

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPAZ-KATALİZLİ AYÇİCEK YAĞIN
METANOLİZ REAKSİYON
MEKANİZMASININ HPLC ile İNCELENMESİ

Şaban KALAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2006

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİPAZ-KATALİZLİ AYÇİCEK YAĞIN
METANOLİZ REAKSİYON
MEKANİZMASININ HPLC ile İNCELENMESİ

Şaban KALAY
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd.Doç.Dr.Ali TÜRKAN

GEBZE
2006

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: Lipaz-Katalizli Ayçiçek Yağın Metanoliz Reaksiyon Mekanizmasının Hplc İle İncelenmesi

YAZAR ADI: Şaban KALAY

Bu çalışmada, Novozym 435 (Novo 435), Lipozyme TL IM (TL IM) ve Lipozyme RM IM (RM IM) sabit (immobilize) lipazlar tarafından katalizlenen ayçiçek yağı (TAG) ile metanol (MeOH) arasındaki transesterifikasyon reaksiyonların mekanizmaları, yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, transesterifikasyon reaksiyonu süresince oluşan maddelerin belirlenmesi ve zamana karşı konsantrasyonlardaki değişimi takip edebilmek için, yeni iki ayrı ters-faz HPLC metodu oluşturulmuştur. Lipaz-katalizli transesterifikasyon reaksiyonları süresince oluşan ürün ve araürünlerin tam tayini HPLC/APCI-MS (HPLC/atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon-kütle spektrometre) ile yapılmıştır. Ayrıca, reaksiyon süresince oluşan metil linoleat ve metil oleat miktarları, kalibrasyon eğrileri kullanılarak tayin edilmiştir.

40°C’de, Novo 435-katalizli reaksiyonlarda fazla bir mono- ve diaçil gliserol araürünleri oluşmamakta; fakat TL IM ve RM IM-katalizli reaksiyonlarda, oldukça fazla *sn*-2 monoaçil ve *sn*-1,2 diaçilgliserol ürünleri oluşmaktadır. Daha yüksek sıcaklıklarda (50°C ve 60°C), Novo 435-katalizli reaksiyonlarda da araürün oluşumu artmaktadır. Reaksiyon ortamındaki MeOH konsantrasyonu azaldıkça, lipazlar açıl göçü reaksiyonlarını, yani *sn*-2 monoaçillerin *sn*-1 monoaçillere ve *sn*-1,2 diaçillerin ise *sn*-1,3 diaçilgliserollere dönüşümünü katalizlemektedir.

Ayrıca, sabit lipaz sistemlerinin her birisi ile farklı sıcaklıklarda, farklı yağ/alkol mol oranlarında, farklı enzim miktarlarında reaksiyonlar yapıp optimum şartlar tespit edilmiştir. Yağa göre 2.0 molar ekivalentten daha fazla MeOH kullanıldığında Novo 435 lipaz; 1.5 molar ekivalentten daha fazla MeOH kullanıldığında ise TL IM ve RM IM lipazların aktiviteleri önemli ölçüde azalmıştır. Enzim matrikslerinin adsorpladığı gliserol, ter-bütanol ve hekzan yıkamaları yapılarak uzaklaştırılmıştır. Diğer taraftan lipaz katalizli reaksiyonlarda tek katalizör kullanmak yerine iki katalizörün birleştirilerek kullanılması araürünlerin daha az oluşmasını sağlamakta ve aynı zamanda da reaksiyon süresi daha da kısalmaktadır.

Novo 435, TL IM ve RM IM ile heptan solvent ortamında yapılan kinetik çalışmalarda, MeOH konsantrasyonu sabit tutulup TAG konsantrasyonu değiştirilerek, kinetik parametreler ($V_{\max}^{app}$ ve K_m^{app}) hesaplanmıştır. Bu şartlarda: aynı TAG konsantrasyonunda MeOH konsantrasyonu arttıkça, Novo 435'in $V_{\max}^{app}$ değeri pek değişmemekte, fakat K_m^{app} değeri artmaktadır; RM IM ve TL IM lipazlarda ise, benzer şartlarda hem $V_{\max}^{app}$ değerleri hem de K_m^{app} değeri artmaktadır. Ayrıca RM IM kinetik çalışmasında yağ konsantrasyonu MeOH konsantrasyonundan düşük olduğunda başlangıç reaksiyon hızları azalmış, yağ konsantrasyonu MeOH konsantrasyonundan fazla olduğunda ise başlangıç reaksiyon hızları artmıştır. Böylece yapılan kinetik çalışmalar ile her bir lipazın reaksiyon mekanizmasının farklı olduğu bulunmuştur.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: Monitoring Lipase-Catalyzed Methanolysis of Sunflower oil by HPLC: Elucidation of the Mechanisms of Lipases

AUTHOR: Şaban KALAY

In this study, the mechanisms of three immobilized lipases, namely Novozym 435 (Novo 435), Lipozyme TL IM (TL IM) and Lipozyme RM IM (RM IM) in methanolysis of sunflower oil were investigated using high-performance liquid chromatography (HPLC). Two reversed-phase HPLC procedures were proposed to monitor the major compounds occurring during the lipase-catalyzed transesterification reactions. HPLC/mass spectrometry with an ion trap analyzer and atmospheric pressure chemical ionization source (HPLC/APCI-MS) was used for the identification of the individual compounds. Individual calibration curves obtained with UV detection at 210 nm were found to be of use for quantitative analyses of methyl esters and acylglycerols. On the contrary to Novo 435-catalyzed reactions, in TL IM- and RM IM-catalyzed reactions, significant amounts of mono- (2-L and 1-L mainly) and diacylglycerol (1,2-LL and 1,3-LL mainly) intermediates formed at 40°C. At 50°C and 60°C, significant amounts of mono- and diacylglycerol intermediates also formed in Novo 435-catalyzed reactions. At depleting MeOH concentrations, all three lipases catalyzed acyl migrations (i.e., conversion of *sn*-2 MAGs to *sn*-1 MAGs and similarly *sn*-1,2 DAGs to *sn*-1,3 DAGs). As soon as the second molar equivalent of MeOH was added, *sn*-1 MAGs and *sn*-1,3 DAGs were the preferred substrates for the lipases.

The optimum conditions (i.e., oil:MeOH ratio, temperature, the amount of enzyme etc.) were also determined for all three lipase systems. Based on the results, using 10% (w/w oil) enzyme and three step addition (1 molar equivalent at each step) of MeOH were suggested. Before addition of second and third molar equivalents of MeOH, the immobilized enzymes were washed with hexane followed by *tert*-BuOH to get rid of the glycerol absorbed onto the matrices.

Moreover, kinetic studies at which MeOH concentration (50, 100 or 200 mM) was kept constant while changing the oil concentration (between 50-500 mM) were carried out with all three lipases. With increasing MeOH concentration, the initial

velocities of Novo 435-catalyzed reactions decreased ($V_{\max}^{app}$ values were constant, but K_m^{app} values increased), whereas that of TL IM-catalyzed reactions increased (both $V_{\max}^{app}$ and K_m^{app} increased). On the other hand, the initial velocities of RM IM-catalyzed reactions decreased at the oil concentrations lower than the concentration of MeOH, but increased at the oil concentrations higher than the concentration of MeOH. Overall, these results suggest that the reaction mechanisms of three immobilized-lipases are different.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince karşılaştığım sorunlarda faydalı tavsiyelerde bulunup, kıymetli stratejiler veren ve her tür desteği sağlayan sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN'a teşekkür etmeyi burada bir borç bilirim.

Juri üyelerim, Prof. Dr. Bülent KESKİNLER ve Doç. Dr. Aziz TANRISEVEN'e, tavsiyelerinden ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Kütle spektrometre analizlerini yapan SEM A.Ş'den Celal ÇAKMAK, Suna UÇAN ve Timur KARADAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması sırasında her türlü maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Avukat Ayhan OKUTAN'a, Ar. Gör Oğuz KÖYSAL'a, çalışma arkadaşlarıma ve aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Bilimsel Araştırma Projesi (proje no: A7 2005; proje yöneticisi: Yrd.Doç. Dr. Ali TÜRKAN) desteği doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KONUİLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Biyodizel (YAME)	3
2.2. YAME'nin Normal Dizele Göre Avantajları	4
2.3. YAME Üretimi	5
2.3.1. Lipazlar Kullanılarak YAME Üretilmesi	6
2.3.1.1. Lipazların Çözünmemiş MeOH ile İnaktive Olması	6
2.3.1.2. Lipaz Katalizörlüğünde TAG'ların Aşamalı Metanolizi	7
2.3.1.3. Bitkisel Yağdan Akışlı Reaktör ile YAME	
Elde edilmesi	8
2.3.1.4. Kullanılmış Kızartma Yağın Lipaz Katalizli Metanolizi	9
2.3.1.5. Kullanılmış Kızartma Yağın Batch Reaktörde Metanolizi	9
2.3.1.6. Kullanılmış Kızartma Yağın Akışlı Reaktörde Metanolizi	10
2.3.1.7. Ham Yağdan YAME Üretilmesi	10
2.3.1.8. Lipozyme TL IM ile YAME Üretilmesi	11
2.4. TAG Molekülü	12
2.5. Lipaz Reaksiyon Mekanizması	14
2.6. Açıl Göçü	16
2.7. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) Çalışmaları	17
2.8. Kinetik Çalışmalar	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Gereçler	22

3.2. Yöntem	22
3.2.1. Enzim Yıkaması Yapılarak Solventsiz Ortamda Ayçiçek Yağın Metanolizi	22
3.2.2. Enzim Yıkaması Yapılmadan Solventsiz Ortamda Ayçiçek Yağın Metanolizi	23
3.2.3. HPLC Analizleri	23
3.2.4. HPLC Kolon Sıcaklığının Ayçiçek Yağ TAG'larının Ayrışmasına Etkisinin İncelenmesi	24
3.2.5. HPLC/Kütle Spektroskopisi (HPLC/MS) Analizleri	24
3.2.6. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması	25
3.2.7. Kinetik Deneyleri	25
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Lipaz-Katalizli Ayçiçek Yağın Metanoliz Reaksiyon Ürün ve Ara Ürünlerinin HPLC ile Belirlenmesi	27
4.1.1. HPLC Kolon Sıcaklığının Ayçiçek Yağ TAG'larının Ayrışmasına Etkisi	27
4.1.2. Ters-Faz HPLC (RP-HPLC) Metodları	29
4.1.3. HPLC/APCI-MS ile Pik İçeriklerinin Belirlenmesi	35
4.2. Kantitatif Analiz	39
4.3. Sabit Lipaz Sistemleri İçin Optimum Şartların Belirlenmesi	43
4.3.1. Optimum Yağ:Metanol (mol:mol) Oranının Belirlenmesi	43
4.3.2. Gliserolün İnhibisyon Etkisinin Giderilmesi	44
4.4. Enzim Miktarının Metil Ester Verimine Etkisi	46
4.4.1. Novozym 435	46
4.4.2. Lipozyme TL IM	47
4.4.3. Lipozyme RM IM	48
4.5. Sıcaklığın Lipaz-Katalizli Biyodizel Verimine ve Araürünlerin Oluşmasına Etkisi	49
4.5.1. Sıcaklığın Novozym 435-Katalizli Biyodizel Verimine ve Araürün Oluşumuna Etkisi	49
4.5.2. Sıcaklığın TL IM-Katalizli Metil Ester Verimine ve Araürün Oluşumuna Etkisi	51
4.6. Metil Ester Üretiminde Kullanılan Lipaz Enzimlerinin Mekanizmasının Aydınlatılması	53

4.7. Transesterifikasyon Reaksiyonunda Çift Enzim	
Sitemlerinin Kullanılması	62
4.8. Kinetik Çalışmalar	64
4.8.1. Novozym 435	64
4.8.2. Lipozyme TL IM	66
4.8.3. Lipozyme RM IM	67
5. GENEL SONUÇ	68
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	74
EKLER	75
EK 1. Transesterifikasyon Sırasında Gözlemlenen	
Moleküllerin Pozitif İyon APCI-MS Spektrumları	
EK 2. Bu tez çalışmasındaki bazı sonuçlar kullanılarak, “ <i>Journal of Chromatography A</i> ” dergisinde yapılan yayın	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

RP-HPLC	Ters faz yüksek basınçlı sıvı kromatografi
HPLC/APCI-MS	HPLC/atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon-kütle spektrometre
GC	Gaz kromatografi
ELSD	Buharlaştırma ışık saçma dedektör
ODS	Oktadesilsilil
RI	Kırılma indeksi
UV	Ultraviyole
MAG	Monoağılglicerol
DAG	Diağılglicerol
TAG	Triağılglicerol
YAME	Yağ asidi metil ester
YAE	Yağ asidi etil ester
t_R	Alıkonma süresi
L	Linoleik asit
O	Oleik asit
P	Palmitik asit
S	Stearik asit
MeOH	Metanol
ter-BüOH	Tersiyer bütanol
ACN	Asetonitril
PPN	Propiyonitril
THF	Tetrahidrofuran
DCM	Diklormetan
mM	Milimolar
μ m	Mikrometre
nm	Nanometre
mm	Milimetre
cm	Santimetre

μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
μg	Mikrogram
mg	Miligram
m/z	Kütle/yük
dk	Dakika
rpm	Dakikadaki dönme sayısı
TL IM	<i>Thermomayces lanoginosus</i> lipaz
RM IM	<i>Rhizomucor miehei</i> lipaz
v	Hacim
V_i	Başlangıç reaksiyon hızı
V_{max}	Maksimum reaksiyon hızı
K_{iA}	Alkol inhibisyon sabiti
K_{mTAG}	Lipazın, yağ substratı için olan Michaelis-Menten sabiti
K_{mA}	Lipazın, alkol substratı için olan Michaelis-Menten sabiti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Triaçilgliserol (TAG) moleküllerinin metanol (MeOH) ile bir katalizör eşliğinde (lipaz, KOH, NaOH, H ₂ SO ₄) yağ asidi metilesterlere (YAME) ve gliserole dönüşmesi reaksiyon şeması	4
2.2. Lipaz-katalizörlüğünde TAG ve MeOH'nın 1,2- <i>sn</i> DAG ve YAME'ye dönüşmesi reaksiyon mekanizması	15
2.3. 1,2- <i>sn</i> DAG molekülünün açıl göçü ile 1,3- <i>sn</i> DAG molekülüne dönüşmesi (A). 2- <i>sn</i> MAG'ın 1(3)- <i>sn</i> MAG'a açıl göçü ile dönüşmesi (B)	16
4.1. . Farklı kolon sıcaklıklarında ayçiçek yağındaki TAG moleküllerinin ters-faz HPLC ile ayrıştırılması	28
4.2. RM IM-katalizli ayçiçek yağın metanolizi sırasında gözlemlenen maddelerin ve bazı standartların RP-HPLC Metot 1 şartlarında elde edilen HPLC kromatogramı	30
4.3. RM IM lipaz-katalizli ayçiçek yağın metanoliz reaksiyonunda oluşan maddelerin HPLC/APCI-MS ile belirlenmesi	33
4.4. RM IM-katalizli ayçiçek yağın metanolizi sırasında gözlemlenen maddelerin ve bazı standartların RP-HPLC Metod 2 şartlarında elde edilen HPLC kromatogramı	34
4.5. MeL ve MeO'nun, negatif iyon (-) APCI ve pozitif iyon (+) APCI spektrumları	38
4.6. Ayçiçek yağ metil esterlere; (A) MeL ve (B) MeO, ait kalibrasyon eğrileri	40
4.7. Ayçiçek yağ metil esterlerin; (A) MeP ve (B) MeS kalibrasyon eğrileri	41
4.8. (A) Monoolein, (B) diolein ve (C) dilinolein kalibrasyon eğrisi	42
4.9. Gliserolün inhibisyon etkisinin giderilmesi	45
4.10. Novo 435 miktarının metil ester verimine etkisi	46
4.11. TL IM miktarının metil ester verimine etkisi	47
4.12. RM IM miktarının metil ester verimine etkisi	48
4.13. Sıcaklığın Novo 435 katalizli biyodizel verimine ve ara ürün miktarına etkisi	50
4.14. Sıcaklığın TL IM katalizli biyodizel verimine ve ara-ürün miktarlarına etkisi	52
4.15. Lipaz-katalizli yağın metanoliz reaksiyonundan alınan örneğin HPLC kromatogramları	54

- 4.16. Ayçiçek yağı RM IM lipaz-katalizli metanoliz reaksiyonundan alınan 10(A), 40(B), 120(C), 130(D) ve 160(E). dk örneklerinin HPLC kromatogramları 55
- 4.17. Novo 435-katalizli ayçiçek yağı metanoliz reaksiyonundan farklı zamanlarda alınan örneklerin HPLC kromatogramları ile diaçilgliserol moleküllerindeki açıl göçünün görüntülenmesi 57
- 4.18. TL IM-katalizli ayçiçek yağı metanoliz reaksiyonundan farklı zamanlarda alınan örneklerin HPLC kromatogramları ile diaçilgliserol moleküllerindeki açıl göçünün görüntülenmesi 59
- 4.19. RM IM-katalizli ayçiçek yağı metanoliz reaksiyonundan farklı zamanlarda alınan örneklerin HPLC kromatogramları ile diaçilgliserol moleküllerindeki açıl göçünün görüntülenmesi 60
- 4.20. Novo 435 lipazın ayçiçek yağındaki her bir TAG molekülünü tüketmesi 61
- 4.21. Novo435+TL IM ve Novo435+RM IM ikili enzim sistemleri ve Novo435, TL IM ve RM IM tekli enzim sistemleri katalizörlüğünde ayçiçek yağ ve metanolün transesterifikasyonu 63
- 4.22. Sabit MeOH ve farklı TAG konsantrasyonlarında Novo 435-katalizli transesterifikasyon reaksiyonu başlangıç reaksiyon hızları 65
- 4.23. Sabit MeOH ve farklı TAG konsantrasyonlarında TL IM-katalizli transesterifikasyon reaksiyonu başlangıç reaksiyon hızları 66
- 4.24. Sabit MeOH ve farklı TAG konsantrasyonlarında RM IM-katalizli transesterifikasyon reaksiyonu başlangıç reaksiyon hızları 67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. Novozym 435 (Novo 435), Lipozyme TL IM (TL IM) ve Lipozyme RM IM (RM IM) sabit (immobilize)-lipazları katalizörlüğünde bitkisel ve hayvansal yağlar ve alkollerin YAME'ye dönüştürülmesi literatür çalışmaları	13
2.2. HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografi) ile TAG, DAG ve MAG moleküllerinin ayrıca YAME ve YAAE'lerin analizlerinin yapıldığı bazı literatür çalışmaları	17
2.3. Çeşitli açıl alıcı ve açıl vericilerinin kullanıldığı literatürdeki lipaz katalizli kinetik çalışmalar	21
4.1. Lipaz-katalizli ayçiçek yağ ve metanolün transesterifikasyonu sırasında HPLC/MS ile belirlenen maddelerin alıkonma süreleri (t_R) ve molekül ağırlıkları	31
4.2. Lipaz-katalizli ayçiçek yağ ve metanolün transesterifikasyon reaksiyonunda oluşan maddelerin APCI-MS ile belirlenmesi	36
4.3. Lineer regresyon analizi ile metil ester standartları ve bazı mono- ve diaçilgliserollerin, kalibrasyon eğrilerindeki sabitler	43
4.4. Novo 435, TL IM ve RM IM katalizli transesterifikasyon reaksiyonlarında yağ:metanol oranının lipaz aktivitesine etkisi	44

1.GİRİŞ

Bitkisel ve hayvansal yağların yapısını oluşturan triaçilgliseroller (TAG), metanol (MeOH) ile bir katalizör (lipaz, NaOH, KOH veya H₂SO₄ gibi) eşliğinde yağ asidi metil esterleri (YAME) diğer adıyla biyodizel ve gliserole dönüşmektedir. Lipaz haricindeki diğer katalizörler ile gerçekleştirilen reaksiyonlar yüksek sıcaklıklarda meydana gelir. Ayrıca lipaz haricindeki katalizörler ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda oluşan gliserolün bir saflaştırma aşamasından geçirilmesi gerekmektedir. Diğer taraftan lipaz-katalizli reaksiyonların oda sıcaklığında gerçekleşmesi ve saf gliserol elde edilmesi bir avantaj olarak bilinmektedir. Lipaz, KOH ve NaOH katalizli reaksiyonlarda TAG'ların YAME'lere dönüşmesi başlıca mono (MAG) ve diaçilgliserol (DAG) ara-ürünlerinin oluştuğu en az üç geri dönüşümlü reaksiyon aşaması ile olmaktadır.

