çörekotu tohumlarından fosfat ve Tris-HCl tampon çözeltileri ile lipaz enziminin elde edilebileceği gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre, tohum proteinlerinin ancak %20'si ekstrakte olmuştur. Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalında, yürütülmüş diğer bir çalışmada, lipaz enziminin konsantre bulunduğu albumin ve globulin proteinlerinin çörekotu proteinlerinin %50'sini teşkil ettiği belirlenmiştir. Ekstraksiyonun blender yerine homojenizatörde yapılması durumunda ve tek kademeli ekstraksiyon yerine çok kademeli ekstraksiyon uygulanmasıyla, tampon çözeltiler ile tohumlardan protein ekstraksiyonunda verimin %40-50 seviyesine yükseltilmesi mümkün olabilecektir.

Literatüre göre, tahıl taneleri ve bitkisel tohumlarda alkali lipaz bulunmakta ve bu lipaz çimlenme esnasında aktivite kazanmaktadır. Sadece ayçiçek ve hint tohumları ile çimlenmiş mısır tohumu sürgünlerinde, alkali lipaz yanında asit lipazın mevcudiyeti belirlenmiştir. Ayçiçek ve mısır köklerinde bulunan asit lipazlar, aktivite açısından alkali lipazlarının yarısı kadar aktivite gösterirken, istisna olarak hint tohumu asit lipazı alkali lipazının iki katı aktivitededir. Çalışmamızda, çörekotu tohumlarından pH 6 fosfat tamponu ile elde edilmiş lipaz ekstraktında, asit ve alkali lipazların birlikte bulunduğu ve özellikle asit lipazın aktivitesinin alkali lipaz aktivitesinin 2, 5 katı olduğu saptanmıştır. Bu bulgunun literatür açısından önemli bir değer taşıdığı kanısındayız.

Bu çalışmada elde edilen lipaz ekstraktlarının depolanma stabilitelerinin düşük olmasından dolayı, ekstraktların biyoteknolojik uygulamaları incelenememiştir. Bu çalışmanın devamında önerimiz, lipaz enziminin , immobilize edilerek stabilite kazandırılması ve endüstriyel uygulamalarının araştırılması üzerinde çalışmaların sürdürülmesi yönündedir.



KAYNAKLAR

- [1] MALCATA, F.X. "Engineering of/With Lipases, Scope and Strategies", Engineering of/With Lipases, ed. F.X.Malcata, Kluwer Academic Publishers, Netherland, S.1-16, (1996).
- [2] GALLIARD, T."Degradation of Acyl Lipids: Hydrolytic And Oxidative Enzymes." In The Biochemistry of Plants, P.K. Stumpf ve E.E. Conn, Vol. 4, Academic Press, New York, S.85-116, (1980).
- [3] LINFIELD, W.M., BARAUSKAS, R.A., SIVIERI, L., SEROTA, S.,Stevenson, R.W.,"Enzymatic Fat Hydrolysis And Synthesis", J.Am. Oil Chem. Soc., 61, 191-195, (1984).
- [4] LINFIELD,W.M., O'BRIEN, D.J., SEROTA, S., BARAUSKAS,R.A., "Lipid-Lipase Interactions. I. Fat Splitting", J.Am. Oil Chem. Soc., 61, 1067-1071, (1981).
- [5] FU,X., ZHU, X., GAO, K., DUAN, J., "Oil And Fat Hydrolysis with Lipase From Aspergillus sp.", J.Am. Oil Chem. Soc. 72, 527-531, (1995).
- [6] MC NEILL, G.P., SHIMIZU, S., YAMANE, T., "Solid PHASE Enzymatic Glycerolysis of Beef Tallow Resulting in a High Yield of Monoglyceride",J.Am. Oil Chem. Soc., 67, 779-783, (1990).
- [7] RATTRAY, J.B.M., "Biotechnology And The Fats And Oils Industry, An Overview", J.Am. Oil Chem. Soc., 61, 1701-1712, (1984).
- [8] PECNIK, S., KNEZ, Z., "Enzymatic Fatty Ester Synthesis", J.Am. Oil Chem. Soc., 69, 261-65, (1992).
- [9] FOGLIA, T.A., PETRUSO, K., FEAIRHELLER, S.H., "Enzymatic Interesterification of Tallow-Sunflower Oil Mixtures", J.Am. Oil Chem. Soc., 70,281-5, (1993).
- [10] MITTELBAACH, M., "Lipase Catalyzed Alcoholysis of Sunflower Oil", J.Am. Oil Chem. Soc., 67, 168-170, (1990).
- [11] MACRAE, A.R., HAMMOND, R.C., "Present and Future Application of Lipases", Biotechnol. Gen. Eng. Rev., 3, 193-217, (1985).
- [12] KURASHIGE., J.,MATSUZAKI, N., MAKABE, K. "Modification of Fats and Oils by Lipases", J.Dispersion Sci. Tech. 10, 531-559, (1989).

