

Boraj yağının enzimatik hidrolizi ile gamma-linolenik asit zenginleştirilmesi

Aylin AKOVA, Güldem ÜSTÜN*

İTÜ Kimya Metalurji Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 80626, Maslak, İstanbul

Özet

Lipaz enzimleri deterjan sanayiinde, süt, ilaç, meyve suyu, tekstil, yağ ve margarin endüstrisinde, yem sanayiinde kimyasal maddelerin üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada; boraj yağından gamma-linolenik asit (GLA)'ce zengin ürünler elde edebilmek amacıyla, boraj yağının immobilize ve serbest çörekotu lipazı ile hidrolizi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Hidroliz reaksiyonu serbest enzim varlığında fosfat tampon çözelti ortamında (pH 6), immobilize enzim varlığında ise, hekzan ortamında yürütülmüştür. Boraj yağının hekzan ortamında immobilize çörekotu enzimi ile 24 saat hidrolizi sonunda, % 50 verimle ve içerisinde % 38 gamma-linolenik asit bulunan, 1.73 kat GLA'ca zenginleşmiş gliserid karışımı elde edilebileceği ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Boraj yağı, immobilize lipaz, çörekotu tohumu.

Enrichment of gamma-linolenic acid by enzymatic hydrolysis of borage oil

Abstract

Lipases one of the most important classes of industrial enzymes, which are used in detergent, food, textile industry. Since most of the industrial applications carried out in aqueous medium, regaining of lipases from reaction medium without losing activity is impossible and controlling of the reaction is difficult. For this reason lipases are stabilized by immobilization. Lipases immobilized in the presence of hexane showed high thermal stability and activation energy with respect to native enzyme. On the other hand K_m and V_m constants of lipases decreases slightly after immobilization. *Nigella sativa* seed lipase both free and immobilized form shown specificity, oils contains saturated fatty acids showed negative specificity to oils containing polyunsaturated fatty acids. Fatty acid specificity did not change after immobilization. Borage oil, containing % 23 γ -linolenic acid, was used to determine fatty acid specificity of free and immobilized lipase. In this study borage oil was hydrolysed in the presence of free lipase and immobilized lipase to obtain gamma-linolenic enriched products. Hydrolysis reaction was carried out in phosphate medium the presence of free lipase on the other hand, reaction was carried out in hexane medium in the presence of immobilized lipase. It was found that, free and immobilized lipase showed negative specificity to gamma linolenic acid and γ -linolenic acid was enriched in unhydrolyzed TG fraction to % 38.

Keywords: Borage oil, immobilized lipase, *nigella sativa* seeds.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Güldem Üstün. ustung@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 68 56.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Kimya Metalurji Fakültesi'nde tamamlanmış "Çörekotu lipaz enziminin immobilizasyonu ve teknolojik uygulamaları" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 17.05.2002 tarihinde dergiye ulaşmış, 20.05.2002 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 31.12.2002 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Giriş

Günümüzde γ -linolenik asitin (GLA) besin ve tıbbi açıdan değerinin anlaşılması; bu asitin kaynaklarından saflaştırılması, zenginleştirilmesi üzerine olan çalışmaları hızlandırmıştır. Bu amaçla; GLA içeren yağlara, değişik yöntemler uygulanarak GLA'ca zengin ürünler elde edilmeye çalışılmaktadır. Uygulanan yöntemlere örnek olarak; üre fraksiyonlaması [Traitler v. diğ., 1988, Hayes v. diğ., 2000], Y-zeolitleri (Arai v. diğ., 1987) veya silikajel (Hayashi v. diğ., 1993) üzerinde ayrılma, yağ venterizasyonu (Yokochi v. diğ., 1990) ve enzimatik reaksiyonlar sayılabilir. Bunlar arasında en iyi sonuçlar alınan ve endüstriyel üretimde de ümit vadeden yöntem, enzimatik yolla zenginleştirmedir. Bu yöntemde; yağlar lipaz enzimi katalizörülüğünde seçimli hidroliz, seçimli esterleşme veya alkoliz reaksiyonlarına tabi tutulmaktadır.

Rahmatullah ve arkadaşları (1994), *Candida cylindracea* lipazı kullanarak Evening primose ve Boraj tohum yağlarını hidroliz ettiklerinde, reaksiyon sonucunda hidroliz olmamış açilgliserollerde GLA zenginleşmesi olduğunu gözlemişlerdir. Evening primose tohum yağında başlangıçta %9.4 oranında mevcut olan GLA'nın hidroliz olmadan kalan TAG'lerde %46.5'e yükseldiğini; boraj yağının aynı koşullarda kısmi hidrolizinde ise başlangıçta Boraj yağında %20.4 oranında mevcut olan GLA'nın reaksiyon sonunda TAG'lerde %47.8 değerine eriştiğini belirlemişlerdir.