Farklı kaynaklardan izole edilen lipazlar, hekzan gibi bir organik solventin varlığında yada solventsiz ortamlarda YAME üretmek için kullanılmışlardır. *Candida antarctica*'dan izole edilip, bir taşıyıcıya sabitlenen (immobilize edilen) Novozym 435 (Novo 435), *Rhizomucor miehei*'den izole edilip, bir taşıyıcıya sabitlenen Lipozyme RM IM (RM IM) ve *Thermomayces lanuginosus*'dan izole edilip, bir taşıyıcıya sabitlenen Lipozyme TL IM (TL IM) bu lipazlardan bazılarıdır. YAME üretmek için en uygun lipazın tespit edilmesini amaçlayan birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen enzimatik reaksiyonun mekanizması detaylı bir şekilde incelenmemiştir. Enzimlerin kinetik ve mekanizma çalışmaları uygun lipaz sisteminin seçilmesi için gereken önemli parametrelerin belirlenmesini sağlamaktadır. Bu doğrultuda TAG'lardan YAME üretimi esnasındaki substrat (TAG'lar), ara-ürün (MAG'lar veya DAG'lar) ve ürün (YAME) moleküllerinin tespit edilebileceği ayrıca konsantrasyonlarının belirlenebileceği güvenilir, uygulanması kolay bir tekniğin seçilmesi gereklidir. Özellikle gaz kromatografisi (GC) YAME analizinde en yaygın kullanılan tekniklerden birisidir. MAG'lar ve DAG'lar GC ile analiz edilmeden önce trimetilsilanizasyon veya asetilasyon gibi kimyasal işlemlerden geçirilmektedirler. Bu da hem zaman kaybına hem de fazla kimyasal madde kullanılmasına sebep olmaktadır. Diğer yandan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC); YAME'lerin, TAG'ların, DAG'ların ve MAG'ların

trimetilsilan gibi herhangi bir madde ile muamele edilmeden, bir enjeksiyonda hepsinin birlikte analiz edilebildiği, uygulanması kolay ve pratik bir tekniktir.

Bu çalışmada, Novo 435, TL IM ve RM IM sabit-lipaz sistemlerinin katalizlediği ayçiçek yağıın metanoliz reaksiyonlarının mekanizması incelenmiştir. Reaksiyona giren TAG molekülleri, reaksiyon süresince oluşan başlıca MAG ve DAG ara-ürünleri, ve YAME ürünleri ters faz HPLC metodu ile 210 nm’de takip edilerek belirlenmiştir; ayrıca saf YAME standartları kullanılıp konsantrasyonların belirlenebileceği kalibrasyon grafikleri oluşturulmuştur. MAG, DAG, TAG ve YAME’ler HPLC/APCI-Ion Trap-MS ile analiz edilmiştir. Sabit lipaz sistemlerinin hız belirleyici basamakları belirlenmiştir. Sabit-lipaz sistemlerinin her birisi ile farklı sıcaklıklarda, farklı yağ/alkol mol oranlarında, farklı enzim miktarlarında reaksiyonlar yapıp optimum şartlar tespit edilmiştir. Heptanda Novo 435, RM IM ve TL IM lipazların her birisi kullanılıp yapılan kinetik çalışmalar ile reaksiyon mekanizmaları incelenmiştir.

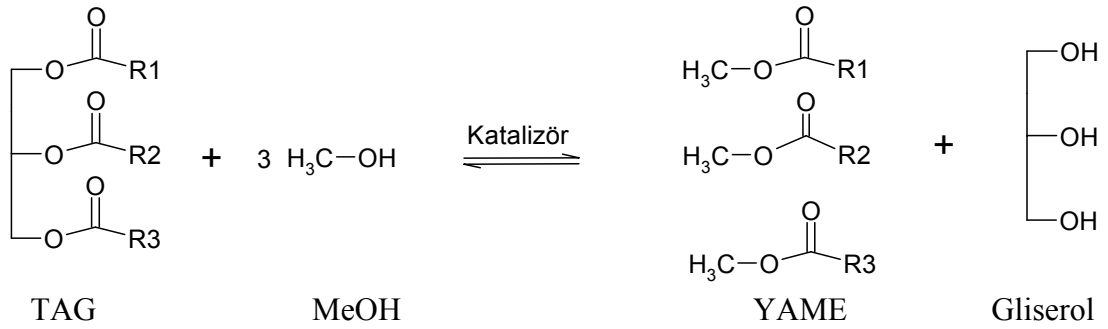
2. KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2.1. Biyodizel (YAME)

Motorlarda yakıt olarak petrol dizelin yerine bitkisel yağların kullanılabileceği, 1900’lerde, dizel motorların kaşifi Rudolph Diesel tarafından söylenmiştir [Peterson *et. al.*, 1986]. Bu zamandan günümüze kadar bitkisel yağların petrol dizelinin yerine bir alternatif olarak kullanılabilmesi için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Bu amaçla bitkisel yağların viskozitelerinin düşürülmesi gerekmektedir. Aksi halde motorda çeşitli enjeksiyon problemleri oluşmaktadır. Diğer taraftan bitkisel yağların uçuculuğunun oldukça az olması da motorda ateşleme gecikmesine sebep olduğundan bir dezavantajdır [Srivastava *et. al.*, 2000].

Viskozitesi düşürülmüş bitkisel yağ dizel motorlarda kullanılmak için daha uygun bir yapıdadır. Piroliz, mikroemülsüfikasyon, dilüsyon ve transesterifikasyon viskozite düşürmek için kullanılabilecek bazı tekniklerdir [Srivastava *et. al.*, 2000]. Transesterifikasyon (veya alkoliz, örneğin transesterifikasyon reaksiyonunda alkol substratı MeOH ise bu reaksiyona metanoliz de denilebilir) ester alkol grubunun bir başka alkol ile yer değiştirmesidir. Bitkisel yağın transesterifikasyonunda yağ molekülünün (TAG) alkol grubu olan gliserol, metanol (etanol, bütanol, izopropanol v.b) ile bir katalizör eşliğinde (lipazlar, NaOH, KOH, metoksit v.b.) yer değiştirmekte, böylece biyodizel (yağ asidi metil esterler (YAME)) ve gliserol oluşmaktadır (Şekil 2.1). Stokiyometrik denkleme göre 1 mol TAG ve 3 mol MeOH, 3 mol biyodizel ve 1 mol gliserole dönüşür.

YAME çevresel açıdan oldukça önemlidir. Petrol kaynaklı dizelin motorda yanması ile atmosfere CO₂ gazı verilmektedir. Fosil kaynaklı bu dizelin atmosfere verdiği gazlar sera etkisi yapmakta ve küresel ısınmaya sebep olmaktadırlar. Bitkisel yağ ve MeOH gibi yenilenebilir kaynaklardan elde edilen YAME ise küresel ısınmaya sebep olmamaktadır. YAME’nin bu olumlu etkisi “green house” etkisi olarak bilinir.



Şekil 2.1. Bitkisel veya hayvansal yağların yapı taşı olan triaçilgliserol (TAG) moleküllerinin metanol (MeOH) ile bir katalizör eşliğinde (lipaz, KOH, NaOH, H₂SO₄) yağ asidi metilesterlere (YAME) diğer adıyla biyodizele ve gliserole dönüşmesi reaksiyon şeması.

2.2. YAME'nin Normal Dizele Göre Avantajları

- 1- YAME, öncelikle bir ülkenin dışa bağımlı olmadan üretebileceği bir yakıttır. Stratejik katkı sağlar.
- 2- Ülkede yağ üretimini teşvik ettiğinden tarımsal sanayinin güçlenmesini sağlar. Böylece kırsal alandan göçü azaltabilir.
- 3- Dizel motorlarda bir değişiklik gerektirmeden kullanılabilen YAME motorun performansını arttırıp sesini azaltır.
- 4- Yağlanma derecesi yüksektir böylece taşıtların motor kullanım ömrünü uzatır.
- 5- Petrol kökenli dizele (mazot) göre parlama noktası daha yüksektir. Buda taşıma ve depolama kolaylığı sağlar.
- 6- Mazot ile her oranda karışır.
- 7- Atık yağların değerlendirilmesine olanak sağlar. Böylece atık yağlardan kaynaklanan çevre kirliliği sorununun önüne geçilebilir.
- 8- Kurum miktarında %50'ye varan azalma sağlar. Kansere neden olan bileşimleri azdır.
- 9- Doğada hızlı ve güvenli çözünür.
- 10- Zehirli atık içermez ve egzoz duman gazlarını azaltır [Elmas, 2005].

2.3. YAME Üretimi

Günümüzde endüstriyel YAME üretiminde farklı teknolojiler kullanılmaktadır. Alman Henkel ve ATT, İtalyan Novamont ve Ballestra, Fransız IFP bu teknolojilere örnek olarak verilebilir. Henkel prosesinde, rafine edilmemiş yağ ve oldukça fazla MeOH kullanılır [Hui, 1996]. Reaksiyon için 240°C sıcaklık ve 9000 kPa basınç gerekmektedir. MeOH'nın reaksiyon ortamından kaçmasını engelleyecek çeşitli önlemler alınmıştır. Reaksiyon karışımı ayrıştırıcıya beslenerek gliserinin konsantrasyon olarak %90'dan fazlası ayrıştırılır. Metil esterler saflaştırılmak için destilasyon kolonuna beslenmekte ve istenilen özelliğe sahip YAME elde edilmektedir. Diğer proseslerde de yüksek sıcaklıklarda YAME üretimi yapılmaktadır.

YAME, endüstriyel olarak bitkisel yağlar ve MeOH'dan homojen alkali katalizör kullanılarak üretilmektedir [Junek *et. al.*, 1988]. Bu proseslerde oldukça fazla enerji harcanır ve YAME, monogliserit (MAG), digliserit (DAG), gliserol, su ve alkali katalizör karışımı bir ürün elde edilir. Elde edilen YAME çeşitli saflaştırma aşamalarından geçirildikten sonra kullanılabilir. YAME üretiminde maliyeti düşürmek amacıyla birçok çalışma yapılmakta ve her gün yeni üretim metodları geliştirilmektedir [Demirbaş, 2006, Ji *et. al.*, 2006]

Araştırmaların bir kısmı YAME üretmek için yeni katalizör sistemlerinin geliştirilmesidir. Bu katalizörlerden biri olan lipazın YAME üretmek için kullanılabilmesi çalışmacılar tarafından incelenmektedir (Çizelge 2.1). Lipazların hidroliz reaksiyonlarının yanında, susuz ortamlarda ester sentezi ve transesterifikasyon reaksiyonlarını da katalizleyebilmeleri enzimatik YAME üretiminde farklı canlılardan izole edilen lipazların kullanılabilmesini olanaklı hale getirmiştir.

2.3.1. Lipazlar Kullanılarak YAME Üretilmesi

Lipazlar kullanılarak YAME üretilmesi ilk kez Nelson *et. al.*, [1996] tarafından incelenmiştir. *Rhizomucor miehei* lipaz hekzanda %95'den daha fazla verimle YAME sentezlemiştir. Aynı şartlarda fakat hekzan kullanılmadan %65 verim elde edilmiştir. Hayvansal yağ ile gerçekleştirilen reaksiyonda metanol yerine *i*-propanol, *i*-bütanol ve 2-bütanol gibi daha uzun zincirli alkoller kullanıldığında verim %90-95'e çıkmıştır. Ayrıca *Candida antarctica* lipazın, YAME üretmek için kullanılabilecek uygun bir lipaz olduğu belirtilmiştir [Nelson *et. al.*, 1996]. Lipazların kullanıldığı benzer YAME üretimi çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre; a) metanol ve etanole göre daha uzun zincirli alkoller kullanıldığı zaman reaksiyon verimi artmaktadır, b) yağların metanol ve etanol ile alkolizi organik çözücü varlığında yüksek verimle gerçekleşmekte yokluğunda verim oldukça düşmektedir, c) organik çözücü varlığında YAME sentezlenmesi maliyetli olmaktadır ve organik çözücü patlama riski içermektedir.

2.3.1.1. Lipazların Çözünmemiş MeOH ile İnaktive Olması

Solventsiz ortamlarda lipazlar, TAG ve MeOH substratları birbirleri içerisinde çözündükleri zaman reaksiyonları yüksek verimler ile katalizlemişlerdir. YAME reaksiyon eşitliğine göre (Şekil 2.1.) reaksiyonun tamamlanması için en az 3 molar ekivalent (TAG'a göre) MeOH gereklidir. Fakat TAG'a göre 3 molar ekivalent MeOH, TAG içerisinde çözünmemektedir [Shimada *et. al.*, 1999]. Yapılan çalışmalarda stokiometrik miktar MeOH'nın ancak 1/3'ünün TAG içerisinde çözünebildiği belirtilmiştir [Shimada *et. al.*, 1999]. TAG'da çözünmeyen MeOH damlacıklarının lipaz molekülü ile temas etmesi protein yapısını değiştirerek reaksiyon verimini düşürür. Diğer taraftan bütanol ve ter-BüOH gibi üç karbondan daha fazla sayıda karbon içeren alkoller, TAG'a göre 3 molar ekivalentten daha fazla olsalar bile TAG içerisinde çözünebilmektedir [Nelson *et. al.*, 1996].

2.3.1.2. Lipaz Katalizörtlüğünde TAG'ların Aşamalı Metanolizi

TAG'ların tamamen YAME'lere dönüşebilmesi için TAG'a göre en az 3 molar ekivalent MeOH gereklidir. Novo 435 TAG'a göre 1 mol'den daha fazla MeOH kullanıldığında inaktive olmuş ve reaksiyon gerçekleşmemiştir [Shimada *et. al.*, 1999]. Soya yağı MeOH ile Novo 435 lipaz katalizörlüğündeki bu reaksiyonunun her aşamada 1/3 molar ekivalent MeOH (TAG'a göre) ilavesi yapılarak üç aşamada gerçekleştirilmesi önerilmiştir. Reaksiyonun ilk aşaması 30°C'de yağ ağırlığının %4'ü Novo 435 lipaz, 1/3 molar ekivalent (TAG'a göre) MeOH kullanılıp yapılmıştır. Yedi saat sonra TAG'ın %33.1'i YAME'ye dönüşmüştür. İkinci 1/3 molar ekivalent (yağa göre) MeOH ilave edilmiş, aynı deney şartlarında, 10 saat sonra, TAG'ın %66.4'ü YAME'ye dönüştüğü belirtilmiştir. Son olarak üçüncü 1/3 molar ekivalent MeOH ilavesi yapıldığında aynı deney şartlarında 24 saat sonra TAG'ın %97.3'ünün YAME'ye dönüştüğü belirtilmiştir [Shimada *et. al.*, 1999]. Bu sunuca göre üç aşamalı metanol ilavesi ile lipaz-katalizörlüğünde TAG'ın neredeyse tamamı YAME'ye dönüşmüştür.

Metanolün YAME'deki çözünürlüğü bitkisel yağdaki çözünürlüğünden daha fazladır. Bu çözünürlük avantajından yararlanılıp lipaz katalizli TAG ve MeOH'ın reaksiyonunda MeOH ilavesi üç aşamada değil de iki aşamada gerçekleştirilmiştir [Watanabe *et. al.*, 2000]. YAME + TAG (ayrıca kısmi gliseritleri) içeren birinci aşama karışımına 2 molar ekivalent (TAG'a göre) MeOH ilave edilmesi metanol için bir çözünürlük sorunu oluşturmayıp Novo 435 lipazı inaktive etmemiştir [Watanabe *et. al.*, 2000]. Novo 435 lipaz bu iki ve üç aşamalı metanoliz deneylerinde tekrar tekrar kullanılmıştır [Shimada *et. al.*, 1999; Watanabe *et. al.*, 2000]. Açıklanan üç aşamalı YAME üretimi 52 kez (105 gün), iki aşamalı YAME üretimi 70 kez (104 gün) %95'den daha fazla verim elde edilerek tekrar edilmiştir. Tekrar kullanımların sonunda %4'e yakın kısmi gliserit, %0.25'den daha az yağ asitleri ve %95 YAME oluşmuştur. Bu sonuçlara göre Novo 435 lipaz aktivitesinde önemli bir kayıp olmadan 100 günden daha fazla bir süre boyunca TAG ve MeOH'dan YAME sentezlemiştir.