- [13] BJORKLING, F., GODFREDSEN, S.E., KIRK, O., "The Future Impact of Industrial Lipases", TIBTECH, 9, 360-363, (1991).
- [14] MALCATA, F.X., REYES, H.R., GARCÍA, M.S., HILL, C.G., "Immobilized LIPASE Reactors for Modification of Fats and Oils-A Review", J.Am.Oil Chem. Soc., 67, 890-910, (1990).
- [15] NOVO-NORDISK, A/S, "Industrial Applications of Lipase Enzymes", Technical Bulletin, (1996).
- [16] HOLMBERG, K., ÖSTERBERG, E., "Microemulsions as VEHICLES for Lipase Catalyzed Reactions", Progr. Colloid Golym. Sci, 82, 181-189, (1990).
- [17] ÖSTERBERG, E., BLOMSTROM, A.C., HOLMBERG, K., "Lipase Catalyzed Transesterification of Unsaturated Lipids in a Microemulsion", J.Am. Oil Chem. Soc., 66, 1330-1333, (1989).
- [18] GOH, S.H., YEONG, S.K., WANG, C.W. "Transesterification of Cocoa Butter by Fungal Lipases: Effect of Solvent on 1,3-Specificity", J.Am. Oil Chem. Soc., 70, 567-570. (1993).
- [19] GUTMAN, A.L., SHAPIRA, M. "Synthetic Applications of Enzymatic Reactions in Organic Solvents", Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Vol. 52, ed. A. Fiechter, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, S.89-128, (1995).
- [20] JENSEN, R.G., GALLUZZO, D.R., BUSH, V.J., "Selectivity is a important Characteristics of Lipases", Biocatalysts, 3, 307-316, (1990).
- [21] MUKHERJEE, K.D., KIEWITT, I., HILLS, M.J., "Substrate Specificities of Kinetic Resolution of Unsaturated Fatty Acids", App. Microbiol. Biotechnol. 40, 489-493, (1993).
- [22] ERGAN, F., LAMARE, S., TRANI, M, "Lipase Specificity Against Some Fatty Acids", Ann. N.Y. Acad. Sci., 672, 37-44, (1992).
- [23] PEDERSON, S.B., HOLMER, G., "Studies of The Fatty Acid Specificity of Lipase From Rhizomucor Miehei Toward 20:1, 20:5, 22:1, and 22:6", J.Am. Oil Chem. Soc. 72, 239-243, (1995).
- [24] HARALDSSON, G.G., ALMARSSON, Ö., "Studies The Positional Specificity Of Lipase From Mucor Miehei During Interesterification Reactions of Cod Liver Oil With n-3 Polyunsaturated Fatty Acids", Acta Chem. Scand. 45, 723-730, (1991).