Foglia ve arkadaşları da (1995), benzer çalışmada, silikajel üzerine immobilize ve cis- δ -9 çift bağlı doymamış yağ asitlerine karşı seçiciliği bilinen *Geotrichum candidum* lipazı ile Boraj yağı yağ asitlerinin esterleştirilmesi üzerinde çalışmışlardır. Bu yolla, başlangıçta Boraj yağında %25 oranında GLA mevcut iken, esterleşme sonunda, esterleşmeden kalan yağ asitlerinde GLA miktarı %70 üzerine çıkartılmıştır. Elde edilen GLA'ca zengin karışımda, GLA yanında C-20 ve daha uzun zincirli mono-doymamış yağ asitlerinin bulunduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile, bu enzimin özellikle uzun zincirli yağ

asitlerine karşı seçicilik gösterdiği de ortaya koyulmuştur.

Schmitt ve arkadaşlarının yürüttükleri benzer esterleşme reaksiyonunda ise (Schmitt v. diğ., 1999), boraj yağı yağ asitlerinin bu kez immobilize *Candida rugosa* lipazı ile GLA'ca zenginleştirilmesi incelenmiştir. Bu çalışmada; *Candida rugosa* lipazının Amberlit IRC50, IRA35 ve IRA93 ve Duolit A7, A368 ve A568 iyon değiştirici reçineleri üzerine immobilizasyonları yapılmış ve immobilizasyonda kullanılan taşıyıcı-cının lipaz enziminin seçiciliğine olan etkisi de araştırılmıştır. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde; taşıyıcının enzim seçiciliğini bir miktar değiştirdiği ancak her bir immobilize enzim örneğinin kesinlikle GLA'ya negatif seçicilik gösterdiği belirlenmiştir. Esterleşme reaksiyonu sonunda ortamdaki palmitik, stearik, oleik ve linoleik asitlerinin kolaylıkla esterleşmiş olduğu ve esterleşmemiş yağ asitleri fraksiyonun da GLA'nın orijinal yağa göre 3 katı kadar konsantre hale gelmiş olduğu tespit edilmiştir.

Aggelis ve çalışma grubu, direkt olarak boraj yağı metil esterlerinin anyon değiştirici reçine üzerine immobilize edilmiş *Mucor miehei* lipazı ile hidrolizinde de gamma-linolenik asitin zor hidrolize olduğunu ve hidroliz olmayan ester fraksiyonunda bu asitin derişikleştirdiğini göstermişlerdir (Aggelis v. diğ.).

GLA'ca zengin ürünlerin elde edilmesi üzerinde çalışan diğer bir çalışma grubu ise Shimada ve arkadaşlarıdır. Shimada ve arkadaşları, boraj yağından GLA konsantre edilmesinde immobilize *Rhizopus delemar* enziminin etkinliğini incelemişlerdir. Araştırmacılar önce boraj yağını *Candida rugosa* (Shimada v. diğ.) veya *Pseudomonas* sp. enzimi ile hidroliz ederek, içerisinde % 46 GLA bulunan yağ asitlerini elde ettikten sonra, bu asit fraksiyonunu, *Rhizopus delemar* enzimi kullanarak, lauril alkol ile esterleştirmişlerdir. Esterleştirme reaksiyonunu müteakiben, ürüne uyguladıkları distilasyon ve üre fraksiyonlaması gibi saflaştırma işlemleri sonucunda, % 98.6 GLA içerikli yağ asitleri ürününü elde edebilmişlerdir (Shimada v. diğ.).

Bu çalışmalarda; ticari mikrobiyal lipazlar denenmiş olup, bitkisel lipazlar kullanılarak GLA derişikleştirilmesi üzerine literatürde çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Sadece çimlenmiş Rapiska (Hills v.diğ., 1989; Jachmanian v. diğ., 1995) ve Vernonia (Adlercreutz v. diğ., 1997) tohumlarından elde edilmiş lipazların GLA seçiciliği gösterdiği tespit edilmiştir.

İlk kez bu çalışmada, sistematik olarak hekzan/tampon çözelti ortamında hazırlanmış immobilize enzim ile serbest çörekotu lipazı katalizörlüğünde boraj yağının hidrolizi incelenmiştir. Bu çalışma sonrasında TÜBİTAK ile CNR (İtalya Ulusal Araştırma Kurumu) arasında yürütülen ve tamamlanan ortak projenin bir bölü-münde ise, amonyum sülfat ile çöktürülmüş ve DEAE-iyon değıştirici kolonunda kısmi saflaştırılmış çörekotu lipazının da boraj yağının gamma-linolenik asitce zenginleştirilmesinde kullanılabileceğı gösterilmiştir (Aksoy v. diğ., 2001).