2.3.1.3. Bitkisel Yağdan Akışlı Reaktör ile YAME Elde Edilmesi

İki aşamalı reaksiyonda YAME üretmek için sevk edici pervanesi olan bir reaktör (batch reaktör) kullanılmıştır. Uzun süreli kullanımda *Candida antarctica* lipaz taşıyıcı matriksinin fiziksel kuvvetlerden etkilendiği belirtilmiştir. Bu olumsuzluğu engellemek için Novo 435 akışlı biyoreaktörde kullanılmıştır. Bu durumda biyoreaktörün tabanında gliserol birikmiştir. Yan ürün gliserol, substrat molekülleri ve lipaz difüzyonunu sınırlamıştır. Ayrıca reaksiyon ortamındaki MeOH'nın fazlası gliserol tabakasında birikmiştir. Akışlı biyoreaktörde lipaz, gliserol tabakasındaki MeOH ile temas ettiğinde inaktivasyon olmuştur. Sonuçta akışlı reaktörde iki aşamalı YAME üretimi başarısız olmaktadır. İki aşamalı batch reaktörde daha şiddetli karıştırmadan dolayı immobilize enzim bir gliserol tabakası ile kaplanmayıp MeOH sabit bir seviyede tutulabilmiştir. Böylece iki aşamalı batch reaktörde lipaz inaktive olmamıştır [Watanabe *et. al.* 2000]. Fakat daha önce belirtildiği gibi iki aşamalı batch reaktör'de fiziksel kuvvetlerden dolayı lipaz taşıyıcı matriksi etkilenebilmektedir.

Akışlı reaktörde bitkisel yağın üç aşamalı metanolizi ile bir inaktivasyon olmamıştır [Watanabe *et. al.* 2000]. Reaksiyonda 3 adet 3 g immobilize lipaz içeren biyoreaktör (15 mm x 80 mm) kullanılmıştır. Bitkisel yağ ve 1/3 molar ekivalent MeOH karışımı 6 ml/saat sabit akış hızı ile ilk biyoreaktöre beslenmiştir (verim %33). Elde edilen elüsyon bir gece bekletilerek gliserol tabakası uzaklaştırılmıştır. Gliserolden ayrılmış elüsyona ikinci 1/3 molar ekivalent MeOH ilave edilmiş aynı akış hızı ile ikinci biyoreaktöre besleme yapılmıştır (verim %66). Reaksiyonun son aşamasında da gliserolden ayrılmış elüsyona 1/3 molar ekivalent MeOH ilave edilmiş ve aynı akış hızı ile üçüncü biyoreaktöre besleme yapılmıştır (verim %93). Bu üç aşamalı akışlı reaksiyon 100 gün sürdürülmüş ve aktivite aynı kalmıştır. Verimin benzer şekilde yapılan batch reaktördeki YAME üretimi ile aynı olduğu bulunmuştur. Akışlı reaktörde elde edilen ürün içerisindeki serbest yağ asidi oranı %0.2, kısmi gliserit oranı %7'dir. Novo 435 lipaz hem üç aşamalı batch reaktörde hemde üç aşamalı akışlı reaktörde metanoliz reaksiyonunu oldukça yüksek verimler ile katalizlemiştir.

2.3.1.4. Kullanılmış Kızartma Yağının Lipaz Katalizli Metanolizi

Rafine yağlar restoranlarda kullanıldıktan sonra da YAME üretmek için hammadde olabilmektedirler. Bir yağ kızartma yapmak amacıyla kullanıldığında içerdiği su oranı yaklaşık 4 kat artar (2000 ppm). Diğer taraftan kullanılmış kızartma yağları %2.5 yağ asidi %4.6 kısmi gliserit içerebilmektedir. 500 ppm'den daha fazla su içeren bir yağ ile Novo lipaz-katalizörlüğünde metanoliz yapıldığında başlangıç reaksiyon hızının düştüğü fakat dengenin değişmediği belirtilmiştir [Shimada *et. al.*, 1999]. Su oranının yüksek olması lipazların aktivitelerini etkileyebilmektedir. Bitkisel yağ restoranda kullanılmadan önce, 1/3 molar ekivalent (yağa göre) MeOH substrat karışımının lipaz-katalizörlüğünde reaksiyonu gerçekleştirilmiş 7 ve 9 saat sonra sırasıyla %9 ve %33.2 verim elde edilmiştir. Lipaz yeni hazırlanmış bitkisel yağ ve 1/3 molar ekivalent MeOH'dan oluşan reaksiyon karışımına transfer edilmiş ve aynı şekilde beş kez kullanılmıştır. Benzer beş reaksiyon döngüsü atık yağ ile de yapıldığında reaksiyon döngüsünün arttıkça başlangıç reaksiyon hızlarının da arttığı ve aynı benzer verimlerde YAME üretildiği belirtilmiştir.

2.3.1.5. Kullanılmış Kızartma Yağının Batch Reaktörde Metanolizi

Novo 435 lipaz-katalizörlüğünde atık yağ ve bitkisel yağ kullanılarak, batch reaktörde, üç aşamalı MeOH ilavesi ile YAME üretilmiştir (diğer şartlar kısım 2.3.1.2'de açıklanmıştır). Hem kullanılmış hemde kullanılmamış kızartma yağında 1 molar ekivalent MeOH ilavesi ile (yağa göre) %33, ikinci 1 molar ekivalent (yağa göre) MeOH ilavesi ile %66 verim elde edilmiştir. Üçüncü MeOH ilave edilmesi aşaması yapıldıktan sonra atık yağdan %90.4, bitkisel yağdan %95.9 verim elde edilmiştir. Atık yağda bulunabilen epoksitler, aldehitler ve polimerler gibi yağ asidi ürünlerinin YAME verimini düşürebileceği belirtilmiştir. Lipaz bu oksitlenme ürünlerini fark edemediği için verimde çok fazla bir düşme olmamıştır. Ayrıca atık yağdaki serbest yağ asitlerinin (%2.5) üçüncü aşamanın sonunda oldukça azaldığı (%0.3) belirtilerek serbest yağ asitlerinin ve yağın metanolizinin birlikte gerçekleştiği belirtilmiştir.

Batch reaktörlerde reaksiyonlar tamamlandıktan sonra lipaz yeni substrat karışımı ile tekrar kullanılmış böylece lipazın kararlılığı belirlenmiştir. İlk aşama 10 saat (yağa göre 1 molar ekivalent MeOH ilave edilmesi); ikinci aşama 14 saat (yağa göre 1 molar ekivalent MeOH ilave edilmesi); üçüncü aşama 24 saat (yağa göre 1 molar ekivalent MeOH ilave edilmesi) sürdürülmüş ve 50 reaksiyon döngüsü boyunca (100 gün) lipaz aktivitesinde bir düşme olmadan kullanılmıştır. Kullanılmış kızartma yağındaki epoksit ve aldehit gibi safsızlıkların lipaz kararlılığını etkilemediği belirtilmiştir.

2.3.1.6. Kullanılmış Kızartma Yağının Akışlı Reaktörde Metanolizi

Kullanılmış kızartma yağındaki su ve serbest yağ asitlerinin YAME üretimini hemen hemen etkilemediği belirtilmiştir. Novo 435 lipaz içeren biyoreaktör kullanılarak kısım 2.3.1.3’de belirtilen şekilde üç aşamalı akışlı metanoliz reaksiyonu yapılmıştır [Watanabe *et. al.* 2001]. Birinci ve ikinci biyoreaktöre 3 g, üçüncü biyoreaktöre 4.5 g enzim koyulmuştur. Kullanılmış kızartma yağı ve 1 molar ekivalent (TAG’a göre) MeOH karışımından oluşan substrat birinci reaktöre beslenmiştir. İlk elüsyondan gliserol tabakası ayrılmış ve gliserol içermeyen bu kısma 1 molar ekivalent (TAG’a göre) MeOH ilavesi yapılarak ikinci biyoreaktöre besleme gerçekleştirilmiştir. Yine aynı şekilde üçüncü biyoreaktöre de besleme yapılmıştır. Deneyler boyunca sıcaklık 30°C’de akış hızı 6 ml/saatte sabit tutulmuş bu sistem 100 gün kullanılabilmiştir. Bir reaksiyon döngüsü tamamlandıktan sonra her bir reaktördeki immobilize enzim çıkarılmış ve aktivite ölçülmüştür. 100 gün boyunca lipaz aktivitesinin düşmediği belirtilmiştir [Watanabe *et. al.* 2001].

2.3.1.7. Ham Yağdan YAME Üretilmesi

Rafine edilmiş bitkisel yağlar ve kızartmalarda kullanılmış yağlar, daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi, lipaz-katalizörlüğünde YAME üretmek için kullanılmışlardır. Diğer taraftan rafine edilmemiş soya yağı kullanılarak YAME üretilmesi de incelenmiştir [Watanabe *et. al.*, 2002]. Rafine işleminin bir basamağında ham yağdan sakız denilen kısım uzaklaştırılmaktadır. Sakız kısmı uzaklaştırılmış rafine yağ kullanılarak, üç aşamada MeOH ilavesi yapıp (kısım 2.3.1.2’de belirtildiği şekilde) %90’dan daha fazla verim ile YAME üretilmiştir. Üç

aşamalı metanoliz aktivitede bir düşme olmadan 50 kez tekrarlanmıştır. Sakız kısmı fosfolipitlerden oluşmaktadır. Bitkisel yağa %1 fosfolipit ilave edildikten sonra ise YAME üretilmemiştir. YAME üretilmemesinin sebebinin sabit enzim matriksine adsorplanan fosfolipitler olduğu bulunmuştur. Rafine edilmemiş yağdan YAME üretmek için kullanılan sabit lipaz kloroform:MeOH (2:1 hacim/hacim) ile çekilmiş ve süzültüde fosfolipitler tespit edilmiştir. İmmobilizasyon materyaline bağlanan fosfolipitlerin lipaz molekülü ve substrat etkileşimini engellediği belirtilmiştir [Watanabe *et. al.*, 2002].

2.3.1.8. Lipozyme TL IM ile YAME Üretilmesi

Lipozyme TL IM (TL IM) lipaz *Thermomayces lanoginosus* lipazın silika taşıyıcı matriksine sabitlenmesi ile oluşturulmuştur. Novo 435 lipaza göre daha ekonomik olan TL IM lipaz kullanılarak soya yağdan %90 verim ile YAME üretilmiştir [Wu *et. al.*, 2003].

Tamamen hidrojenlenmiş soya yağı-soya yağı (27-73) + MeOH substrat karışımı, %30 TL IM lipaz kullanılıp sürekli batch reaktör ve kesikli batch reaktörlerde YAME üretilmiştir. Sürekli batch reaktörde reaksiyonda 1 molar ekivalent MeOH birer saat ara ile üç aşamada ilave edilerek bir reaksiyon döngüsü tamamlanmıştır. Sürekli batch reaktörde, 30°C sıcaklıkta aktivitenin 10 reaksiyon döngüsü boyunca korunduğu belirtilmiştir (%95 verim). Kesikli batch reaktörde optimum sıcaklıkta (40°C), %92 verim elde edilmiştir [Du *et. al.*, 2003].

Palmiye yağı, pamuk yağı, fındık yağı ve ay çiçek yağların her biri ile hezanda, TL IM, Lipozyme RM IM (RM IM) ve *Pseudomonas fluorescens* (AK lipaz) lipazları-katalizörlüğünde metanoliz reaksiyonları yapılmıştır. Palmiye yağı ve TL IM lipaz kullanıldığında en yüksek verime ulaşılmıştır (%97). Diğer taraftan pamuk yağı substrat olarak kullanıldığında AK lipaz ile en yüksek verime ulaşılmıştır. Verimlerin farklı oluşu lipaz yağ asidi seçicilikleri ile ilgilidir [Soumanou *et. al.*, 2003].

TL IM lipazın çözücüsüz ortamda 1.5 molar ekivalent (TAG'a göre) MeOH'dan daha fazla MeOH ile inaktive olduğu belirtilerek üç aşamada 1'er molar

ekivalent MeOH ilavesi yapılarak YAME üretilmesi önerilmiştir. Diğer taraftan Novo 435 aynı şartlarda 2 molar ekivalent (TAG'a göre) MeOH'dan daha fazla MeOH ile inaktive olmaktadır. TAG ağırlığına göre %10 TL IM kullanıldığında, 150 rpm ve 40°C'de üç aşamalı MeOH ilavesi yapılarak 12 saat reaksiyon sonunda %98 verim elde edilmiştir. Enzim bu reaksiyonda her kullanımdan önce İPA ile yıkanarak 15 kez tekrar kullanılmış ve aktivitesini kaybetmemiştir [Xu *et. al.*, 2004].

Novo 435, RM IM ve TL IM lipazları çözücüsüz ortamlarda çeşitli bitkisel yağlar ve MeOH substratlarından YAME üretebilmek için yaygın kullanılmışlardır (Çizelge 2.1). Bu lipazlar kullanılarak %60'dan %98.4'e kadar değişik verimlerde YAME sentezlenmiştir. Çalışmalara göre bu üç lipazın katalizlediği reaksiyonlarda 40°C reaksiyon sıcaklığı ve 150 rpm karıştırma tercih edilmiştir. Çalışmalarda immobilize enzimlerin adsorpladığı gliserol propanol, *i*-propanol, butanol, *t*-butanol gibi çözücüler kullanılıp uzaklaştırılmıştır [Chen *et. al.*, 2003; Du *et. al.*, 2003].

2.4. TAG Molekülü

TAG'lar üç yağ asidinin üç değerlikli alkol olan gliserol ile oluşturduğu esterlerdir. Sadece bir yağ asidi gliserol ile esterleştiğinde ürün monoasilgliserol (MAG) olarak tanımlanır. Daha fazla yağ asidi ile esterleşme diaçilgliseroller ve sonuçta da yağ molekülü olan triaçilgliseroller (TAG) oluşturmaktadır. Yağlar yüksüz olduğundan nötral yağlar olarak da ifade edilirler. Yağlardaki gliserol karbonları eşdeğer değildirler. Bu karbonlar IUPAC-IUB'nin önerdiği sn (Stereospesific numbering) numaraları ile belirtilirler. sn-1, sn-2 ve sn-3 sırasıyla 1, 2 ve 3. gliserol karbonlarını belirtmek için kullanılmaktadır.

Bir TAG molekülünün yağ asidi birimleri aynı olmayabilir. Biyolojik kökenli yağlar her zaman sadece yağ asidi birimlerinde farklılıkları olan çok benzer TAG'ların karışımıdır. Besinsel yağlar genellikle palmitik, stearik (doymuş), oleik (tekli doymamış) ve linoleik (ikili doymamış) asitleri içerirler. Oleik asit genellikle gliserolün sn-2 pozisyonundan esterleşmiştir [Koolman *et. al.*, 2002]. TAG'lar apolar ve çok esnek moleküllerdir. C-C tek bağlarının etrafında rotasyon yapabilir ve bu yolla birçok farklı konformasyon edinebilirler. TAG iskeletini oluşturan gliserolün

bir simetri düzlemi vardır. Gliserolün iki primer hidroksili farklı yağ asitleri ile esterleşirse oluşan TAG asimetrik ve optikçe aktif hale gelir [Koolman *et. al.*, 2002].

Çizelge 2.1. Novozym 435 (Novo 435), Lipozyme TL IM (TL IM) ve Lipozyme RM IM (RM IM) sabit (immobilize)-lipazları katalizörlüğünde bitkisel ve hayvansal yağlar ve alkollerin YAME'ye dönüştürülmesi literatür çalışmaları.