- [25] SUGIHARA, A., SHIMADA, Y., NAKAMURA, M., NAGAO, T., TOMINAGA, Y., "Positional and Fatty Acid Specificities of *Geotrichum Candidum* Lipases", *Protein Eng.* 7, 585-88, (1994).
- [26] ROGALSKA, E., RANSAC, S., VERGER, R., "Stereoselectivity of Lipases. II. Stereoselective Hydrolysis of Triglycerides by Gastric and Pancreatic Lipases", *J.Biol. Chem.* 265, 20271-20276, (1990).
- [27] ROGELAKA, E., CUDREY, C., FERRATO, F., VERGER, R., "Stereoselective Hydrolysis of Triglycerides by Animal and Microbial Lipases", *Chirality*, 5, 24-30, (1993).
- [28] GU, Q. M., SIH, C.J., "Improving the Enantioselectivity of the *Candida Cylindracea* Lipase via Chemical Modification", *Biocatalyst*, 6, 115-126, (1992).
- [29] ARER, G., "Türkiye Kökenli Hamsi Yağından Enzimatik Hidroliz Yöntemi ile n-3 Polidoymamış Yağ Asitlerinin Konsantrre Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, (1995).
- [30] ÜSTÜN, G., GÜNER, S., ARER, G., TÜRKAY, S., ERCİYES, A.T., "Enzymatic Hydrolysis of Anchovy Oil: Production of Glycerides Enriched in Polyunsaturated Fatty Acids", *App. Biochem. Biotechnol.* (1997), (Baskıda).
- [31] LANGHOLZ, P., ANDERSEN, P., FORSKOV, T., SCHMIDTSDORFF, W., "Application of a Specificity of *Mucor Miehei* Lipase to Concentrate Docosahexaenoic Acid", *J.Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 1120-3, (1989).
- [32] TANAKA, Y., TADASHLI, F., Hirono, J., HASHIZUME, R. "Triglyceride SPECIFICITY Of *Candida Cylindracea* Lipase: Effect Of Docosahexaenoic Acid on Resistance Of Triglyceride To Lipase", *J.Am. Oil Chem. Soc.* 70, 1031-4, (1993).
- [33] MAEHR, H., ZENCHOFF, G., COFFEN, D.L. "Enzymic Enhancement of n-3 Fatty Acid Content in Fish Oils", *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 463-7, (1994).
- [34] HORROBIN, D.F., "Nutritional and Medical Importance of γ -linolenic Acid", *Prog. Lipid Res.* 31, 163-194, (1992).
- [35] MUKHERJEE, K.D., KIEWITT, I., "Enrichment of γ -linolenic acid from Fungal Oil by Lipase Catalyzed Reactions", *Appl. Microbial. Biotechnol* 35, 579-584, (1991).

- [36] SYED RAHMATULLAH, M.S.K., SHUKLA, V.K.S., Mukherjee, K.D.,
"γ-linolenic Concentrates From Borage and Evening
Primrose Oil Fatty Acids via Lipase-Catalyzed Esterification",
J.Am. Oil Chem Soc. 71, 563-567, (1994).
- [37] SINISTERRA, J.V., "Synthesis of Chiral drugs Using Lipases", Engineering
of/with Lipases, ed. F.X. Malcata, Kluwer Academic
Publishers, Netherland, S.73-101, (1996).
- [38] CENGİZ, S., CENGİZ, M., "Tıp ve Fen Bilimleri Öğrencileri İçin Enzim
Bilgisi", Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, İstanbul,
(1994)
- [39] SCOPES, R.K., Protein Purification, Principles And Practice, Springer-Verlag,
New York, (1982).
- [40] COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O., Methods in Enzymology, Vol. 1,
Academic Press, New York, (1955).
- [41] SINGER, T.P., Hofstee, B.H.J., "Studies on Wheat Germ Lipase", Arch.
Biochem. 18, 229-244, (1948).
- [42] DRAPRON, R., ANH, N.G.X., LAUNAY, B., GUILBOT, A. "Development
And Distribution of Wheat Lipase Activity During the
Course of Germination", Cereal Chem. 46, 647-655, (1969).
- [43] TAVENER, R.J.A., LAIDMAN, D.L., The Induction of Lipase Activity in The
Germinating Wheat Grain, Phytochemistry, 11, 989-997,
(1972).
- [44] LASZTITY, R., The Chemistry of Cereal Proteins, 2.Baskı, CRC Press,
New York, (1996).
- [45] MARTN, H.F., PEERS, F., Oat Lipases, Biochem. J., 55, 523-529, (1953).
- [46] URQUHART, A.A., ALTOSAAR, I., MATLASHEWSKI,
G.J.,SAHASRABUDME, M.R.,"Localization of Lipase
Activity in Oat Grains and Millet Oat Fractions", Cereal
Chem., 60, 181-5, (1983).
- [47] EKSTRAND, B., GANGBY., T., AKESSON, G. "Lipase Activity in Oats-
Distribution, pH Dependence, and Heat Inactivation", Cereal
Chem., 69, 373-5, (1992).
- [48] MATLASHEWSKI, G.J., URGUHART, A.A., SAHASRABUDME, M.R., SZ
ALTOSAAR, J.,"Lipase Activity in Oat Flour Suspensions and
Soluble Extracts", Cereal Chem., 59, 418-21, (1982).