Materyal ve yöntem

Bu çalışmada kullanılan çörekotu tohumları Denizli yöresine ait olup, İstanbul Mısır Çarşısı'ndan temin edilmiştir. Hidroliz reaksiyonlarında kullanılan Boraj yağı (Borage) ise Sigma Firması (Buchs, İsviçre) ndan temin edilmiştir. Lipaz enziminin immobilizasyonunda kullanılmış tüm kimyasal maddeler yine analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

Çörekotu tohumlarından lipaz enziminin ekstraksiyonu

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

Kabuksuz, sarı renkli tohumlar 1 litre hacmindeki blenderda (Braun, MX 82 Model, Frankfurt, Almanya) 4°C'de soğutulmuş, 200 mL 0.06 M fosfat tamponu (pH 7.2) içerisinde

homojeni-ze edilmiştir. Karıştırma, yüksek devirde toplam 20 dakika sürdürülmüş ve karıştırma esnasında sıcaklığın 25°C'yi geçmemesine dikkat edilmiştir. Elde edilen homojenat, katı partiküllerin uzaklaştırılması için iki katlı tülbentten süzümüştür.

Homojenat içerisinde dağılmış yağ partikülleri ile selüloz, lignin liflerinin ayrılması için, homojenat 13 000 g (10 000 devirde) 30 dakika santrifüjlenmiştir. Yüzeide toplanan kabuk şeklindeki yağlı katı tabaka, spatula ile dikkatlice alındıktan sonra çözelti bir kez daha tülbentten süzümüştür. Böylece elde edilen bu çözelti, çalışmamızda "Serbest Lipaz" olarak adlandırılmıştır.

Hekzan/tampon çözelti ortamında immobilize çörekotu enziminin hazırlanması

Hekzan/tampon çözelti ortamında immobilize enzim hazırlanmasında, önce enzim proteinlerinin selit üzerine adsorpsiyonu gerçekleştirilmiş daha sonra ortama soğuk hekzan ilave edilerek selit üzerine proteinlerin çökmesi de sağlanmıştır. Adsorpsiyon işlemi dijital sıcaklık kontrollü çalkalayıcı su banyosunda 25°C yürütülmüştür. Ağzı kapaklı 250 mL lik erlenlere, içerisinde daha önce belirlenmiş optimum protein konsantrasyonunda, 5.0 mg/mL (Akova v. diğ., 2000), 20 mL tamponlanmış lipaz çözeltileri ve 2'şer gram selit konulduktan sonra, erlenler karıştırıcıya yerleştirilmiş ve 2 saat boyunca çalkalanmıştır. Bu süre sonunda, erlenlere 20 mL soğutulmuş (0°C) hekzan ilave edilmiş, karışım soğukta 30 dakika daha karıştırılmıştır. Daha sonra bu süspansiyon filtre kağıdından süzümüştür. Elde edilen immobilize enzimler 3x20 mL soğutulmuş hekzan ile yıkandıktan sonra vakum desikatöründe 4 saat 25°C'de kurutulmuştur.

İmmobilize ve serbest lipaz enzimlerinin hidroliz aktivitelerinin belirlenmesi

Lipaz preparatlarının spesifik aktivitesi, 1 mg enzim proteini tarafından 1 dakika içerisinde trigliseridlerden açığa çıkarılan yağ asitlerinin μmol cinsinden miktarı olarak tarif edilmiştir.

Aktivite tayininde, trigliserid substratı olarak zeytinyağı (Riviera tipi) kullanılmıştır. 0.5 mL zeytinyağı, 0.5 mL 0.1 M CaCl₂ çözeltisi, 3 mL fosfat tampon çözeltisi (0.06 M; pH 7) ve 5 mL distile su karışımı önce, çalkalayıcı su banyosunda 10 dak. 37 °C de karıştırılmıştır. Böylece reaktanların sıcaklığı 37 °C' ye getirilmiştir. Daha sonra bu karışıma, 1mL serbest enzim (lipaz ekstraktı) veya immobilize enzim (400-500 mg) ilave edilmiş ve 20 dakika daha aynı sıcaklıkta karışım çalkalanmıştır. Süre sonunda, bu karışıma 20 mL aseton-etilalkol karışımı (1:1, hacmen) katılarak enzim inaktive edilmiş ve hidroliz reaksiyonu sonucu zeytinyağından açığa çıkan yağ asitlerinin miktarı 0.02 M NaOH ile timol-ftalein indikatörüne karşı pH 10 kadar titre edile-rek belirlenmiştir. Paralel olarak, aynı koşullarda şahit denemeler de yapılmıştır.

Boraj yağının serbest ve immobilize enzim ile hidroliz yöntemi

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

Hidroliz ürün bileşimlerinin TLC-FID Iatroscan cihazı ile belirlenmesi

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

0.1 gram numunenin 10 mL kloroform içindeki çözeltisinden alınan 1 μL 'lik örnek, rodlara enjekte edildikten sonra, rodlar içerisinde Petrol eteri (40–60°C) : Dietiler : Asetik asit (35:20:1, hacmen) çözücü karışımı bulunan küvetlerde 20 dakika tutulmuştur. 10 dakika havada, 10 dakika 110°C'lik etüvde kurutulan rodlar daha sonra cihaza yerleştirilmiş ve otomatik olarak daha önce saptanmış koşullarda taraması yapılmıştır (Üstün v. diğ., 1997).