Lipaz	Enzim ^a	Yağ	Alkol	Sıcaklık (°C)	Verim (%)	Zaman (saat)	Referans
TL IM	10	Kullanılmış kızartma	MeOH	35	90	96	Wu 2003
435	4	Soya ve Kolza karışımı	MeOH	30	98.4	48	Shimada 1999
TL IM	10	Soya	MeOH	40	98	48	Xu 2004
TL IM	10	Bitkisel yağ	MeOH	40	97	24 ^c	Soumanou 2003
TL IM					60	30	
RM IM					90	30	
TL IM	30	Soya	MeOH	30	100	9	Du 2003
435	30	Pamuk	MeOH	50	91.5	7	Köse 2003
435	4	Balık	Etanol	40	95	48	Watanabe 1999
TL IM	10	Soya	MeOH	40	90	48	Du 2005
435	4	Ham soya	MeOH	30	10.3 ^b	6	Watanabe 2002
		Rafine soya			30.2 ^b		
435	4	Soya	MeOH	30	97	3.5	Samukava 2000
435	4	Soya ve koza karışımı	Metanol		95	36	Watanabe 2000

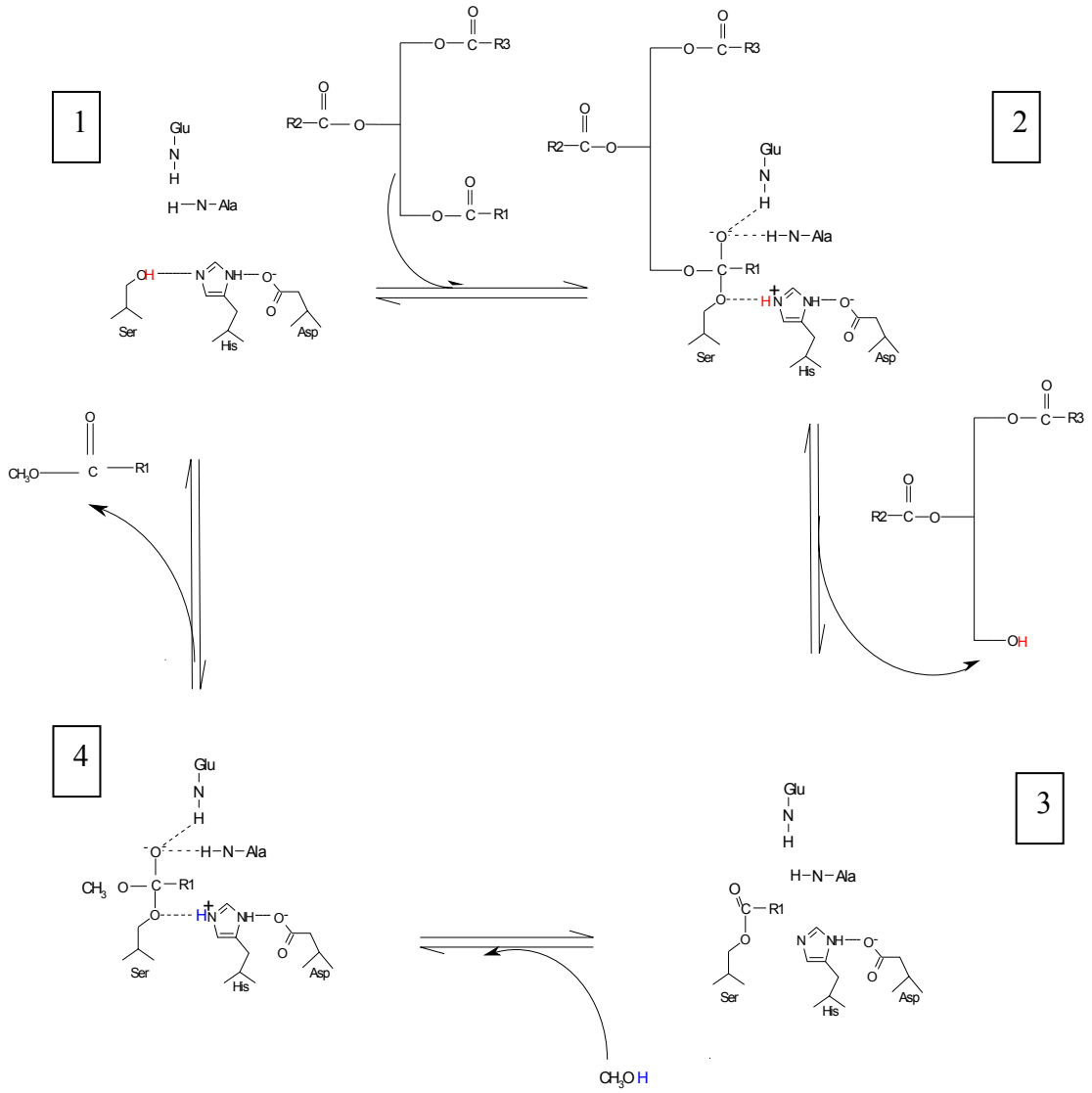
^a Yağa göre ağırlıkça % immobilize (sabit) enzim

^b Yağa göre 1 molar ekivalent alkol kullanıldığında.

^c Reaksiyon hekszanda yapılmıştır. Tablodaki diğer çalışmalar bir solventin kullanılmadığı ortamlarda gerçekleştirilmişlerdir.

2.5. Lipaz Reaksiyon Mekanizması

Serin proteazlar; açıl-serin, sistein proteazlar; açıl-sistein, protein kinaz ve fosfatazlar; posfoaminoasit, pyridoksalfosfat kullanan enzimler; pyridoksalaminoasit Schiff bazı kovalent geçiş hali oluşturan enzimlerdir. Kovalent katalizde aktivasyon enerji bariyerin aşılması için enzimle kovalent ürünün oluştuğu ve salındığı iki adım oluşmaktadır. Bu enzimlerin hız belirleyici adımı büyük çoğunlukla bu iki adımdan biridir. Serin proteazlar aktif bölgelerinde serin içeren enzimlerdir. Bu aminoasit site-directed mutageneses çalışması ile değiştirilirse aktivite 10^6 kat azalmaktadır. Reaksiyon mekanizmasına göre aktif bölgede bulunan serin, peptid karbonil karbonuna bağlanıp enzim-substrat (ES) kompleksini oluşturmaktadır. Aktif bölge amino asitleri ve substratın oksianyonu arasında oluşan hidrojen bağları geçiş halini karlı tutmaktadır. Histidin protonunun substrat azotuna bağlanması ile geçiş hali bozulur ve reaksiyonun ilk ürünü oluşur. Enzim molekülündeki ilk ürünün çıktığı oyuktan giren suyun nükleofilik atağı enzimden açıl grubunda ayrılmasını sağlar. Açıl grubunun ayrılması sırasında (deaçillenme) açillenme reaksiyonuna oldukça benzer ikinci tetrahedral geçiş hali oluşmaktadır. Bu geçiş hali sudan histidine proton transferi ile bozulur ve ikinci peptid salınır [Marangoni, 2002]. Lipazlar serin proteazlar gibi açıl-serin geçiş hali oluşturan enzimlerdir [Holmquist, 2000]. Buna göre lipaz-katalizörlüğündeki ay çiçek yağ ve MeOH'nın 1,2-*sn*-gliserol ve YAME'ye dönüşmesi reaksiyon şeması Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

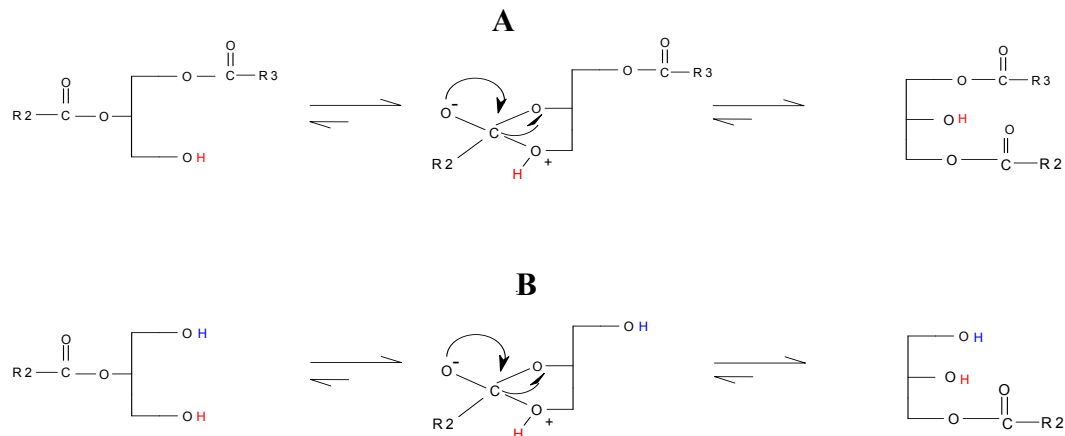


Şekil 2.2. Lipaz-katalizörlüğünde TAG ve MeOH'nın 1,2-*sn* DAG ve YAME'ye dönüşmesi reaksiyon mekanizması. 1-Serbest enzim (lipaz aktif bölgesi). Lipaza TAG molekülünün yaklaşması. 2-İlk geçiş hali. Serin protonunun histidine yaklaşması, karbonil çift bağının açılması ile oluşan oksianyonun alanin ve glutamin protonları ile kararlı halde tutulması. 3-Enzim açıl kompleksinin oluşması. 1,2-*sn*-DAG'ın (ilk ürün) lipazdan ayrılması. 4-İkinci geçiş hali. MeOH'nın (ikinci substrat) enzim açıl kompleksine bağlanması. MeOH protonunun histidine yaklaşması. Oksianyonun alanin ve glutamin protonları ile kararlı halde tutulması. Metil esterin (ikinci ürün) salınması (enzimin başlangıç haline dönmesi).

2.6. Açıl Göçü

Açıl göçü lipaz-katalizli bazı asidoliz reaksiyonlarında (yağ+yağ asidi kullanılarak yapılan reaksiyonlar asidoliz reaksiyonlarıdır) ayrıca bazı lipaz katalizli YAME üretim reaksiyonlarında istenilmeyen fakat engellenemeyen bir yan reaksiyon olarak meydana gelmektedir. Reaksiyon ortamında digliserit olması lipaz-katalizli asidoliz reaksiyonlarında açıl göçü olmasını sağlar. Bu reaksiyonlar digliserit ve monogliserit moleküllerinde meydana gelmektedir. 1,2-digliserit, 1,3-digliserite, 2-monogliserit 1 monogliserite dönüşmektedir. Açıl göçü 1,2-digliserit serbest hidroksilindeki ortaklanmamış elektron çiftinin ester karbonil karbonuna nükleofilik atak yapmasıyla başlar. Beş üyeli bir geçiş hali (kararsız bir orto ester) meydana gelir. Orijinal esterin C-O bağının kopması ile halka açılması açıl göçünü sağlar. Reaksiyon sıcaklığı, açıl zincir uzunluğu, su aktivitesi, asit ve bazlar gibi unsurlar açıl göçünün hızını etkileyebilir. Gliserol iskeletindeki primer hidroksil oksijeninin sekonder hidroksilin oksijeninden daha aktif bir nükleofil olması açıl grubunun sekonder hidroksilden primer hidroksile geçişini sağlayan itici güçtür [Yang *et. al.* 2005].

Açıl göçü lipaz katalizli YAME üretimi esnasında da meydana gelmiş bir reaksiyondur [Salis *et. al.*, 2003; Du *et. al.*, 2005]. 1,2-*sn*-DAG'ın 1,3-*sn*-DAG'a ve 2-*sn* MAG'ın 1-*sn* MAG'a dönüşmesi açıl göçü reaksiyonlarının mekanizması Şekil 2.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. A- 1,2-*sn* DAG molekülünün açıl göçü ile 1,3-*sn* DAG molekülüne dönüşmesi. B- 2-*sn* MAG'ın 1(3)-*sn* MAG'a açıl göçü ile dönüşmesi.

2.7. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) Çalışmaları

Enzimlerin kinetik ve mekanizma çalışmaları, uygun lipaz sisteminin seçilmesi için gereken önemli parametrelerin belirlenmesini sağlamaktadır. Bu doğrultuda bitkisel yağlardan YAME üretimi esnasındaki substrat (TAG), ara-ürün (DAG ve MAG) ve ürün (YAME) moleküllerinin tespit edilebileceği ve konsantrasyonlarının belirlenebileceği güvenilir ve uygulanması kolay bir tekniğin seçilmesi gereklidir. YAME analizinde kullanılan gaz kromatografi analizden önce mono ve digliseritlerdeki serbest hidroksil gruplarının trimetilsililasyonu veya asetilasyonunu gerektirdiği için TAG gibi uçuculuğu oldukça az olan açıl gliserollerin analizinde daha az tercih edilir [Holcapek *et. al.*, 1999].

Çizelge 2.2. HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografi) ile TAG, DAG ve MAG moleküllerinin ayrıca YAME ve YAAE'lerin analizlerinin yapıldığı bazı literatür çalışmaları.

Analizi yapılan madde	HPLC Kolonu		Mobil faz	Akış hızı ml/dk	Dedektör	Referans
	Boyut	Dolgu Maddesi				
YAAE	250 x 4.6 mm; 5 µm	Nucleosil C18	MeOH-Asetik asit	0.7	RI	Chulalaksananu kul 1990
TAG ve DAG	251 x 4.6 mm; 5 µm	Spherisorb ODS II C18	Aseton-ACN		UV210 nm	Dossat 2002
YAME ve MAG	252 x 4.6 mm; 5 µm	Spherisorb ODS II C19	MeOH-Asetik asit	1	RI	Dossat 2002
TAG ve YAME	150 x 3 mm; 7 µm	Separon SGX C18	MeOH-2prop-Hek	1	UV205 nm	Holcapek 1999
MAG, DAG, TAG ve YAME	151 x 3 mm; 7 µm	Separon SGX C18	Su-ACN-2prop-Hek	1	UV205 nm	Holcapek 1999
YAME reaksiyon örneği Kolza yağ	150 x 3 mm; 7 µm	C18	Su-ACN-2prop-Hek		UV205 nm	Komers 2001
TAG	250 x 4.6 mm; 6 µm	Diasfer-110-C18	Aseton-ACN	1	RI	Deineka 2003
TAG	25 cm x 4.6 mm; 5 µm	LiChrosorb RP 18	ACN-THF-n-hekzan	1.5	RI	Jensen 1981

HPLC, YAME üretim reaksiyonu esnasında oluşan bütün bileşenlerinin ayrıca reaksiyon substratının (TAG) bir derivasyon yapılmadan tek bir analiz ile belirlenebileceği etkili bir ayırma yöntemidir. Bu molekülleri belirlemek için HPLC’de yaygın şekilde UV (ultraviyole) ve MS (kütle spektrometre) dedektör kullanılmaktadır. Ayrıca RI (kırıcılık indeksi) ve FID (alev iyonizasyon dedektör) dedektörlerde yaygındır.

HPLC ile; TAG, DAG, MAG, YAME ve YAEE’nin belirlenebilmesi için mobil faz, kolon, dedektör seçimi gibi çeşitli bileşenleri ve şartları birbirinden farklılık gösteren çalışmalar yapılmıştır (Çizelge 2.2). Ters-faz HPLC (RP-HPLC) tekniği ile kolza (rapeseed) yağdan NaOH katalizli YAME üretilmesi sırasında oluşan bileşikler UV dedektör (205 nm), ELSD (buharlaştırma ışık saçma) dedektör ve pozitif iyon moda APCI-MS (atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon kütle spektrometre) dedeksiyon sistemleri kullanılarak testip edilmişlerdir [Holcapek *et al.*, 1999]. YAME, yağ molekülleri ve kısmi gliseritlerin (MAG ve DAG) ayrıştırılmasını sağlayan, su içeren ve su içermeyen iki mobil faz sistemi önerilmiştir [Holcapek *et al.*, 1999]. Ay çiçek (oleik asit oranı fazla) yağı ile bütanolün transesterifikasyonunda oluşan TAG ve DAG’lar UV-210’da aseton : asetoniril (1:1 v/v) solventleri ile ayrıştırılıp UV-210 nm dedektör ile tespit edilmişlerdir. Bütilester ve MAG’lar ise akış gradienti yapılarak analiz edilmişlerdir. Bütilester ve MAG’ların analizi için metanol:asetik asit (99.7:0.3) çözücüleri kullanılıp akış gradienti yapılmıştır gradient şartları: ilk 7 dakikada 0.5 ml/min, 7-10 dk 3 ml/min, 10-16 dk 3 ml/min, 16-20 dk 0.5 ml/min olarak uygulanmıştır [Dossat *et al.*, 2002]. Ticari olarak satılan ayçiçek yağları ve susam yağlarında bulunan TAG’lar aseton : asetonitril (80:20 v/v) mobil fazı kullanılıp ve RI dedektörü ile tespit edilmişlerdir. Buna göre ayçiçek yağında %20-33 trilinolein, %28-32 oleildilinolein, %6-11 palmitildilinolein, %10-16 dioleillinolein, %11-15 stearildilinolein + palmitil oleil linolein ve %1-11 triolein + stearil oleil linolein+palmitil diolein TAG’leri bulunur [Dossat *et al.*, 2002].

Yağ moleküllerinin RP-HPLC ile ayrıştırılmasının mekanizması hemen hemen bilinmektedir. t_R (kolonda alıkonma süresi) yağı oluşturan yağ asitlerinin toplam karbon sayısına bağlıdır ve bir tane çift bağ karbon sayısını iki azaltmaktadır.

t_R değerlerinin tahmini için eşdeğer karbon sayısı (ECN Ekivalent Carbon Number) hesaplanması kullanılmaktadır. Buna göre $ECN = \text{yağ asitlerindeki toplam karbon sayısı} - 2 \times \text{çift bağ sayısının}$ iki katından çıkarılması ile hesaplanır. Örneğin oleik-oleik-linoleik (18:1-18:1-18:2 (yağ asidindeki toplam karbon sayısı:çift bağ sayısı)) asit içeren bir TAG molekülünün ECN'si; $54 - 2 \times 4 = 46$, 14:0-16:0-14:0 TAG'ın ECN'si 34 olarak hesaplanır. ECN değeri az çıkan TAG, RP-HPLC analizinde kolonu daha çabuk terk eder.

Oktadesilsilil kolonlar (ODS veya C_{18}) yağ ayrıştırılmasında kullanılan en yaygın kolonlardır. HPLC çalışmalarında yağ asidi ile aynı sayıda karbon içeren kolonlar kullanıldığında daha iyi ayrıştırma elde edilmiştir. Kısa kolonlar ile daha az solvent harcandığından analiz süresi de azalır. 100 x 3 mm (3 μ paketlenmiş) kolonların 250 x 5 mm (5 μ paketlenmiş) kolonların yerine geçmesi piklerin görünümünde bir fark oluşturmamış fakat analiz süresini kısaltmıştır [Christie, 2000].

Yağımsı maddelerin ayrıştırılması için HPLC ile yapılan ilk çalışmalarda sıklıkla propiyonitril (PPN) mobil fazı tercih edilmiştir. Daha sonra PPN hem pahalı hem toksik olduğundan terk edilip aseton ve asetonitril (ACN) yaygınlaşmıştır. Diğer taraftan PPN bazı MS çalışmalarında günümüzde de tercih edilmektedir. Aseton ve asetonitrilin UV dedektör ile kullanıldığı çalışmalarda kantitatif analizde asetonun da UV absorbansından kaynaklanabilecek çeşitli sorunlar ile karşılaşmıştır. ACN HPLC ana solventi olarak tercih edilmektedir. ACN-aseton sistemi doymuş yağ asitlerinden oluşan yağlarda bu yağ moleküllerini pek çözemediği için tercih edilmemiştir. Bunun yerine ACN-diklormetan (DCM) kullanılması daha iyi bir ayrıştırma sağlamıştır [Christie, 2000].

TAG moleküllerinin analizleri için çeşitli MS iyonlaştırma teknikleri incelenmiş, bu alandaki en başarılı iyonizasyon tekniğinin APCI (atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon) olduğu söylenmiştir [Holcapek *et al.*, 1999]. APCI hem yapısal hem de moleküler ağırlık bilgileri verilmektedir.