- [49] YOUNGS, U.L., PETERSON, D.M., "Oat Lipids and Lipid Related Enzymes", Oats: Chemistry And Technology, Webster, F.R. (editör), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, 1986.
- [50] EKSTRAND, G., GANGBY, I., AKESON, G., STÖLLMAN, U., LINGNERTH, H., DAHL, S., "Lipase Activity and Development of Rancidity in Oats and Oat Products Related To Heat Treatment During Processing", J.Cereal Sci., 17, 247-255, (1993).
- [51] LUKKONEN, K., KAUKOVIRTA, A., LAAKSO, S. "Elimination of Lipid hydrolysis in Aqueous Suspensions of Oat Flour", J.Cereol Sci, 17, 255-9, (1993).
- [52] LEE, I., HAMMOND, E.G., "Oat (*Avena Sativa*) Caryopses as a Natural Lipase Bioreactor", J.Am. Oil Chem. Soc. 67, 761-5, (1990).
- [53] PIAZZA, G.J., FARRELL, H.M., "Generation of Ricinoleic Acid from Castor Oil Using the Lipase From Ground Oat (*Avena Sativa* L) Seeds As a Catalyst", Biotechnology Letters, 13, 179-184, (1991).
- [54] BORGSTROM, B., BROCKMAN, H.L., Lipases, Elsevier, Amsterdam, s. 423, (1984).
- [55] AMON, T., AKHTAR, M.W., JAMSHAD, F. "Isolation and Characterization of Zea Mays (*Neelum*) Root Alkaline Lipase", Sci. Int. (Lahore), 1, 192-195, (1989).
- [56] FUNATSU, M., AIZONO, Y., HAYASHI, K., WATANABE, M., ETO, M., "Biochemical Studies on Rice Bran Lipase, Part I. Purification and Physical Properties", Agr. Biol. Chem., 35, 734-742, (1971).
- [57] AIZONO, M., FUNATSU, M., HAYASHI, K., INAMASU, M., YAMAGUCHI, M., "Biochemical Studies on Rice Bran Lipase: Chemical Properties", Agr. Biol. Chem., 35, 1973-9, (1971).
- [58] AIZONO, Y., FUNATSU, M., SUGANO, M., HAYASHI, K., FUJIKI, Y., "Enzymatic Properties of Rice Bran Lipase", Agr. Biol. Chem., 37, 2031-36, (1973).
- [59] AIZONO, Y., FUNATZU, M., FUJIKI, Y., WATANASE, M., "Purification and Characterization of Rice Bran Lipase II", Agr. Biol. Chem. 40, 317-324, (1976).