Otomatik yazıcıdan elde edilen piklerin tanımlanması ve kantitatif değerlendirilmesi, standard TG (trigliserid), 1.3- DG (1.3-digliserid), 1.2-DG (1.2-digliserid), 1-MG (1-monogliserid), 2-MG (2-monogliserid), ve YA (serbest yağ asiti) karışımı kullanılarak yapılmıştır.

Hidroliz ürününün kolon kromatografisi ile fraksiyonlanması

Boraj yağının hidrolizinde elde edilen hidroliz ürününde hangi fraksiyonda γ -linolenik asitin zenginleştiğini belirlemek için, hidroliz ürünü kolon kromatografisi ile TG, DG ve MG fraksiyonlarına ayrılmıştır. Bu amaçla, (30x1.9 cm iç çapı) boyutlarındaki bir cam kolona, 25 gram Florisil (100-200 mesh; % 7 su içeren) hekzan ile karıştırıldıktan sonra kolona doldurulmuştur. Hassas olarak tartılan 1 gram numune, 10 mL hekzanda çözüldükten sonra kolona beslenmiş ve kolona TG fraksiyonunu elüye etmek için 200 mL hekzan:dietil eter (85:15, hacmen); DG fraksiyonunu ayırmak için 250 mL hekzan:dietil eter (50:50, hacmen) ve MG fraksiyonunu almak için 200 mL dietil eter sırayla beslenmiştir. Solvent beslemeleri dakikada 2 mL sabit hızda yapılmıştır. Kolondan alınan elüatlar 10'ar mL'lik porsiyonlar halinde toplanmış ve içerikleri TLC yöntemi ile kontrol edilmiştir. Silica-gel G (Merck) kaplanmış tabakalara toplanan her porsiyondan alınmış

örnekler tatbik edildikten sonra, tabakalar hekzan:dietil eter:asetik asit (70:30:1, hac-men) çözücü sisteminde develope edilmiştir. İyot buharları ortamında tabaka üzerinde ayrılmış TG, DG ve MG spotlarının belirlenmesi yapılmıştır. Toplanan tüm fraksiyonların TLC incelemesi yapıldıktan sonra saf TG, DG veya MG içeren fraksiyonlar birleştirilmiş, solventleri döner evaporatörde uçurulmuş ve böylece saf olarak gliserid bileşikleri elde edilmiştir.

Hidroliz ürününden yağ asitlerini ayırmak için, üründen alınmış diğer bir örnek hekzan içerisinde çözüldükten sonra 0.5 N NaOH ile titre edilmiş, sulu faz ayrılmış ve üzerine 0.5 N HCl ila-ve edilerek üründen ayrılan yağ asitleri tekrar serbest hale geçirilmiştir. Ortamdan eter ile ekstrakte edilmiş ve daha sonra eteri uçurulmuştur.

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

Hidroliz ürünü fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimlerinin gaz kromatografisi ile belirlenmesi

Elde edilen TG, DG, MG ve TA fraksiyonları BF₃ ile metil esterlerine dönüştürülüp, Hewlett-Packard 5890 Seri 2 (Hewlett-Packard, Waldron, Almanya) kapiler gaz kromatografi cihazında beslenmiş ve analiz edilmiştir.

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

DeneySEL çalışmalar

Hidroliz reaksiyonuna immobilizasyonun ve reaksiyon ortamının etkisini de tespit edebilmek amacıyla, iki seri hidroliz reaksiyonu yürütülmüştür. 1. seri deneylerde direkt serbest enzim kullanılmıştır. Bu çalışma yönteminde, 2 gram boraj yağına 55 ml lipaz ekstraktı (gram yağ başına

168 U serbest enzim) ilave edilmiş ve reaksiyon pH 6 tampon çözelti ortamında 40°C'de 77 saat sürdürülmüştür.

İmmobilize enzim kullanıldığı 2. seri deneylerde ise, reaksiyon ortamı olarak hekzan-su (50 ml hekzan-5 ml su) karışımı kullanılmıştır. Diğer bütün reaksiyon koşulları aynen sabit tutulmuştur.

Serbest enzim ve çözücü ortamında immobilize enzim ile yürütülmüş hidroliz reaksiyonlarında, önce reaksiyon esnasında 2, 4, 6, 8, 24, 48 ve 77 saat sonunda alınmış örneklerin bileşimleri, içerdiği TG (trigliserid), DG (digliserid), MG (monogliserid) ve YA (yağ asitleri) fraksiyonlarının miktarları, TLC-FID İatroscan cihazıyla belirlenmiştir. Daha sonra 8, 24 ve 77 saat sonunda her iki deney serisinde elde edilen hidroliz ürünlerinin kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılması sağlanmıştır. Böylece elde edilen her fraksiyonun da gaz kromatografisi ile yağ asitleri bileşimleri saptanmıştır.