2.8. Kinetik Çalışmalar

Enzimlerin kinetik ve mekanizma çalışmaları uygun lipaz sisteminin seçilmesi için gereken önemli parametrelerin belirlenmesini sağlamaktadır. İki substratın girip iki ürünün olduğu transesterifikasyon reaksiyonlarında geçerli olabilecek üç reaksiyon mekanizması vardır. Bu mekanizmalar rastgele-düzen (random-order) Ping-pong bi-bi ve sıralı (ordered) bi-bi mekanizma'lardır. Lipaz-katalizli reaksiyonlarda öncelikle enzim ile yağ molekülü arasında bir enzim-açıl kompleksi olduğu bilindiğinden rasgele düzen mekanizması elenmektedir. Literatürdeki lipaz-katalizli bazı kinetik çalışmalarda, ping-pong bi bi, dörtlü kompleks mekanizması ve ordered (sıralı) bi-bi mekanizmaların geçerli olduğu belirtilmiştir (Çizelge 2.3.). Ayrıca lipaz-katalizli TAG ve MEOH'nın YAME oluşturma reaksiyonunun Michaelis-Menten kinetiğine göre gerçekleştiği ve enzimatik kinetiğin ping-pong bi bi mekanizmasına uyduğu belirtilmiştir [Srivasta *et. al.* 2000]. Bu mekanizmalarda genelde kısa zincirli alkollerin sebep olduğu inhibisyonlar gözlemlenmiştir.

Solventsiz ortamda soya yağı ve metil asetatın interesterifikasyon reaksiyonu ile YAME ve triasetilgliserole dönüşmesi kinetik olarak incelenmiştir [Xu *et. al.* 2005]. Reaksiyonun geri dönüşümlü TAG'ın DAG'a sonra DAG'ın MAG'a ve MAG'ın triasetilgliserole dönüştüğü üç adımdan oluştuğu belirtilmiştir. Her bir adımın ileri ve geri yöndeki hız sabitlerini belirlemişler ve birinci adımın en yavaş adım olduğunu bulmuştur. Ayrıca bu çalışmada MAG ve DAG araürünlerinin pek fazla oluşmadığı belirtilmiştir.

Çizelge 2.3. Çeşitli açıl alıcı ve açıl vericilerinin kullanıldığı literatürdeki lipaz katalizli kinetik çalışmalar.

Lipaz	Solvent	Sıcaklık, °C	Asit (açıl verici)	Alkol veya asit	Reaksiyon türü	Mekanizma	Referans
<i>Mucor miehei</i> (Lipozyme Immobilize)	n-hekzan	40	oleik asit	Etanol	esterifikasyon	ping pong bi bi, alkol kompetatif inhibisyon	Chulalaksananukul 1990
<i>Mucor miehei</i> (Lipozyme IM 20)	n-hekzan	40	bütirik asit	İzoamilalkol	esterifikasyon	ping pong bi-bi substratların kompetatif inhibisyonu	Krishna 2001
<i>Mucor miehei</i> (Lipozyme)	n-hekzan	40	TAG (yüksek oleik asit)	Bütanol	transesterifikasyon	ping pong bi bi alkol kompetatif inhibisyon	Dossat 2002
<i>Alcaligenes</i> sp	THF	40	α -siyano benzaldehid	MeOH	transesterifikasyon	ping pong bi bi MeOH inhibisyonu	Zhang 2004
Novo 435		70	palmitik asit	i-propanol	esterifikasyon	ordered bi-bi substratlar ve ürünlerin inhibisyonu	Garcia 1999
Novo 435 TL IM RM IM	toluen	30	metil asetoasetat β -ketoester	Bütanol	transesterifikasyon	ping pong bi-bi inhibisyon yok.	Yadav 2004
Novo 435		40	TAG	metil asetat	interesterifikasyon	ping pong bi-bi substrat kompetatif inhibisyonu	Xu 2005
<i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme 10 000)		30	oleik asit	Oktanol	esterifikasyon	ping pong bi bi	Yong 1996
<i>Rhizomucor</i> (serbest ve immobilize)	bifazik sistem	30	oleik asit	Etanol	esterifikasyon	dörtlü kompleks mekanizması	Olivera 2001
Novo 435	toluen	30	laurik asit	H ₂ O ₂	perasit sentezi	ordered bi-bi	Yadav 2002

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

Novozym 435 lipaz (immobilize *Candida antarctica* lipase B), Lipozyme TL IM lipaz (immobilize *Thermomayces lanoginosus*), Lipozyme RM IM lipaz (immobilize *Rhizomucor miehei*) hediye olarak Novo Nordis (Danimarka) firmasından temin edilmiş; metil linoleat, metil oleat, metil palmitat, metil stearat, linoleik asit, oleik asit, 1-monooileil gliserol, 1,2-dioileilgliserol, 1,2-dilinoleilgliserol, trioleilgliserol Sigma (USA)'dan; HPLC kalitesinde aseton, asetonitril ve metanol ayrıca palmitik asit ve stearik asit Merck (Darmstand Almanya)'dan, rafine ayçiçek yağı (ONA marka) marketten satın alınmıştır. Ayçiçek yağı, GC (gaz kromatografi) analiz sonuçları: %64.9 linoleik asit, %23.5 oleik asit, %6.0 palmitik asit, %4.2 stearik asit ve %0.6 behenik asittir (üretici firma, Marsa, tarafından sağlanmıştır). Saponifikasyon değerleri sırasıyla % 0.0566 ve 132'dir.

Termostabil triaçilgliserol hidrolaz (E.C. no. 3.1.1.3)'ların bazı özellikleri: Novo 435'in aktivitesi 10.000 propil laurat unit/gr'dır. İmmobilizasyon materyali, boncuk şeklindeki makroporlu akrilik rezindir. %1-2 maksimum 3 (ağırlıkça) su içerir. TL IM'nin aktivitesi 250 interesterifikasyon unit (IUN)/g'dır. Silikaya immobilize edilmiştir. RM IM anyon değişim rezinine immobilize edilmiştir. RM IM %2-3 (ağırlıkça) su içerir. Aktivitesi 150 IUN/g'dır [Novozym 435 product sheet, Lipozyme TL IM product sheet, Lipozyme RM IM product sheet].

3.2. Yöntem

3.2.1. Enzim Yıkaması Yapılarak Solventsiz Ortamda Ayçiçek Yağın Metanolizi

9.140 g ayçiçek yağı ve 0.332 g MeOH (yağa göre 1 mol) 50 ml'lik falkon tüpü içerisine dikkatlice tartılmıştır. Bu süspansiyon el ile çalkalanıp homojenize edilmiştir. Falkon tüpü $\pm 1^\circ\text{C}$ hassas su banyosuna koyulmuş ve sıcaklık dengesinin sağlanması için yaklaşık 30 dakika bekletilmiştir. Transesterifikasyon reaksiyonları

immobilize enzim ilaveleri ile başlanmıştır. Reaksiyonlar üç lipazın her birisi ile 40-60°C arasındaki sıcaklıklarda, yağa göre ağırlıkça %4-15 arasında değişen miktarlarda lipazlar kullanılarak 200-500 rpm karıştırma hızlarında yapılmıştır. Ürün oluşumu sabit bir seviyeye eriştiğinde (MeOH ilavesinden iki saat sonra) immobilize enzimler reaksiyon ortamından alınarak, önce 5 ml ter-BüOH ile iki kez ardından 5 ml hekzan ile iki kez yıkandıktan sonra tekrar reaksiyon karışımı içerisine koyulmuşlardır. Bu enzim yıkama işleminin peşinden 0.332 g MeOH ilavesi yapıp aynı şartlarda ürün oluşumu sabit bir seviyeye erişinceye kadar (MeOH ilavesinden iki saat sonra) reaksiyona devam edilmiştir. Aynı şekilde ikinci enzim yıkaması ve peşinden 3üncü 1 mol MeOH ilavesi yapılmış ve reaksiyon sürdürülmüştür. Ürün oluşumu sabit bir seviyeye eriştiğinde (MeOH ilavesinden iki saat sonra) 4üncü MeOH ilaveside yapılmıştır. Belli zamanlarda alınan 10 µl örnekler 990 µl aseton ile seyreltilip Kısım 3.2.3’de belirtildiği şekilde HPLC analizleri yapılmıştır.

3.2.2. Enzim Yıkaması Yapılmadan Solventsiz Ortamda Lipaz-Katalizli Ayçiçek Yağın Metanolizi

Reaksiyonlar kısım 3.2.1.’de belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Farklı olarak immobilize enzimin yıkama işlemi yapılmamıştır. Yağa göre ağırlıkça %4 Novo 435 ve RM IM lipazlar kullanılmıştır; fakat TL IM lipazdan %10’da kullanılıp deney yapılmıştır. Diğer bütün şartlar kısım 3.2.1 ile aynıdır.

3.2.3. HPLC Analizleri

HPLC analizleri, gaz giderici vakum sistemi, dörtlü gradient pompa, 1-900 µl hacimli “loop”, termostatlı kolon (10-80±0.15 °C) bölümü ve diod-“array” UV-vis dedektör ünitelerinden oluşan HP1100 (Agilent Tech., USA) sıvı kromatografi cihazıyla yapılmıştır. Yağ moleküllerinin ayrıştırılmasında ACE 3 C18 (150 x 4.6 mm i.d. 3 µm) kolon ve koruma kolon ACE 3 C18 (30 x 4.6 mm i.d. 3 µl) birlikte kullanılmıştır. TAG, DAG, MAG ve YAME’leri ayrıştırmak için akış hızı, kolon sıcaklığı, dedektör dalga boyu ve enjeksiyon hacmi, aynı mobil faz oranları farklı iki HPLC metodu önerilmiştir.

HPLC Metod 1 beş aşamadan oluşmaktadır.

- I. aşama: %100 asetonitril (ACN) ile 5 dk izokratik yıkama (elüsyon).
- II. aşama: 3 dk'lık lineer gradient sonunda %50 ACN+%50 aseton karışımına geçiş.
- III. aşama: %50 ACN+%50 aseton karışımı ile 12 dakika izokratik yıkama.
- IV. aşama: %50 ACN+%50 aseton karışımından %30 ACN+%70 asetona dik (step) geçiş.
- V. aşama: %30 ACN+%70 aseton ile 25 dk izokratik yıkama aşamalarıdır.

HPLC Metod 2 üç mobil faz aşamasından oluşmaktadır.

- I. aşama: %100 ACN ile 5 dk izokratik yıkama.
- II. aşama: 3 dk'lık lineer gradient sonunda %30 ACN+%70 aseton karışımına geçiş.
- III. aşama: %30 ACN+%70 aseton karışımında 20 dk izokratik yıkama aşamalarıdır.

Mobil faz akış hızı 1 ml/dakika (dk), kolon sıcaklığı 10°C enjeksiyon hacmi 5-20 µl'dir.

3.2.4. HPLC Kolon Sıcaklığının Ayçiçek Yağ TAG'larının Ayrışmasına Etkisinin İncelenmesi

Kolon sıcaklığının ayçiçek yağ TAG'larının ayrışmasına etkisini incelemek için 40°C, 30°C, 20°C ve 10°C sıcaklıkları denenmiştir. HPLC cihazı belirtilen kolon sıcaklıklarında 1 ml/dk akış hızı, %70 aseton+%30 ACN mobil fazı ile yarım saat şartlanmıştır. 10 mg/ml (asetonda) ayçiçek yağdan 10 µl enjeksiyonlar yapıp, ayrıştırılan TAG molekülleri UV dedektör (210 nm dalga boyu) ile takip edilmiştir

3.2.5. HPLC/Kütle Spektroskopisi (HPLC/MS) Analizleri

HPLC/kütle spektrometre analizleri HPLC 1100/MSD Ion Trap SL Model (Agilent Tech. USA) cihaz ile gerçekleştirilmiştir. RP-HPLC metod 1 şartlarında Zorbax XDB C18 (150 x 4.6 mm i.d., 5 µm) kolon, diod "array" UV dedektöre seri bağlı atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon probu kullanılmıştır. Kütle spektrometre dataları m/z (kütle/yük) 35-1000 arasında kaydedilmiştir. Diğer

parametreler: alternatif iyon polarite modu, nebulizing gaz basıncı 60 psi, kurutucu gaz akış hızı 5 L/dk şeklindedir. Kurutucu gaz ve APCI ısıtıcılarının sıcaklıkları sırasıyla 350°C ve 400°C'dir. APCI-MS ile belirlenen tüm bileşiklerin elüsyon zamanları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

3.2.6. Kalibrasyon Grafiklerinin Hazırlanması

MeL kalibrasyon grafiğini çizmek için 5 mg/ml stok MeL çözeltisi (asetonda) hazırlanmıştır. Stok çözelti seri dilüsyon ile 2.5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.2 mg/ml ve 0.1 mg/ml son konsantrasyonlara seyreltilmiştir. MeO kalibrasyon grafiğini çizmek için 10 mg/ml stok MeO çözeltisi hazırlanmıştır. Stok MeO 5 mg/ml, 3 mg/ml, 1 mg/ml son konsantrasyonlara seyreltilmiştir. 20 mg/ml'lik MeS ve MeP çözeltileri hazırlanmıştır. MeL, MeO, MeS ve MeP çözeltilerinden HPLC metod 2 şartlarında 10-15 ve 20 µl enjeksiyonlar yapılmış ve madde miktarı relatif integre alan grafikleri oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafikleri en az iki kez tekrarlanıp standart sapmalar hesaplanmıştır. 5 mg/ml stok dioleoyl gliserol (%85 1,3-OL DAG; %15 1,2-OL DAG) çözeltisi ve 1 mg/ml dioleoyl gliserol çözeltileri hazırlanmıştır. Dilinoleil gliserol için de kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur.

LL DAG kalibrasyon eğrisini çizmek için hazırlanan 5 mg/ml LL seri dilüsyon ile 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.05 mg/ml ve 0.01 mg/ml son konsantrasyonlara seyreltilmiştir. 1-oleil-*rac*-gliserol (1-L) kalibrasyon eğrisini çizmek için 5 mg/ml stok çözelti hazırlanmıştır. Stok 1-L, 2.5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.2 mg/ml ve 0.1 mg/ml son konsantrasyonlara seyreltilmiştir. LL DAG ve 1-L çözeltilerinden HPLC metod 2 şartlarında 10-15 ve 20 µl enjeksiyonlar yapılmış ve madde miktarı relatif integre alan grafikleri oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafikleri en az iki kez tekrarlanıp standart sapmalar hesaplanmıştır

3.2.7. Kinetik Deneyleri

Lipazların kinetik deneyleri yağ konsantrasyonu 25-500 mM MeOH konsantrasyonu 50-200 mM arasında değiştirilerek (heptanda) yapılmıştır. Kinetik deneylerde TL IM ve RM IM'den 10±0.05 mg, Novo 435'den 50±1 mg kullanılmıştır. 50 ml'lik erlenmeyerde yapılan deneylerin toplam hacmi 5 ml'dir.

Sabit deney şartları: $41\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 150 oscillation/dakika karıştırma hızıdır. Sıcaklık dengesini sağlamak için belirtilen konsantrasyonlardaki yağ ve MeOH sabit deney şartlarında 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra belirtilen miktardaki enzim ilavesi ile reaksiyonlar başlatılmıştır. 10uncu ve 20inci dakikalarda alınan 50'şer μl örnekler aseton ile 5 kat seyreltilerek HPLC metod 2 şartlarında analizleri yapılmıştır (Kısım 3.2.3).

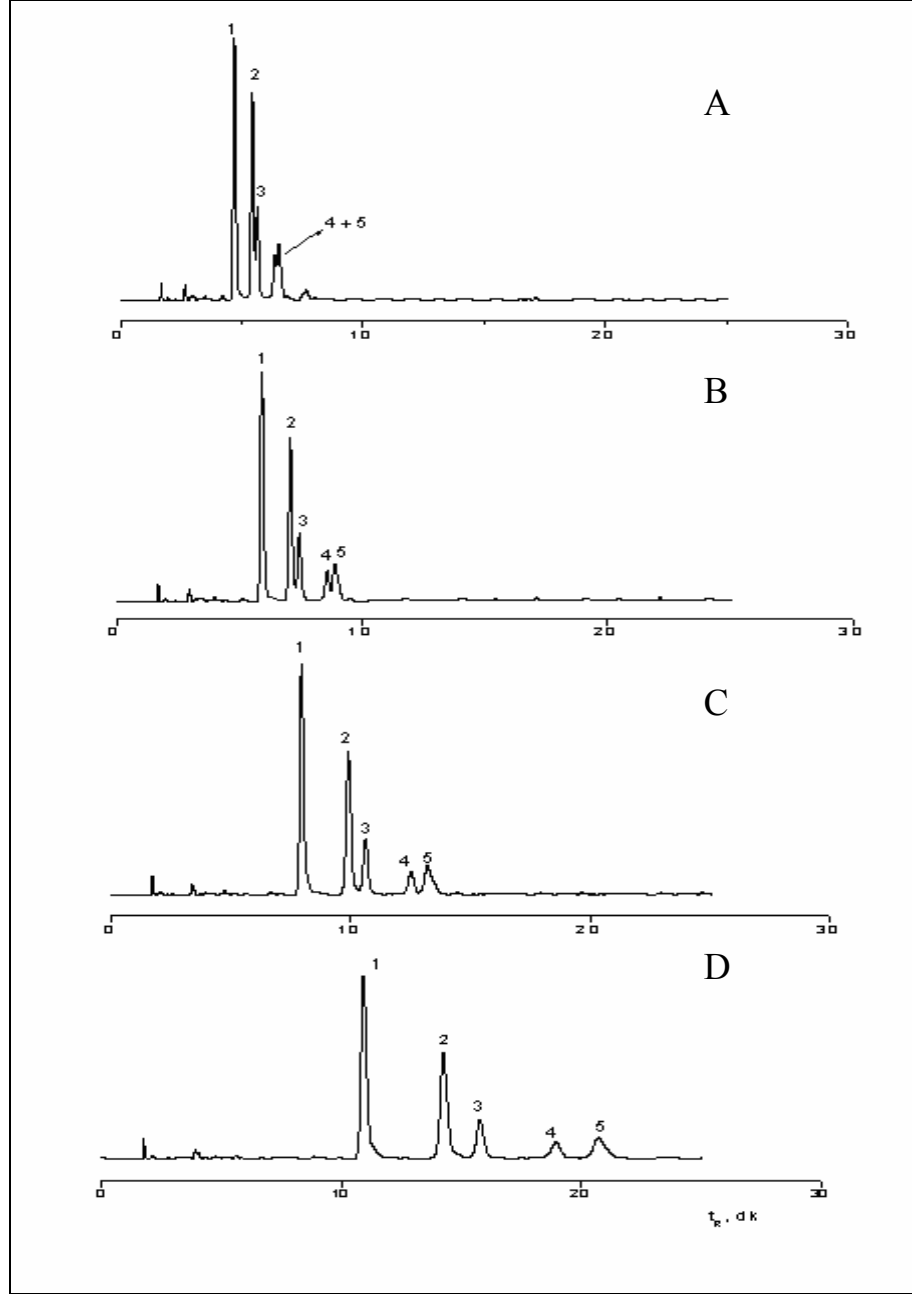
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Lipaz-Katalizli Ayçiçek Yağın Metanoliz Reaksiyon Ürün ve Araürünlerinin HPLC ile Belirlenmesi

Ayçiçek yağ ve metanolün lipaz-katalizörlüğündeki transesterifikasyon reaksiyonunu takip edebilmek için, kısım 3.2.1.'de açıklanan yeni iki farklı ters-faz HPLC prosedürü geliştirilmiştir. Uzun kolonlar (250x4.6 mm i.d., 3 µm) yaygın kullanılmasına karşın, elimizde kısa (150x4.6 mm i.d., 3 µm) C18 kolonu bulunduğundan, yağ moleküllerini (TAG'ları) daha iyi ayırtmak için düşük kolon sıcaklığı uygulanmıştır. Başlangıçta %70 aseton+%30 asetonitril (ACN) mobil fazı ile yaptığımız izokratik yıkama, 10°C kolon sıcaklığında TAG'ların ayrışmasını sağlarken; yağ asidi metil esterlerin, mono ve diaçilgliserollerin ayrıştırılmasında etkili olmamıştır. Aseton ve asetonitrilin kullanıldığı iki farklı ters faz HPLC metodu, birçok izokratik ve gradient mobil faz denemeleri yapıldıktan sonra oluşturulmuştur.