- [60] ORY, R.L., ST. ANGELO, A.J., ALTSCHUL, A.M., "Castor Bean Lipase: Action on its Endogenous Substrate", J. Lipid Res. 1, 208-213, (1960).
- [61] ORY, R.L., ST. ANGELO, A.J., ALTSCHUL, A.M., "The Acid Lipase of the Castor Bean. Properties and Substrate Specificity", J.Lipid Research, 3, 99-105, (1962).
- [62] ORY, R.L., YATSU, L.Y., KIRCHER, H.W., "Association of Lipase Activity with Spherosomes of Ricinus Communis", Arch. Biochem. Biophys. 264, 255-264, (1968).
- [63] ORY, R.L., "Acid Lipase of The Castor Bean", Lipids, 4, 177-185, (1969).
- [64] MUTO, S., BEEVERS, H., "Lipase Activities in Castor Bean Endosperm During Germination", Plant Physiol. 54, 23-28, (1974).
- [65] MARRIOTT, K.M., NORTCOTE, D.H., "Induction of Enzyme Activity in Endosperm of Germinating Castor-bean Seeds", Biochem. J., 152, 65-70, (1975).
- [66] ANANEVA, O.N., RUDYUK, V.F., "Study of Certain Properties of Lipases From Castor-bean Plant (Ricinus Communis) and Sunflower (Helianthus Annuus) Seeds", Prikl. Biokhim. Mikrobial. 14, 32-7, (1978).
- [67] CHAND, S., SRINIVASULU, C., MAHAPTRA, S.N. "Enzymatic Hydrolysis of Oils and Fats Using Castor Seeds as a Source of Lipase", Oils Oilseeds J., 26, 17-19, (1974).
- [68] RAO, K.V.S., PAULOSE, M.M., "A Process For Splitting of Castor Oil at Ambient Temperature Using Homogenised Castor Seed as Lipase Source" Res. Ind., 37, 36-37, (1992).
- [69] BOR, T., ERİM, M., TÜRKAY, S., "Hydrolysis Of Vegetable Oils by Lipase From Castor Oil Seeds", Proceeding of The 5 th National Chemistry And Chemical Engineering Congress, Hacettepe University, Ankara, S. 162-163, (1988).
- [70] TÜRKAY, S., GÜNER, S., ÜSTÜN, G., ERCİYES, T., "Farklı Yapıdaki Trigliserid Yağların Enzimatik Hidroliz Kinetiğinin İncelenmesi", 1.Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Ankara, S.9, (1994).
- [71] AKOVA, A., KILDIRAN, G., TÜRKAY, S., ÜSTÜN, G., "İmmobilize Hint Tohumu Lipazının Hidroliz Aktivitesi", II.Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, İstanbul, S. 1022-1027, (1996).

- [72] TÜTER, M., TÜRKAY, S., ERCİYES, A.T., "Hint Tohumu Lipazının Esterleşme Reaksiyonlarındaki Katalitik Etkisi Üzerine Bir İnceleme", I.Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Ankara, S. 80, (1994).
- [73] TÜTER, M., "Gliserin-Oleik Asit Esterleşme Reaksiyonunda Hint Tohumu Lipazının Katalitik Etkisinin Geliştirilmesi Üzerine Bir İnceleme", II.Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, İstanbul, S.1012-1015, (1996).
- [74] TÜTER, M., "An Investigation on the Developping of the Lipase Activity of Castor Bean in Esterification Reactions", J.Am. Oil. Chem. Soc., (Baskıda) (1997).
- [75] HUANG, A.H.C., MOREAU, R.A., "Lipases in the Storage Tissues of Peanut and Other Oil Seeds During Germination", Planta, 141, 111-16, (1978).
- [76] OLNEY, C.E., JENSEN, R.G., SAMPUGNA, J., QUINN, J.G., "The Purification and Spesificity of a Lipase from Vernonia Anthelmintica Seed", Lipids, 3, 498-502,(1968).
- [77] THEIER, R.R., Rosnitschek, I., "Development and Intracellular Location of Lipase Activity in Rapeseed (Brassica Napus L) Cotyledons", Planta, 139, 249-256, (1978).
- [78] LİN, Y.H., HUANG, A.H.C., "Lipase in Lipid Bodies of Cotyledons of Rape And Mustard Seedlings", Arch. Biochem. Biophys., 225, 360-369, (1983).
- [79] HASSANIEN, F.R., MUKHERJEE, K.D., "Isolation of Lipase from Germinating Oilseeds For Biotechnological Processes", J.Am. Oil Chem. Soc. 63, 893-7, (1986).
- [80] HILLS, M.J., KIEWITT, I., MUKHERJEE, K.D., "Lipase From Brassica Napus L. Discriminetes against cis-4 and cis-6 Unsaturated Fatty Acids and Secondary and Tertiary Alcohols", Biochim. Biophys. Acta, 1042, 237-240, (1990).
- [81] HILLS, M.J., KIEWITT, I., MUKHERJEE, K.D., "Enzymatic Fractionation of Evening Primrose Oil by Rape Lipase: Enrichment of - γ linolenic acid", Biotechnol. Lett. 11, 629-632, (1989).
- [82] HILLS, M.J., KIEWITT, I., MUKHERJEE K.D., " Esterification Reactions Catalysed by Immabilized Lipase From Oilseed Rape (Brassica Napus L)", Biochem. Soc. Transackons, 17, 478, (1989).