Boraj yağının direkt çörekotu lipaz ekstraktı (serbest enzim) ve hekzan ortamında immobilize enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşimlerinin zamanla değişimi değerleri Tablo 1 ve

Tablo 2. Boraj yağının hekzan ortamında 168 U/g yağ immobilize enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi

Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
2	82.39	4.00	2.50	11.11
4	76.43	5.10	2.76	15.71
6	64.80	6.60	4.24	24.36
8	57.86	6.79	4.54	30.81
24	37.75	6.68	5.15	50.42
48	24.91	5.88	4.51	64.70
77	23.05	1.71	0.31	74.93

2'de verilmiştir.

Tablo 1 ve 2'nin incelenmesiyle, aynı 168 U/g yağ enzim miktarında serbest ve immobilize enzim kullanılması halinde dahi boraj yağının hidroliz reaksiyonunun farklı mekanizmalarına göre gerçekleşmiş olduğu anlaşılmıştır. Aradaki farkı daha iyi görebilmek için, her iki reaksiyonda elde edilmiş ürün bileşimlerinin zamanla değişimi aynı grafik üzerinde, Şekil 1'de gösterilmiştir.

Şekil 1'den, boraj yağının hidrolizinde ortamda hidrolizlenmeden kalan TG moleküllerinin zamanla değişim eğrilerinin her iki enzim ile hemen

Tablo 1. Boraj yağının sulu ortamda 168 U/g yağ serbest enzim ile hidrolizinde, hidroliz ürünü bileşiminin zamanla değişimi

Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
2	77.91	8.87	3.08	10.14
4	72.66	9.51	4.10	13.73
6	61.90	12.21	6.11	19.78
8	52.65	12.45	8.01	26.89
24	33.61	10.33	8.86	47.20
48	21.57	9.66	6.56	62.21
77	19.39	3.61	2.31	70.69

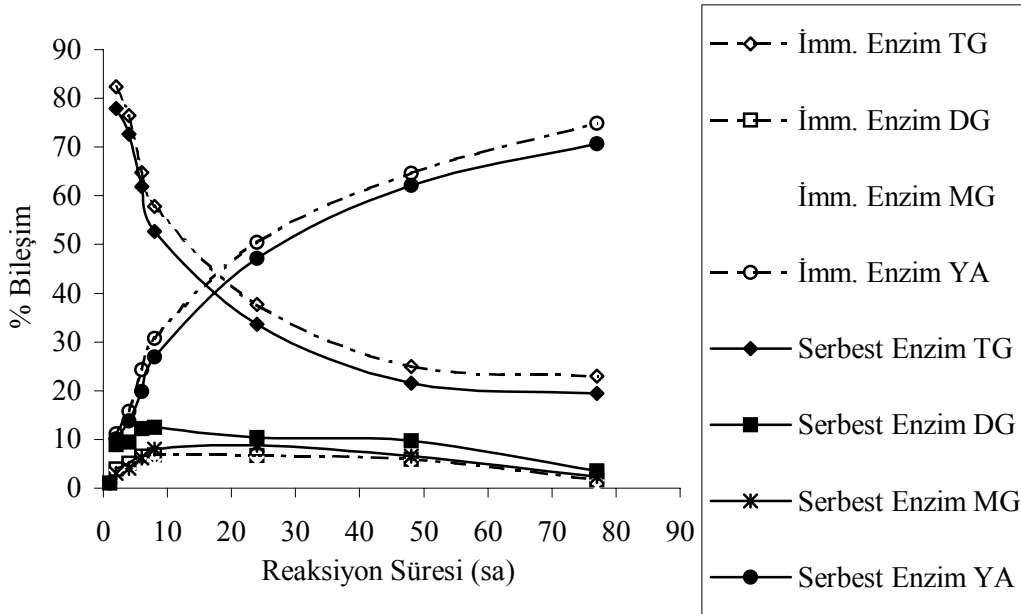
hemen aynı profili gösterdiği, ancak serbest

enzim ile reaksiyonun immobilize enzim örneğine göre daha hızlı gerçekleşmiş olduğu anlaşılmaktadır. Reaksiyon ilk 8 saatte oldukça hızlı gerçekleşmiştir. Hidroliz süresinin 8 saatten 48 saate uzatılmasıyla TG miktarında yaklaşık yarılanma olurken, sürenin 48 saatten 77 saate çıkarılmasıyla ise pratik olarak bileşimde değişiklik olmadığı gözlenmektedir.

DG ve MG fraksiyonları açısından Şekil 1 incelendiğinde ise, serbest enzimle elde edilmiş hidroliz ürününde bulunan DG ve MG miktarlarının aynı koşullarda immobilize enzimle elde edilmiş olan ürünün içerdiği DG ve MG miktarlarına göre hemen hemen iki kat daha fazla olduğu açıkça görülmektedir.