4.1.1. HPLC Kolon Sıcaklığının Ayçiçek Yağ TAG'larının Ayrışmasına Etkisi

RP-HPLC ile TAG analizi yapılırken düşük kolon sıcaklığında TAG moleküllerinin daha iyi ayrıştığı bulunmuştur (Şekil 4.1). Jensen *et. al.* [1981], LiChrosorb RP-18 kolonu, asetonitril:hekzan:tetrahidrofuran (ağırlıkça w/w/w 224:123.2:39.6) mobil fazı kullanıp 14.5-25.5°C sıcaklıklarında zeytin yağı TAG'larını ayrıştırılmasını inceleyerek, en iyi ayrıştırmanın 14.5°C'de olduğunu bulmuştur. Çalışmamızda, bu çalışma ile benzer sonuca ulaşılmıştır. Hidrofobik kromatografide ayrıştırılmaya çalışılan moleküller, mobil faz ve sabit faz ile geri dönüşümlü (denge) etkileşimlere girmektedirler. Düşük sıcaklıkta TAG'ların mobil fazda daha az çözünmesi, sabit faz ile etkileşimlerini arttırmış ve daha fazla ayırıştırma sağlanmış olabilir. Bu çalışmada düşük sıcaklıkta analiz yapmak, analiz süresini biraz uzatmıştır; fakat literatür çalışmalarında da yağların HPLC ile analizleri, bizim çalışmamızda olduğu gibi 20-25 dk sürmüştür [Holcapek *et. al.*, 1999; Deineka *et. al.*, 2003].

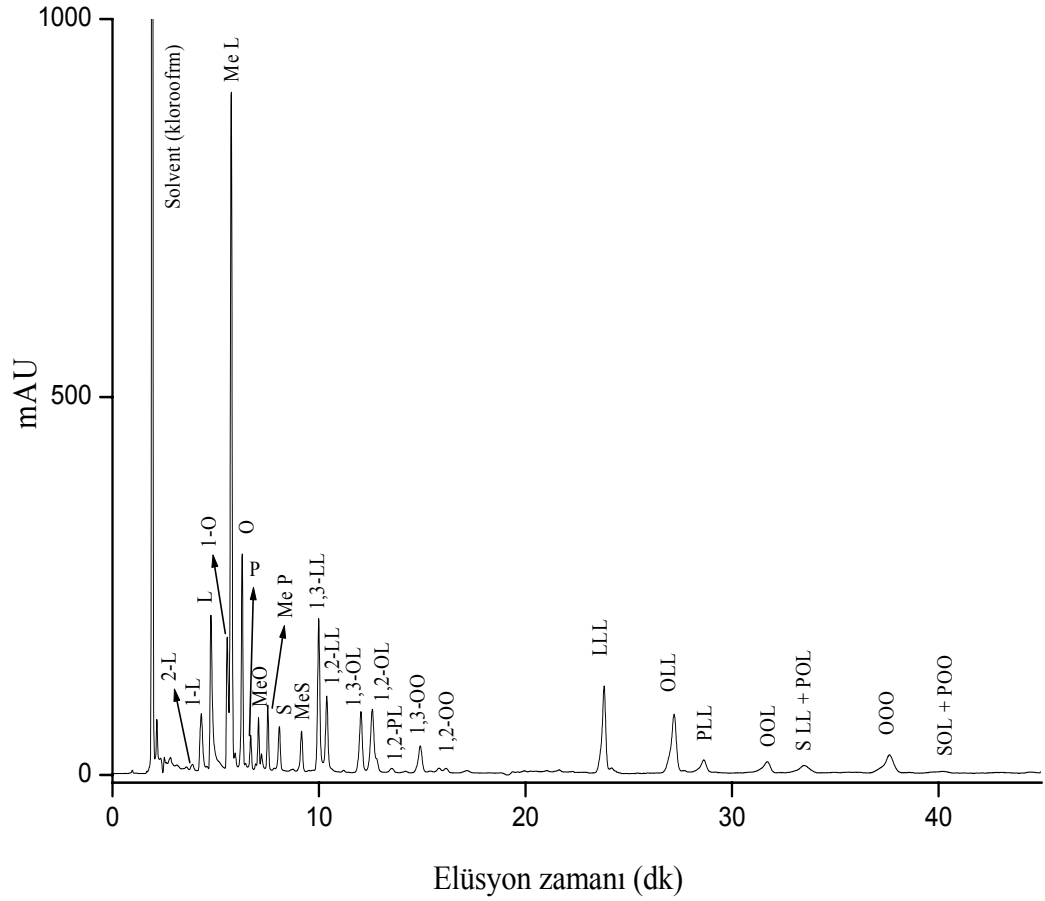


Şekil 4.1. Farklı kolon sıcaklıklarında ayçiçek yağındaki TAG moleküllerinin ters-faz HPLC ile ayrıştırılması. A, 40°C; B, 30°C; C, 20°C; D, 10°C. 1, trilinolein; 2, oleil-dilinolein; 3, palmitil-dilinolein; 4, dioleil-linolein ve 5, stearil-dilinolein+palmitil-oleil-linolein. HPLC şartları: %70 aseton+%30asetonitril ile izokratik yıkama yapılmıştır. Diğer şartları kısım 3.2.3’de açıklanmıştır.

4.1.2. Ters-Faz HPLC (RP-HPLC) Metodları

Bu tez çalışmasında iki farklı HPLC metodu geliştirilmiştir. Moleküllerin ayrıştırılmasının daha düzgün olduğu HPLC metod 1, kütle spektrometre analizinde kullanılmıştır. 40 dakika süren analizde iki ayrı gradient aşama uygulanmıştır. Ayçiçek yağı lipaz (RM IM) katalizli metanolizi sırasında gözlemlenen maddelerin birinci metod ile elde edilen HPLC kromatogramı Şekil 4.2’de gösterilmiştir. Bu maddelerin kolondan çıkış (elüsyon) zamanları Çizelge 4.1’de verilmiştir (madde yapıları MS dedektör ile belirlenmiştir. Metod 1, aynı eşdeğer karbon sayısına (ECN) sahip 1,2-SL/1,2-PO (ECN = 32) ve 1,2-OO/1,3-SL/1,3-PO (ECN = 32) DAG’lar haricindeki diğer DAG’ların, SLL/POL (ECN = 46) ve SOL/POO (ECN = 48) haricindeki diğer TAG’ların, yağ asidi metil esterlerin (YAME’ler) ve monoaçilgliserollerin (MAG’lar) birbirinden ayrıştırılmasını sağlamıştır. Elüsyon zamanları MAG<YAME<DAG<TAG sırasına göre artmıştır. 1,3-*sn* izomerler, 1,2-*sn* izomerlerinden ve 2-*sn* izomerde 1-*sn* izomerlerinden daha önce ayrılmışlardır.

Ayçiçek yağ ve MeOH’nın lipaz-katalizli transesterifikasyonu sırasında gözlemlenen MAG, DAG ve TAG moleküllerinin analizi, HPLC-kütle spektrometre ile yapılmıştır. Ayrıca saf standartlar kullanılarak yapılan analizlerin bir kısmı doğrulanmıştır. Kütle spektrometre analizleri birlikte yıkanan 1,2-OL/1,3-PL (ECN=30), 1,2-OO/1,3-SL/1,3-PO (ECN=32), 1,2-SL/1,2-PO (ECN=32), SLL/POL (ECN=46) ve SOL/POO (ECN=48) maddelerinin belirlenmesini sağlamıştır. Holcapek *et. al.* [1999] bu gibi çakışan bazı DAG ve TAG APCI-MS piklerini TIC ve seçilen m/z kromatogramlarını kullanıp analiz etmiştir. Şekil 4.3’de pozitif-iyon mod toplam iyon kromatogramından seçilen m/z 339 ve 337’deki iyonlar gösterilmiştir. Böylece birlikte yıkanan bileşiklerin gerçek elüsyon zamanları belirlenmiştir. Çizelge 4.1’de tespit edilen bileşiklerin kütleleri ve relatif alıkonma zamanları gösterilmiştir. Bir diğer cihazdan elde edilen alıkonma süreleri değişebilmektedir. Bundan dolayı her bir grup için standart bileşikler (O asit, 1-O, MeO, 1,3-OO ve OOO) kullanılıp relatif alıkonma süreleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).



Şekil 4.2. RM IM-katalizli ayçiçek yağın metanolizi sırasında gözlemlenen maddelerin ve bazı standartların RP-HPLC Metod 1 şartlarında elde edilen HPLC kromatogramı. HPLC Metod 1 Şartları : C18 kolon, 1 ml/dk akış hızı, 10 °C kolon sıcaklığı, 0.dk %100 ACN, 3.dk %50 ACN+%50 aseton, 15.dk %50 ACN+%50 aseton, 15.01 dk %30 ACN+%70 aseton, 40.dk %30 ACN+%70 aseton, 45.dk %100 ACN. Analizi yapılan madde RM IM-katalizli reaksiyondan alınan 10 mg/ml'lik bir numunedir. Bu numunenin kromatogramında ilave olarak 4.12 µg OOO; 7.70 µg 1-O; 2.87 µg OO; 11.37 µg MeP; 14.38 µg MeS; 12.17 µg P; 20.62 µg S; 3.17 µg ayçiçek yağ hidroliz örneğinden gelen piklerde görülmektedir. (Kısaltmalar Tablo 4.1. de açıklanmıştır). İlave edilen maddeler, aynı HPLC şartlarında tek tek de analiz edilip Şekil 4.2 ile karşılaştırılmışlardır.

Çizelge 4.1. Lipaz-katalizli ayçiçek yağ ve metanolün transesterifikasyonu sırasında HPLC/MS ile belirlenen maddelerin alıkonma süreleri (t_R) ve molekül ağırlıkları. HPLC şartları: Kısım 3.2.3’de belirtilen HPLC metod 1’dir.

t_R (dk)	r^a	İsim	Kısaltma	ECN ^b	M.K. ^c
<i>Yağ asitleri</i>					
5.5	0.74	Linoleik asit	L		279.3
6.6	1.00	Oleik asit	O		281.3
7.5	1.21	Palmitik asit	P		255.3
9.1	1.60	Stearik asit	S		283.3
<i>Monoağılgliceroller</i>					
4.5	0.66	2-Monolinolein	2-L	14	355.3
4.8	0.75	1-Monolinolein	1-L	14	355.3
5.4	0.94	2-Monoolein	2-O	14	357.3
5.6	1.00	1-Monoolein	1-O	16	357.3
<i>Yağ asidi metil esterler</i>					
6.1	0.79	Linoleik asit metil ester	MeL		293.3
7.1	1.00	Oleik asit metil ester	MeO		295.3
7.3	1.06	Palmitik asit metil ester	MeP		269.3
9.9	1.60	Stearik asit metil ester	MeS		297.3
<i>Diağılgliceroller</i>					
9.7	0.60	1,3-Dilinolein	1,3-LL	28	617.5
10.0	0.62	1,2-Dilinolein	1,2-LL	28	617.5
11.7	0.76	1,3-Oleoil-linoleil-glicerol ^d	1,3-OL	30	619.5
12.2	0.80	1,2-Oleoil-linoleil-glicerol ^d	1,2-OL	30	619.5
12.4	0.82	1,3-Palmitil-linoleil-glicerol ^d	1,3-PL	30	593.5
13.0	0.87	1,2-Palmitil-linoleil-glicerol ^d	1,2-PL	30	593.5
14.6	1.00	1,3-Diolein	1,3-OO	32	617.5
15.2	1.05	1,2-Diolein	1,2-OO	32	617.5
15.3	1.06	1,3-Steril-linoleil-glicerol ^{dd}	1,3-SL	32	619.5
15.4	1.07	1,3-Palmitil-oleil-glicerol ^d	1,3-PO	32	595.6
16.3	1.14	1,2-Stearil-linoleil-glicerol ^d	1,2-SL	32	619.5
16.4	1.15	1,2-Palmitil-oleil-glicerol ^d	1,2-PO	32	595.6
18.9	1.35	1,3-Stearil-oleil-glicerol ^d	1,3-SO	34	621.8
19.5	1.40	1,2-Stearil-oleil-glicerol ^d	1,2-SO	34	621.8
<i>Triagılıgliceroller</i>					
22.8	0.62	Trilinolein	LLL	42	879.7
25.9	0.72	Oleil-dilinoleil-glicerol ^d	OLL	44	881.8
27.0	0.75	Palmitil-dilinoleil-glicerol ^d	PLL	44	855.8
29.8	0.84	Dioleil-linoleil-glicerol ^d	OOL	46	882.7
31.2	0.88	Stearil-dilinoleil-glicerol ^d	SLL	46	883.8
31.4	0.89	Palmitil-oleil-linoleil-glicerol ^d	POL	46	856.7
35.1	1.00	Triolein	OOO	48	883.2

Çizelge 4.1 devamı

t_R (dk)	r^a	İsim	Kısaltma	ECN ^b	M.K. ^c
36.6	1.05	Stearil-oleil-linoleil-gliserol ^d	SOL	48	884.3
37.1	1.06	Palmitil-diolein ^d	POO	48	857.6

^a Relatif alıkonma süreleri $r = (t_R - t_M)/(t_S - t_M)$. t_R net alıkonma süresi, t_S her bir gruptaki standart maddenin alıkonma süresi (standartlar oleik asit, monoolein, oleik asit metil ester, diolein, triolein) ve t_M (ölü hacim) = 2.4

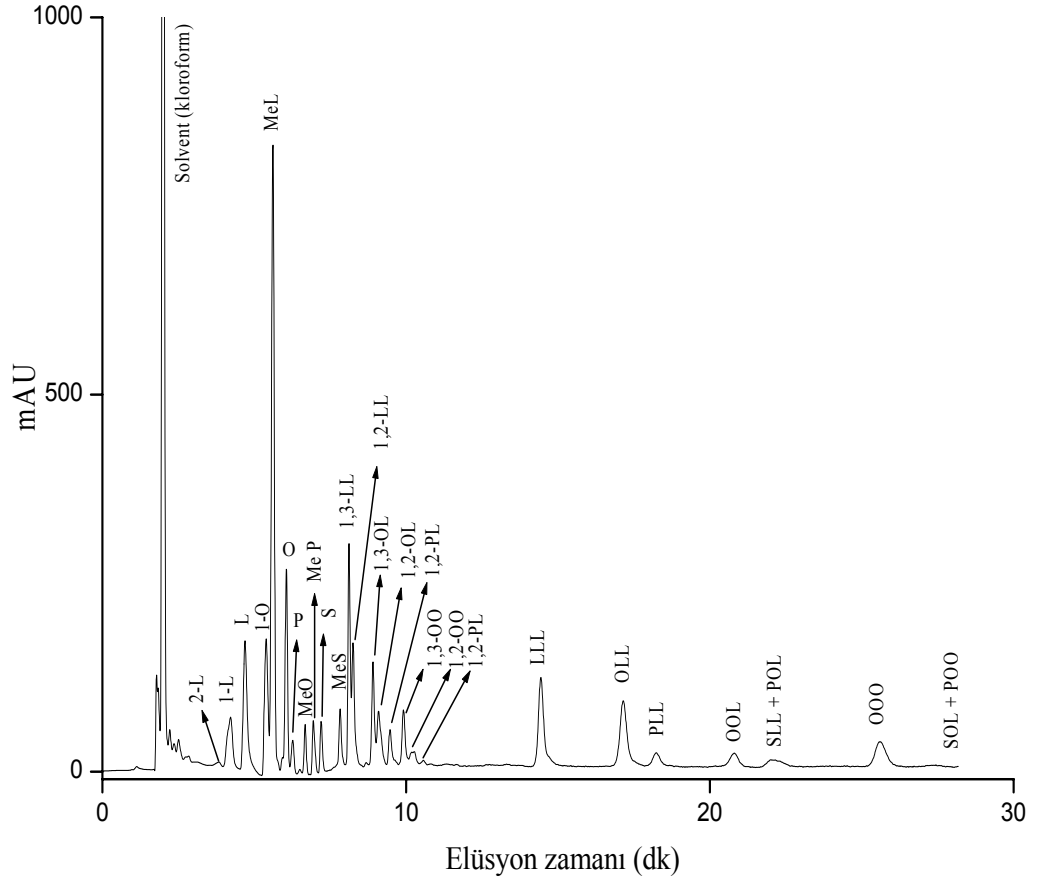
^b ECN ekivalent karbon sayısıdır, $ECN = KS - 2 \text{ ÇB}$, KS tüm açıl gruplarındaki toplam karbon sayısı ve ÇB çift bağ sayısıdır.