- [83] JACHMANIAN, I., MUKHERJEE, K.D., "Esterification and Interesterification Reactions Catalyzed by Acetone Powder from Germinating Rapeseed", J. Am. Oil Chem. Soc., 73, 1527-1532, (1996).
- [84] KORCHAGINA, L.N., RUDYUK, V.F., CHERNOEI, V.T., "Lipase Activity of Seceds and Vegetative Organs of Several Plants", Rast. Resur., 9, 577-81 (1973).
- [85] ÜSTÜN, G., TÜRKAY, S., KARAALI, A., "Nigella Sativa Sceds: A Potential Source for Oil and Oleochemicals", World Conference and Exhibition on Oilseed and Edible Oils Processing, Inform, 7, 951-2, İstanbul, (1996).
- [86] NERGİZ, C., ÖTLEŞ, Ş., "Chemical Composition of Nigella Sativa L Seeds", Food Chem. 48, 259-261, (1993).
- [87] BABAYAN, V.K., KOOTTUNGAL, D., HALABY, G.A., "Proximate Analysis, Fatty Acid And Amino Acid Composition of Nigella Sativa L Seeds", J.Food Sci, 43, 1314-15, (1978).
- [88] ALTSCHULL, A.M., WILCKE, H.L., New Protein Foods, Vol. 5, Academic Press, Inc., Orlando, (1985).
- [89] ÜSTÜN, G., KENT, L., ÇEKİN, N., CİVELEKOĞLU, H., "Investigation of the Technological Properties of Nigella Sativa (Black Cumin) Seed Oil", J.Am. Oil Chem. Soc., 67, 958-60, (1990).
- [90] KILDIRAN, G., KAYTAN, S., ŞENGÜL, E., ÜSTÜN, G., TÜRKAY, S., "Antioxidant Activity of Nigella Sativa Seed Extract", 36 th IUPAC Congress, Geneva, (1997).
- [91] DANDIK, L., AKSOY, H.A., "Çörekotu Yağının Hidrolizlenmesi Üzerine Bir İnceleme", VIII. Ulusal Kimya ve Kimya Müh. Sempozyumu, 107,110, (1992).
- [92] DANDIK, 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, 1239-41, (1992).
- [93] KILDIRAN, G., ÖZGÜL-YÜCEL, S., ÜSTÜN, G., TÜRKAY, S., "Yağlı Tohum ve Küspelerin Lipolitik Hidrolize Karşı Etanol ile Stabilizasyonu", II. Gıda Mühendisliği Ulusal Sempozyumu, 153-158, Ankara, (1995).
- [94] DANDIK, L., ARIOĞLU, G., AKSOY, H.A., "EnzymaticA Tic Hydrolysis of Used Frying Oil By Native Lipose", App. Biochem. Biotechnol., 42, 119-126, (1993).

- [95] DANDİK, L., AKSOY, H.A., "Application of Nigella Sativa Seed Lipase in Oleochemical Reactions", *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 277-281, (1996).
- [96] MERT, S., DANDİK, L., AKSOY, H.A., "Production of Glycerides from Glycerol and Fatty Acids by Native Lipase of Nigella Sativa Seeds", *App. Biochem. Biotechnol.*, 50, 333-342, (1995).
- [97] EL, N., DANDİK, L., AKSOY, H.A., "Nigella Sativa (Çörekotu) Tohumu Aseton Tozunun Enzimatik Gliseroliz Reaksiyonunda Kullanımı", *II. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi*, s.1001-1006 İstanbul, (1996).
- [98] AOCS Analiz Yöntemleri, Official Methods and Recommended Practices of The American Oil Chemists' Soc., 2.Baskı, (1972).
- [99] GORNALL, A.C., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M., "Determination of Serum Proteins by Means of The Biuret Reaction", *J.Biol. Chem.* 177, 751-766, (1949).
- [100] CHAPLIN, M, F., BUCKE, C., *Enzyme Technology*, Cambridge University Press, Cambridge, s.16, (1990).

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Sivas'ta doğdu. İlköğrenimini Baruthane İlkokulunda, orta öğrenimini Şişli Kaptanpaşa Lisesinde tamamladı. İTÜ Kimya-Metalurji Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü'nde öğrenimine başladı. 1993 yılında mezun oldu. 1993 yılında, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Programında yüksek lisans çalışmasına başlamıştır.