Serbest ve immobilize enzimle yürütülmüş çalışmalara ait 24 ve 77 saat sonunda her iki fraksiyonun yağ asitleri bileşimi sırasıyla Tablo 3 ve Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 3 ve 4'teki verilere göre, serbest enzim ile çalışıldığında, GLA'ca zenginleşmenin TG ve DG fraksiyonlarında, özellikle TG fraksiyonunda gerçekleşmiş olduğu anlaşılmaktadır. Tablo 3'ten, orijinal boraj yağında % 21.9 oranında bulunan GLA, TG fraksiyonunda 24 saat sonunda % 35.5'e yükselmiştir. 24 saat sonunda ise GLA'ca 1.62 kat zenginleşme gerçekleşmiştir. DG fraksiyonundaki zenginleşmenin daha az ol-



Şekil 1. Boraj yağının serbest ve immobilize enzimle 40 °C'de ve 185 U/g yağ enzim miktarında yürütülmüş hidrolizinde, ürün bileşiminin zamanla değişimi

duğu, 24 saat sonunda GLA miktarının 1.36 kata ulaştığı gözlenmiştir. MG fraksiyonlarında ise herhangi bir zenginleşme söz konusu değildir.

Tablo 4'ten ise, reaksiyon süresinin 77 saate uzatılması ile, hidroliz ürünündeki TG ve DG fraksiyonlarındaki GLA yüzdesinin sırasıyla % 38 ve % 39 değerlerine eriştiği anlaşılmaktadır. Bu koşullarda, söz konusu bu fraksiyonlardaki GLA zenginleşmesi 1.8 kat değerine erişmiştir. 77 saat sonunda MG fraksiyonunda bile % 10 mertebesinde GLA'nın konsantre olduğu anlaşılmaktadır. İmmobilize enzimle yürütülmüş hidroliz deneyinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri Tablo 5'te görülmektedir. Tablo 5'teki verilerden, GLA'nın DG fraksiyonunda % 43 değerine eriştiği böylece bu fraksiyonda % 95 GLA zenginleşmesi gerçekleştiği görülmektedir. TG fraksiyonundaki GLA yüzdesi 34.7 değerine erişmiş olup zenginleşme % 58 oranında gerçekleşmiştir. MG fraksiyonunda ise bir miktar, % 14 oranında, GLA'nın konsantre olduğu da tespit edilmiştir.

Tablo 5. Boraj yağının immobilize enzim ile hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0.1	0.1	0.1	0.2
16:1	0.3	0.2	-	0.2
16:0	7.3	8.4	17.7	15.1
18:3	34.7	42.9	25.0	9.4
18:2	37.1	28.8	29.3	38.8
18:1	11.8	12.7	18.3	18.0
18:0	2.7	2.0	3.4	6.6
20:1	2.8	2.6	3.6	5.6
20:0	0.1	0.9	0.1	0.5
22:1	1.9	1.0	1.3	3.6
22:0	-	0.1	-	0.3
24:1	1.1	0.2	1.2	1.6
24:0	0.1	0.1	-	0.1

Tablo 6. Boraj yağının immobilize enzim ile hidrolizinde, 77 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	-	-	-	0.3
16:1	0.1	-	-	0.2
16:0	8.8	10.8	18.2	10.4
18:3	41.7	44.2	30.0	17.4
18:2	20.9	25.2	32.0	45.5
18:1	13.5	9.6	15.6	14.6
18:0	4.6	3.7	2.2	3.7
20:1	4.7	4.3	2.0	4.3
20:0	0.4	0.1	-	0.1
22:1	2.4	2.1	-	1.2
22:0	0.1	-	-	0.2
24:1	2.0	-	-	1.9
24:0	0.1	-	-	0.2

Tablo 3. Boraj yağının serbest enzim ile hidrolizinde, 24 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0.1	0.1	-	0.1
16:1	0.2	0.2	0.1	0.1
16:0	7.7	11.6	20.0	9.9
18:3	35.5	30.0	19.9	11.8
18:2	38.1	34.6	27.3	40.6
18:1	10.3	13.1	19.5	19.6
18:0	2.0	3.6	4.8	6.9
20:1	2.2	3.5	4.2	5.5
20:0	0.3	0.3	-	0.4
22:1	1.7	1.8	2.6	2.3
22:0	0.1	0.1	-	0.7
24:1	1.7	1.1	1.6	1.9
24:0	0.1	-	-	0.2

Tablo 4. Boraj yağının serbest enzim ile hidrolizinde, 77 saat sonunda hidroliz ürünü bileşenlerinin yağ asitleri bileşimleri

Yağ Asitleri	% Yağ asitleri bileşimi			
	TG	DG	MG	YA
14:0	0.1	-	-	0.2
16:1	0.1	0.1	-	0.1
16:0	9.5	8.2	18.9	11.8
18:3	38.0	39.0	24.2	17.3
18:2	22.4	29.1	28.9	43.2
18:1	13.7	12.6	18.0	15.4
18:0	4.9	3.4	3.3	4.3
20:1	5.3	3.6	4.5	4.2
20:0	0.3	-	-	0.3
22:1	3.3	2.3	1.1	1.0
22:0	0.1	-	-	0.2
24:1	2.2	1.7	1.1	1.8
24:0	0.1	-	-	0.2

Reaksiyon süresinin 77 saate çıkarılmasıyla, Tablo 6'da sunulan değerlere göre, TG ve DG ve MG fraksiyonlarındaki GLA zenginleşme sırası ile % 41.7, % 44.2 ve % 30.0 değerlerine yükselmiştir. Diğer bir deyişle, aynı

fraksiyonlarda GLA sırasıyla 1.90, 2.01 ve 1.36 kat konsantre olmuştur.