^c M.K. = Moleküler kütle.

^d Pozisyonel izomerlerdir (örneğin, 1,2-LL-3-O ve 1,3-LO-2-L). Yağ asitlerinin 1-*sn*, 2-*sn* ve 3-*sn* pozisyonları belirlenmemiştir

HPLC metod 1'e ilave olarak, ikinci bir HPLC metodu geliştirilmiştir. HPLC metod 2'nin oluşturulma gayesi analiz süresini biraz daha kısaltmak; fakat aynı zamanda ayrıştırma sağlamaktır. Kısım 3.2.3'de şartları belirtilen HPLC metod 2 transesterifikasyon veriminin 25-30 dk'lık kısa bir sürede belirlenmesini sağlamıştır. Şekil 4.4'de bu şartlar altında lipaz (RM IM)-katalizli reaksiyondan alınan bir örneğin HPLC kromatogramı gösterilmiştir. HPLC metod 1 ve HPLC metod 2'de maddelerin elüsyon profilleri benzerlik göstermiştir (MAG<YAME<DAG<TAG). HPLC metod 2, 1,2-LL/1,3-LL ve 1,2-OL/1,3-OL pozisyonel izomerlerin kısmi ayrışmasını sağlamıştır; fakat ayrıştırma metod 1'de olduğu kadar belirgin değildir.

Deineka *et. al.* [2003] 40°C kolon sıcaklığında, Diasfer-110-C18 kolonu ve aseton/asetonitril (80:20) izokratik mobil fazı kullandıklarında ayçiçek yağın HPLC kromatogramında sırasıyla LLL, OLL, PLL, OOL ve SLL+LOP'a ait 5 ana pik ve OOO ve SOL+POO'ya ait iki küçük pik elde etmiştir. Çalışmamızda kullandığımız ayçiçek yağın kompozisyonu belirtilen çalışma ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca Holcapek *et. al.* [1999], kimyasal-katalizli MeOH ile kolza yağın transesterifikasyonunu RP-HPLC ile takip etmiştir. Literatür bilgimize göre bu tez çalışması lipaz-katalizli metil ester üretimi sırasında gözlemlenen her bir bileşenin HPLC ile ayrıştırılıp tespit edildiği ilk çalışmadır.



Şekil 4.4. RM IM-katalizli ayçiçek yağın metanolizi sırasında gözlemlenen maddelerin ve bazı standartların RP-HPLC Metod 2 şartlarında elde edilen HPLC kromatogramı. TAG, DAG ve MAG pik içerikleri LC-MS ile belirlenmiştir (Ek 1). RP-HPLC Metod 2 şartları: Guard kolon + C18 kolon, 1 ml/dk akış hızı, 10 °C kolon sıcaklığı, 0.dk %100 ACN, 3.dk %30 ACN+%70 aseton, 40.dk %30 ACN+%70 aseton. Diğer şartlar Şekil 4.2 ile aynıdır.

4.1.3. HPLC/APCI-MS ile Pik İçeriklerinin Belirlenmesi

Lipaz (RM IM)-katalizli bir reaksiyon örneği pik içeriklerinin belirlenmesi için kısım 3.2.5’de açıklanan şartlarda APCI-MS ile analiz edilmiştir ve böylece oluşan ürün ve araürünlerin her birisi tespit edilmiştir. Tezin son kısmında verilen birinci ekte kütle spektrometre analiz sonuçları (pozitif iyon APCI-MS spektrumları) gösterilmiştir. Çizelge 4.2’de pozitif-iyon modunda her pikte mevcut bileşik yada bileşiklere ait önemli iyonların relatif bollukları ve kütleleri gösterilmiştir. TAG’ların pozitif APCI-MS spektrumlarında görülen ana iyonlar: protonlanmış molekül $[M+H]^+$ (iyon A) ve bu iyondan bir yağ asidi kopması ile oluşan $[M+H-R_iCOOH]^+$ (iyon C)’dir. Ayçiçek yağında TAG’lara ait beş ana pik (LLL, OLL, PLL, OOL ve SLL+POL) ve iki küçük pik (OOO ve POL+POO) gözlemlenmiştir. Beklenildiği gibi tek çeşit yağ asidi içeren TAG moleküllerinden (örneğin LLL) tek C iyonu, iki çeşit yağ asidi içeren TAG moleküllerinden (örneğin OLL, LLP, OOL ve SLL) iki C iyonu, üç çeşit yağ asidi içeren TAG moleküllerinden (örneğin POL) 3 tane C iyonu oluşmuştur (Bkz. Ek 1; LLL, OLL ve POL kütle spektrumları). OLL, LLP, OOL ve SLL de C iyonları için beklenen istatistiksel bolluk oranı 2:1 dir. Çünkü bu TAG’lardan iki tane OL^+ ve bir tane LL^+ iyonu oluşması gerekir. Fakat oranlar; $[OL]^+/[LL]^+$ 1.6, $[LP]^+/[LL]^+$ 1.3, $[OL]^+/[OO]^+$ 1.7 ve $[SL]^+/[LL]^+$ 1.1 olarak bulunmuştur. Ek olarak OLP için beklenen C iyonlarının bolluk oranı 1:1:1’dir OLP’de C iyonlarının bolluk oranı $[OP]^+:[OL]^+:[LP]^+$ 1:1.9:1 şeklindedir. İstatistiksel ve deneysel değerler arasındaki bu uyumsuzluğun nedeni belli değildir; fakat sonuçlar *sn-1*, *sn-2* ve *sn-3* pozisyonlarındaki kopma enerjilerinin aynı olmadığını göstermektedir. Diğer taraftan Holcapek *et. al.* [1999] TAG MS analizlerinde, farklı $[M+H-R_iCOOH]^+$ iyonlarının relatif bolluklarının hem iyonlaştırma tekniğine hem de cihazın cinsine bağlı olduğunu belirtmiştir. Bizim çalışmamız Holcapek ve arkadaşlarının çalışmasıyla uygunluk göstermektedir. Pozitif iyon APCI-MS sonuçları TAG yağ asitlerinin belirlenmesinde yeterli olmuş; fakat *sn-* numaralarının belirlenmesini sağlamamıştır.

DAG’ların kütle spektrumlarında, protonlanmış moleküle ($[M+H]^+$) ait iyonla birlikte $[M+H-H_2O]^+$ ve $[M+H-R_iCOOH]^+$ iyonları da oluşmuştur. Holcapek *et. al.* [1999], çalışmasında $[M+H-H_2O]^+/[M+H-R_iCOOH]^+$ oranını kullanıp 1,3-*sn* ve 1,2-

Çizelge.4.2. Lipaz-katalizli ayçiçek yağ ve metanolün transesterifikasyon reaksiyonunda oluşan maddelerin APCI-MS ile belirlenmesi (Bkz EK 1). Pozitif iyon-APCI kütle spektrumlarındaki iyonların kütleleri ve bu iyonların relatif bollukları parantez içinde verilmiştir^b. HPLC şartları: Kısım 3.2.3'de verilen HPLC metod 1 kullanılmıştır.

Bileşik [M]	Ma ^a	İyon A [M+H] ⁺	İyon B [M+H-H ₂ O] ⁺	İyon C [M+H-R ₂ COOH] ⁺	
2-L	354.3	355.2 (27)	337.3 (100)	---	---
1-L	354.3	355.3 (30)	337.2 (100)	---	---
2-O	356.5	357.3 (21)	339.3 (100)	---	---
1-O	356.5	357.2 (15)	339.3 (100)	---	---
MeL	294.3	295.3 (18)	---	---	---
MeO	296.3	297.2 (13)	---	---	---
1,3-LL	616.5	617.5 (74)	599.5 (100)	337.3 (15)	---
1,2-LL	616.5	617.5 (100)	599.6 (17.5)	337.3 (41)	---
1,3-OL	618.5	619.5 (4)	601.6 (100)	337.6 (6.1)	339.3 (8.3)
1,2-OL	618.5	619.5 (57)	601.5 (73.4)	337.3 (100)	339.3 (90)
1,3-PL	592.5	TE ^c	575.5 (10)	TE	TE
1,2-PL	592.5	593.6 (16)	575.5 (58)	337.3 (100)	313.2 (66)
1,3-OO	621.0	TE	603.6 (100)	339.3 (16)	---
1,2-OO	621.0	621.6 (6)	603.6 (40)	339.3 (100)	---
1,3-SL	620.5	621.6 (17)	603.6 (50)	337.3 (7)	341.3 (10)
1,3-PO	594.5	TE	577.5 (45)	313.3 (5)	339.3 (5)
1,2-SL	620.5	621.6 (17)	603.6 (67)	337.3 (100)	341.3 (67)
1,2-PO	595.9	595.6 (5)	577.5 (69)	339.3 (100)	313.3 (80)
1,3-SO	622.0	TE	605.6 (100)	339.3 (12)	---
1,2-SO	622.0	623.6 (8)	605.6 (61)	339.3 (100)	341.3 (65)
LLL	878.7	879.8 (100)	---	599.6 (22)	---
OLL	880.7	881.8 (100)	---	601.6 (32)	599.6 (20)
PLL	854.7	855.8 (100)	---	599.5 (21)	575.6 (29)
OOL	882.7	883.8 (72)	---	601.6 (100)	603.6 (58.1)
SLL	882.7	883.8 (100)	---	599.6 (28)	603.6 (30.3)
POL	856.7	857.8 (60)	---	601.6 (100)	577.6 (60) 575.5 (50)
OOO	885.4	885.8 (12)	---	603.6 (100)	---
SOL	885.4	885.8 (56)	---	601.5 (100)	603.6 (79) 605.5 (80)
POO	859.4	859.8 (13)	---	603.6 (62)	577.5 (100)

^a Ma = Molekül ağırlığı (formüler ağırlık).

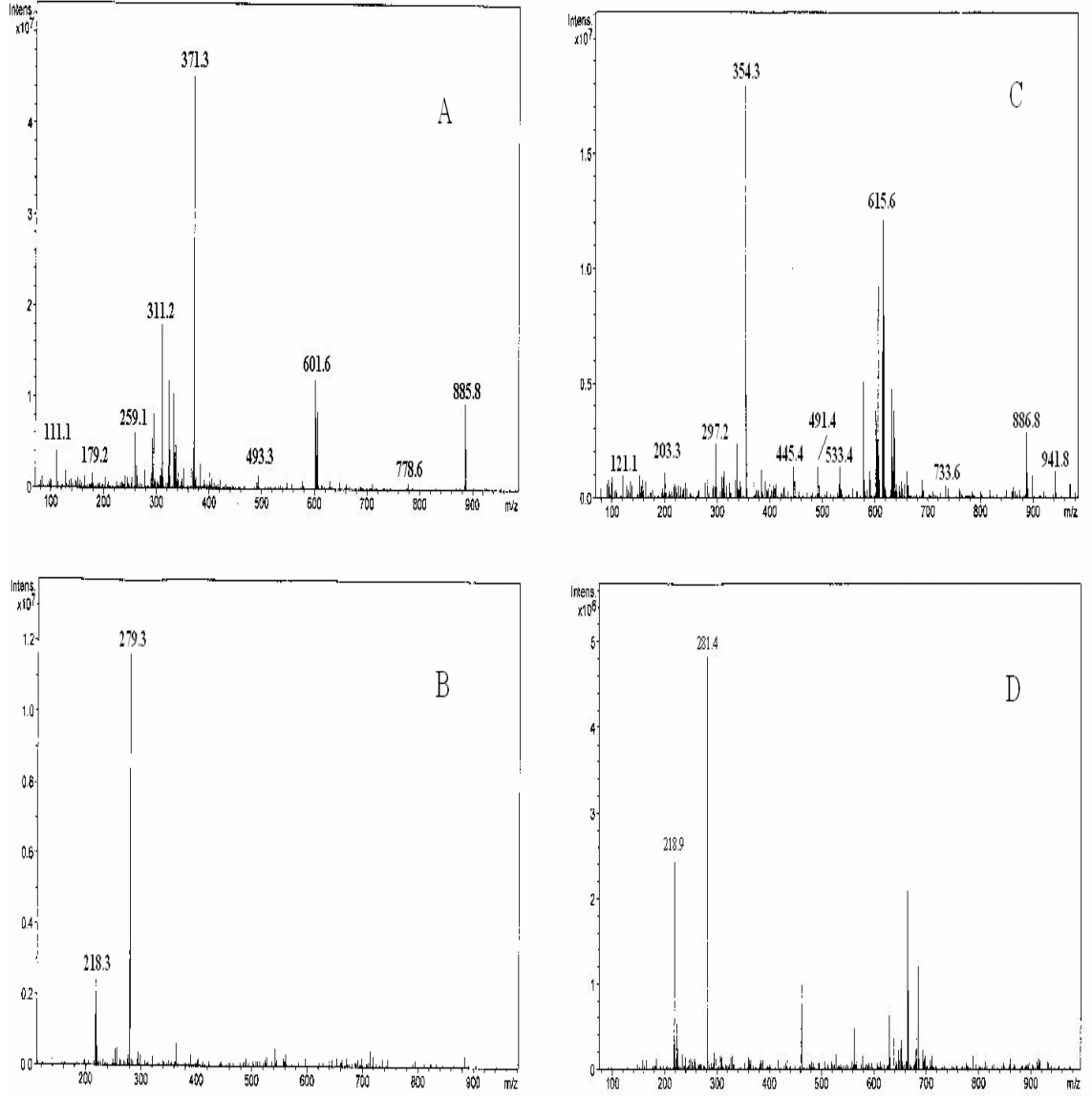
^b Birlikte elüsyon olan maddeler pozitif iyon APCI-MS ile analiz edilmiştir.

^c TE = Tespit edilemedi.

sn izomerlerinin iyon bolluklarını belirlemiş bu oranın 1,3-*sn* izomerlerde 1,2-*sn* izomerlerden daha yüksek olduğunu söylemiştir. Bu kural, LL, OO, OL, LP, SL ve OP'ye ait 1,2-*sn* ve 1,3-*sn* izomerlerin ayırt edilmesini sağlamıştır. Ayrıca LL ve OO pikleri saf standartlar ile de doğrulanmıştır.

MAG'ların (çoğunlukla 2-L ve 1-L) kütle spektrumlarında $[M+H]^+$ ve $[M+H-H_2O]^+$ iyonları oluşmuştur. 2-L ve 1-L maddelerinin kütle spektrumları oldukça benzerdir (Bkz.Ek 1). Bu maddelerin ayırt edilmesi için iki yaklaşım kullanılmıştır: Bunlardan ilki; daha önce RP-HPLC çalışmalarında 2-*sn* izomerlerin, 1-*sn* izomerlerden önce elüsyon oldukları belirtilmesidir [Holcapek *et. al.*, 1999; Jensen *et. al.*, 1981]; ikincisi ise 1(3)-*sn* spesifik TL IM ve RM IM lipazların-katalizlediği ayçiçek yağı MeOH ile transesterifikasyonunun başlangıcında 2-*sn* izomerlerin oluşmasıdır. Dolayısı ile reaksiyon başlangıcında HPLC analizi ile önce 2-MAG'lar görülmüştür.

MeL ve MeO pozitif iyon APCI-MS spektrumlarında en bol iyonların m/z oranları sıra ile 371.3 ve 354.4'dür (Şekil 4.5). Bu değerler gerçek molekül ağırlıklarından sırasıyla 76 ve 57 daha fazladır. MeL ve MeO molekül ağırlıkları ile bu molekül kütleleri arasında bir ilişki kurulamamıştır. Ayrıca bu spektrumlarda diğer iyonlara ait oldukça fazla pik oluşmuştur. Aynı maddelerin, negatifiyon APCI-MS spektrumlarındaki en bol iyonlara ait yük/kütle oranları sırası ile 279.3 (linoleik asit molekül ağırlığı = 279.3) ve 281.4 (oleik asit molekül ağırlığı = 281.4)'dür. Sonuç olarak metil esterlerin tespit edilmesinde negatif iyon APCI-MS, pozitif iyon APCI-MS'den daha avantajlı olmuştur.