Serbest ve immobilize çörekotu lipaz enzimi ile boraj yağının hidrolizi sonucu GLA ile

zenginleşmiş hidroliz ürünleri elde edilebilmiştir. İmmobilize enzim ile hekzan ortamında mukayese edilen her zaman diliminde serbest enzime göre daha yüksek zenginleşme değerlerine ulaşılabilmiştir. Sonuçların mukayesesi Tablo 7’de topluca verilmiştir

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

Tablo 8’den, 100 gram boraj yağının serbest enzim ile hidrolizinde 8 saat sonunda 73 gram gliserid karışımı elde edilebileceği ve bu karışımın

yağ asitlerinde % 26.3 GLA bulunacağı görülmektedir. Aynı koşullarda immobilize enzim kullanımı ile 70 gram gliserid karışımı ele geçebileceği ve bunun GLA içeriğinin ise % 28.6 olacağı anlaşılmaktadır. Reaksiyon süresinin 24 saate çıkarılmasıyla elde edilebilecek gliserid karışımlarının serbest ve immobilize enzim kullanımı halinde sırasıyla 53 ve 50 gram olacağı ve bunların sırasıyla % 33 ve % 38 GLA içereceği görülmektedir. Aynı tablodan, reaksiyonun 77 saat sürdürülmesiyle ise gliserid karışımı miktarlarının hemen hemen yarılanacağı, serbest enzim kullanıldığı reaksiyonda 29 gram, immobilize enzim kullanımı durumunda ise 25 gram gliserid karışımının oluşacağı gözlenmektedir. Buna karşılık bu gliserid karışımlarında ise beklenen GLA zenginleşmelerinin gerçekleşmediği, GLA’nın ancak sırasıyla % 38 ve % 44 GLA değerlerine yükselebileceği anlaşılmaktadır.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuç olarak, çörekotu lipaz enzimi her iki formuyla boraj yağının hidroliz reaksiyonu esnasında gamma-linolenik asite karşı negatif seçicilik göstermiştir. İmmobilizasyon ile

Tablo 7. Boraj yağının serbest ve immobilize enzim ile enzimatik hidrolizinde, ürün bileşenlerinde GLA içeriğinin zamana göre değişimi.

Zaman (saat)	% GLA							
	Serbest enzim				İmmobilize enzim			
	TG	DG	MG	YA	TG	DG	MG	YA
Orjinal Yağ	21.9	-	-	-	21.9	-	-	-
8	28.2	23.9	16.8	11.5	27.9	39.8	18.2	9.1
24	35.5	30.0	19.9	11.8	34.7	42.9	25.0	9.4
77	38.0	39.0	24.2	17.3	41.7	44.2	30.0	17.4

Tablo 8. Boraj yağının serbest ve immobilize enzim ile enzimatik hidrolizinde, Gliserid karışımı ile YA de bulunan GLA ‘in zamana göre değişimi.

Zaman (saat)	Serbest enzim				İmmobilize enzim			
	Gliserid karışımı		YA		Gliserid karışımı		YA	
	Miktarı	% GLA	Miktarı	% GLA	Miktarı	% GLA	Miktarı	% GLA
Boraj yağı	100.0	21.9	-	-	100.0	21.9	-	-
8	73.1	26.3	26.9	11.5	69.1	28.6	30.8	9.1
24	52.8	33.1	47.2	11.8	49.6	37.8	50.4	9.4
77	29.3	38.8	70.7	17.3	25.1	44.1	74.9	17.4

göstermiştir. İmmobilizasyon ile enzimin yağ asiti seçiciliği değişmemiştir. Mümkün olduğu kadar yüksek verimle yüksek GLA içerikli ürün eldesi için hidroliz zamanının 24 saat olarak alınmasının uygun olacağı saptanmıştır. Böylece serbest ve immobilize enzim kullanılarak 24 saat sonunda sırasıyla % 53 ve % 50 verimle içerisinde sırasıyla % 33 ve % 38 GLA bulunan gliserid karışımları elde edilebilmektedir. Literatürde hidroliz reaksiyonu sonucunda boraj yağından içerisinde % 46 GLA içeren ürünler elde edilebilmişse de bunların verimleri % 10 civarındadır (Shimada v. diğ., 1997; 1998). Bu açıdan da çörekotu lipazı ile elde edilmiş bu sonuçlar kayda değerdir. İmmobilize enzim ile hidroliz reaksiyonu gerçekleştirildiğinde edilen ürünün saf olması, enzim ile kirletilmemiş olması ve endüstriyel uygulamaya daha uygun çalışma ortamı yaratması büyük bir avantaj olarak görülmektedir. Sonuç olarak bu çalışmayla, immobilize çörek otu lipazı ile boraj yağından % 50 gibi yüksek bir verimle orijinal yağa göre 1.73 kat GLA'ca zenginleşmiş gliserid karışımı elde edilebileceği ortaya konulmuştur.

Kaynaklar

- Adlercreutz, P., Gitlesen, T., Ncube, I., Read, J. S., (1997). Vernonia Lipase : A Plant Lipase with Strong Fatty Acid Selectivity, *Methods in Enzymology*, **28**, 220-232.
- Aggelis, G., Komaitis, M., Pina, M., Graille, J., (1993). Specificity of *Mucor miehei* Lipase on Methyl Ester Substrates, *Grasas y Aceites*, **44**, 331-334.
- Akova, A., Üstün, G., (2000). Activity and Adsorption of Lipase from *Nigella sativa* Seeds on Celite at Different pH Values, *Biotechnology Letters*, **22**, 355-359.
- Aksoy, H. A., Riva, S., Secundo, F., Tüter, M., Türkay, S., Üstün, G., (2001). Investigation of Enantioselectivity of *Nigella sativa* L. Seed Lipase, Tübitak- İtalya Ulusal Araştırma Konseyi (Consiglio Nazionale delle Ricerche-CNR) Ortak Projesi.
- Arai, M., Fukuta, H., Morikwa, H., (1987). Selective Separation of γ -Linolenic Acid Ether Ester Using Y-Zeolite, *J. Fermentation Technology*, **65**, 569-573.
- Foglia, T. A., Sonnet, P. E., (1995). Fatty Acid Selectivity of Lipases-Gamma-Linolenic Acid from Borage Oil, *J. American Oil Chemists Society*, **72**, 417-420.
- Hayashi, K., (1993). Fractionation of alpha- and Gamma-Linolenic Acid –Enriched Triacylglycerols From Vegetable Oils by Column Chromatography on Silicic Acid, *J. Japan Oil Chemists Society*, **42**, 942-945.
- Hayes, D. G., Van Alstine, J. M., Setterwall, F., (2000). Urea- based Fractionation of Seed Oil Samples Containing Fatty Acids and Acylglycerols of Polyunsaturated and Hydroxy Fatty Acids, *J. American Oil Chemists Society*, **77**, 1071-1072.
- Hilf, M., Kiewitt, I., Mukherjee, K. D., (1989). Enzymatic Fractionation of Evening Primrose by Rape Lipase: Enrichment of γ -Linolenic, *Biotechnology Letters*, **11**, 629-632.
- Jachmanian, I., Mukherjee, K. D., (1995). Germinating Rapeseed as Biocatalyst, Hydrolysis of Oils Containing Common and Unusual Fatty Acids, *J. Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2997-3000.
- Schmitt-Rozieres, M., Vanot, G., Deyris, V., Comeau, L. C., (1999). Borago officinalis Oil: Fatty Acid Fractionation by Immobilized *Candida rugosa* Lipase, *J. American Oil Chemists Society*, **76**, 557-562.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Shibahiraki, M., Fujita, H., Nakano, H., Nagao, T., Terai, T., Tominaga, Y., (1997). Purification of γ -Linolenic Acid from Borage Oil by a Two-Step Enzymatic Method, *J. American Oil Chemists Society*, **74**, 1465-1470.
- Shimada, Y., Sakai, N., Sugihara, A., Fujita, H., Honda, Y., Tominaga, Y., (1998). Large-Scale Purification of Gamma-Linolenic Acid by Selective Esterification using *Rhizopus delemar* Lipase, *J. American Oil Chemists Society*, **75**, 1539-1544.
- Shimada, Y., Fukushima, N., Fujita, H., Honda, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., (1998). Selective Hydrolysis of Borage Oil with *Candida rugosa* Lipase : Two Factors Affecting the Reaction, *J. American Oil Chemists Society*, **75**, 1581-1586.
- Syed Rahmatullah, M. S. K., Shukla, V. K. S., Mukherjee, K. D., (1994). Enrichment of γ -Linolenic Acid from Evening Primrose Oil and Borage Oil via Lipase-Catalyzed Hydrolysis, *J. American Oil Chemists Society*, **71**, 569-573.
- Traitler, H., Wille, H. J., Studer, A., (1988). Fractionation of Blackcurrant Seed Oil, *J. American Oil Chemists Society*, **65**, 755-758.
- Üstün, G., Güner, S., Arer, G., Türkay, S., Erciyes, A. T., (1997). Enzymatic Hydrolysis of Anchovy Oil : Production of Glycerides Enriched in Polyunsaturated Fatty Acids, *Applied*

Boraj yağının zenginleştirilmesi

unsaturated Fatty Acids, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **68**, 171-186.

Yokochi, T., Usita, M. T., Kamisaka, T., Nakahara, T., Suzuki, O., (1990). Increase in the γ -Linolenic

Acid Content by Solvent Winterization of Fungal Oil Extracted from *Mortierella* genus, *J. American Oil Chemists Society*, **67**, 846-851.