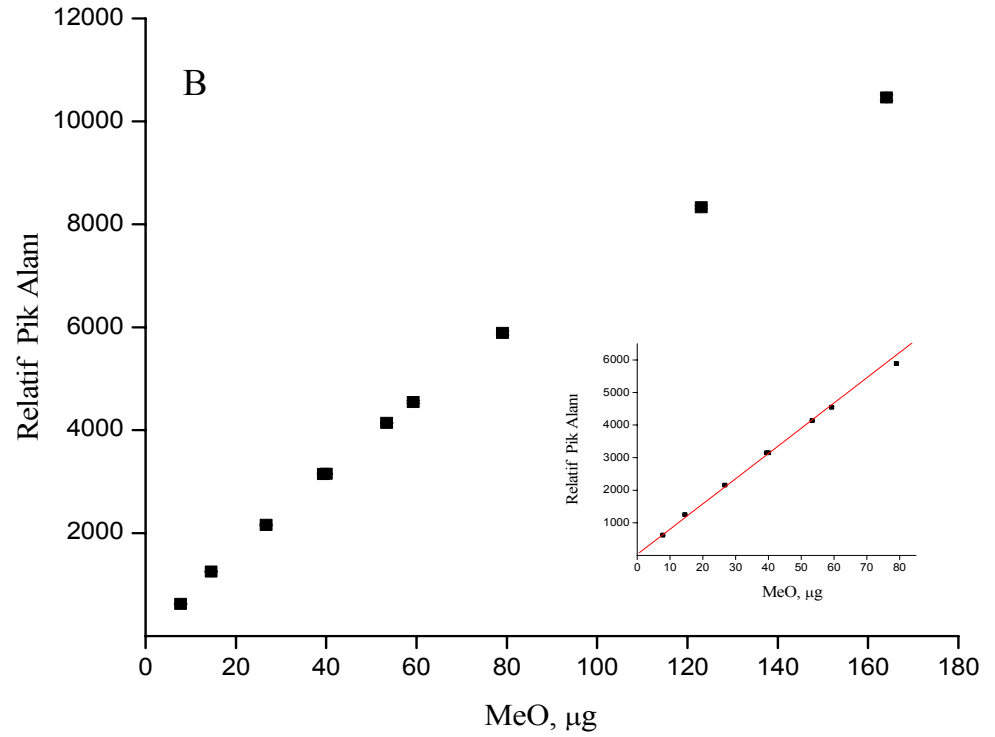
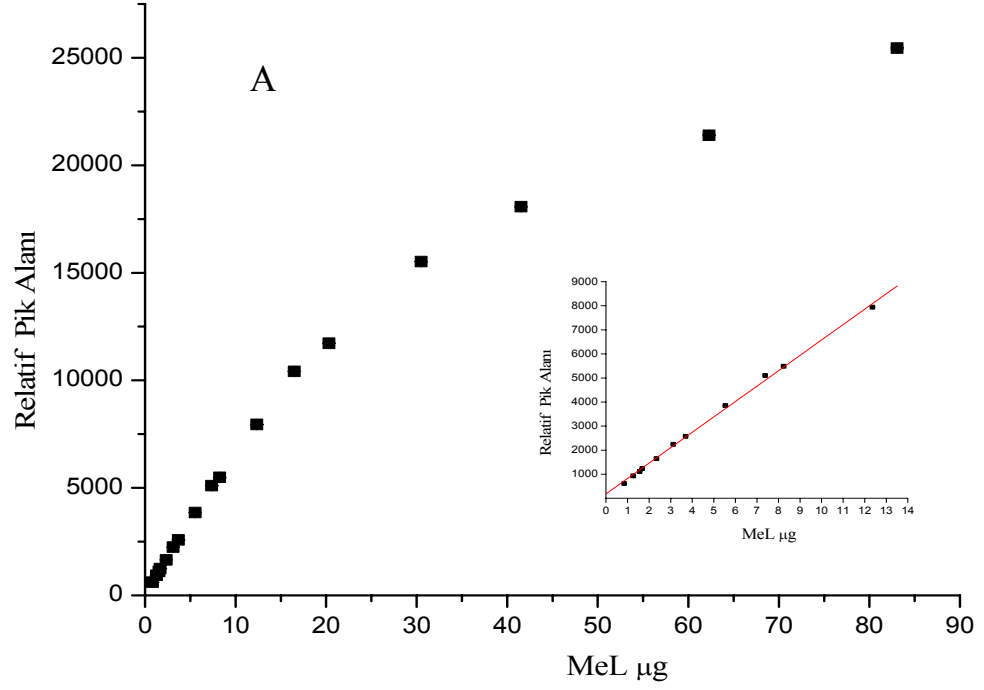
Şekil 4.5. MeL ve MeO'nun, negatif iyon (-) APCI ve pozitif iyon (+) APCI spektrumları . (A) MeL, +APCI; (B) MeL, -APCI, (C) MeO, +APCI; (D) MeO -APCI. HPLC ve MS analiz şartları sırasıyla kısım 3.2.3 ve kısım 3.2.5'de açıklanmıştır.

4.2. Kantitatif Analiz

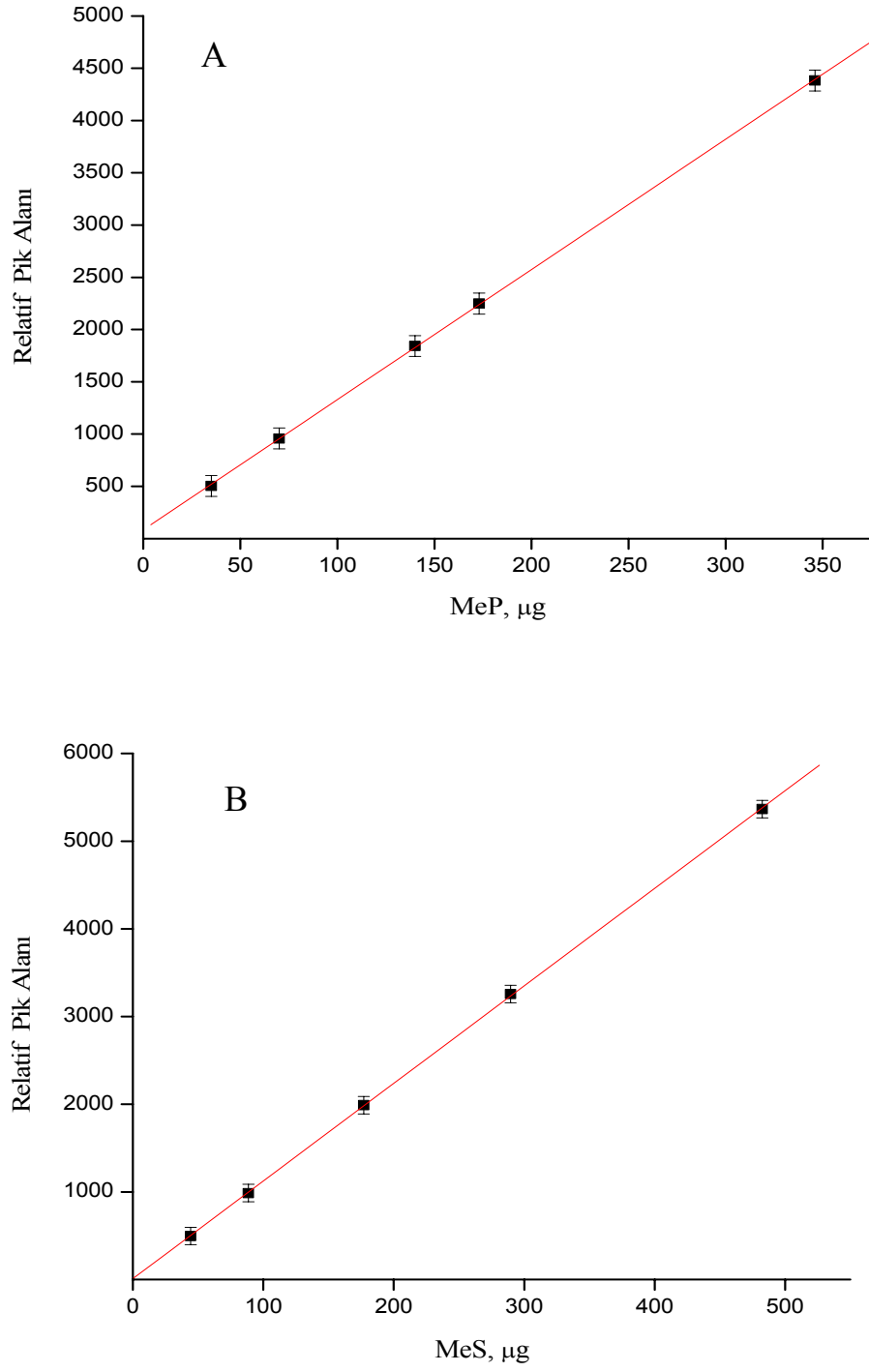
Kinetik ve mekanizma çalışmalarında reaksiyon ürünlerinin ve araürünlerin kantitatif analizi oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışmada lipaz-katalizli yağların metanolizi sonucunda oluşan metil esterlerin (metil esterin), MAG ve DAG'ların konsantrasyonlarının UV dedektör ile 210 nm'de belirlenip belirlenemeyeceğini tespit ettik. Şekil 4.6'de MeL ve MeO, Şekil 4.7'de MeP ve MeS ye ait yağ asidi metil ester standartlarının, miktarlarına karşı çizilen relatif alan grafikleri (kalibrasyon eğrileri) gösterilmiştir. Çizelge 4.3.'de Lineer regresyon analizi ile bu metil ester standartları ve bazı mono- ve diaçilgliserollerin, kalibrasyon eğrilerindeki sabitler gösterilmiştir. MeL ve MeO sırasıyla yaklaşık 14 µg ve 80 µg'dan daha çok olduğunda relatif integre alanlar lineer bölgenin dışında kalmaktadır. Şekil 4.6'de bu iki maddenin konsantrasyonlarının doğru bir şekilde belirlenebileceği bölgeler küçük grafikler halinde gösterilmiştir.

MeS ve MeP miktarı MeL'den oldukça fazla alınmış (yaklaşık 10 kat) ama yine de MeL'nin relatif integre alanı kadar bir alan oluşmamıştır. Buna göre MeS ve MeP'nin 210 nm'de abzorbanları çok düşüktür. Kalibrasyon eğrilerinin korelasyon değerleri sırasıyla 0.99908, 0.99922, 0.99996 ve 0.99997'dir. UV dedektör kullanılıp MeL için 8000 relatif pik alanı MeO için 6000 relatif pik alanına kadar doğru bir konsantrasyon analizi yapılabilmektedir. Daha yüksek alanlarda asetonun da UV abzorbanı daha etkili bir şekilde görülmekte ve konsantrasyon değerleri lineeriteden sapmaktadır.

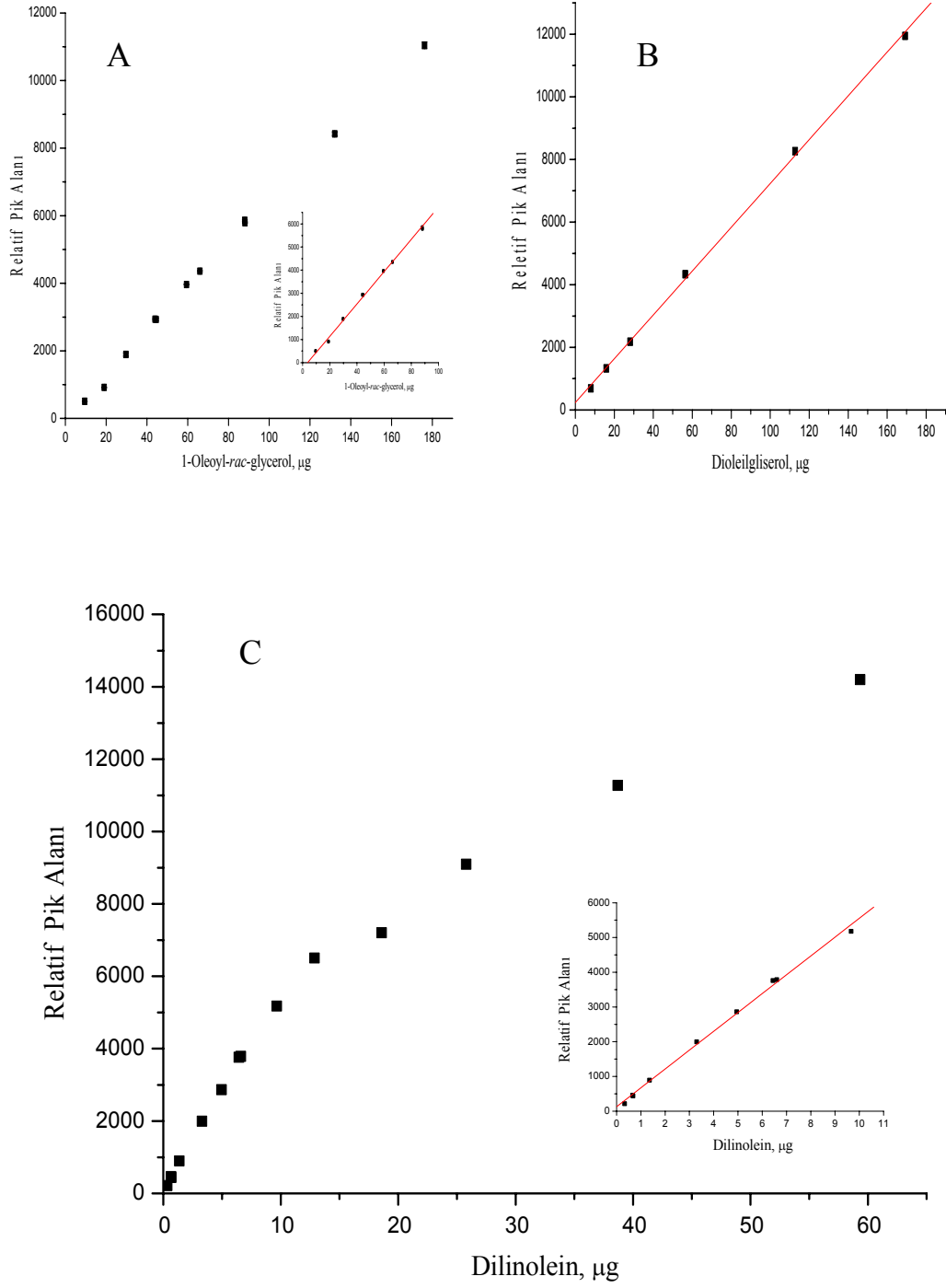
Diöleilgliserol kalibrasyon eğrisinde (Şekil 4.8) lineerite yeterince sağlandığı için (korelasyon sabiti 0.999) 180 µg'a kadar doğru bir konsantrasyon analizi yapılabilmektedir. Diöleilgliserolde iki tane çift bağ olduğundan, MeO (tek çift bağ)'ya göre hem relatif integre alanlar hem de miktar iki katına çıkmış, yine lineer bölgenin içerisinde kalınmıştır. 1-oleoyl-*rac*-gliserol kalibrasyon eğrisinin eğimide 1,2-OO kalibrasyon eğrisinin eğimi ile yaklaşık olarak aynıdır (Çizelge 4.3). Dilinoleinde lineer bölge MeL'ye göre biraz daha azalmıştır.



Şekil 4.6. Ayçiçek yağ metil esterlere; (A) MeL ve (B) MeO, ait kalibrasyon eğrileri. Analiz şartları HPLC metod 2 kısmında açıklanmıştır.



Şekil 4.7. Ayçiçek yağ metil esterlerin; (A) MeP ve (B) MeS kalibrasyon eğrileri. Analiz şartları HPLC metod 2 kısmında açıklanmıştır.



Şekil 4.8. (A) Monoolein, (B) dioleoin ve (C) dilinolein kalibrasyon eğrisi. Analiz şartları HPLC metod 2 kısmında açıklanmıştır.

Çizelge 4.3. Lineer regresyon analizi ile metil ester standartları ve bazı mono- ve diaçilgliserollerin, kalibrasyon eğrilerindeki sabitler.

Madde	Eğim (IU/ μ g) ^b	“y” eksen kesim noktası (IU) ^b	Korelasyon sabit	Lineer bölge (alt-üst sınırlar) μ g IU ^b	
MeL	643	169	0.999	0.3-12.0	200-8000
MeO	75	113	0.999	2.0-80.0	200-6000
MeP	12.4	85	0.999	35-350	500-4000
MeS	11.1	12	0.999	40-400	500-5000
1-O	67	-43	0.999	2.0-80.0	200-6000
1,2-OO	69	237	0.999	2.0-80.0	200-6000
1,3-LL	512	213	0.997	0.3-12.0	200-6500

^aHPLC şartları metod 2 olarak bölüm 3.2.3’de açıklanmıştır.

^bIU=Integrasyon unit.

4.3. Sabit Lipaz Sistemleri için Optimum Şartların Belirlenmesi

4.3.1. Optimum Yağ:Metanol (mol:mol) Oranının Belirlenmesi

Literatürdeki Novo 435 ile yapılan çalışmalardan fazla miktardaki metanolün lipaz enzimlerinin aktivitesini olumsuz yönde etkilediği bilinmekteydi; Novo 435 için 3 aşamalı MeOH ilavesi önerilmiştir [Shimada *et. al.*, 2002; Watanabe *et. al.*, 2002]. Tez çalışmamızda her bir immobilize lipaz için uygun MeOH oranı belirlenmiştir. Çizelge 4.4’de yağ:metanol (mol:mol) oranının lipaz aktivitesine etkisi gösterilmektedir. Buna göre Novo 435’in başlangıç aktivitesi, metanol yağa göre mol bazında, bir kat ve iki kat ilave edildiğinde sırasıyla 0.171 mM.dk⁻¹.gr⁻¹ ve 0.176 mM.dk⁻¹.gr⁻¹ olarak bulunmuştur. Yağa göre alkol oranı üç kat olduğunda ise başlangıç aktivitesi 0.0179 mM.dk⁻¹.gr⁻¹’a düşmüştür. Diğer taraftan TL IM ve RM IM için en uygun yağ:metanol oranı 1:1 olduğu görülmektedir. Bu sonuçlara göre her bir lipaz enzim sistemi için metanol ilavesi, her bir aşamada 1 mol ekivalent yapıldığında aktivitede bir düşme olmayıp daha yüksek reaksiyon verimi elde edilebilmektedir.

Çizelge 4.4. Novo 435, TL IM ve RM IM-katalizli transesterifikasyon reaksiyonlarında yağ:metanol oranının lipaz aktivitesine etkisi. Deney şartları: Transesterifikasyon reaksiyonları $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda 200 ± 1 rpm sabit deney şartlarında gerçekleştirildi. Yağa göre ağırlıkça %4 katalizör kullanıldı. Deney başlangıcından 10. ve 20. dakika sonra alınan 10 μl örnekler 990 μl aseton ile seyreltilerek HPLC metod 2 şartları kullanılıp analiz edildi. Başlangıç reaksiyon hızları linoleik asit kalibrasyon grafiği kullanılıp hesaplanmıştır.

Lipaz Sistemleri	Başlangıç reaksiyon hızı, $\text{mM.dk}^{-1}.\text{gr}^{-1}\text{enzim}$		
	1:1 yağ:alkol	1:2 yağ:alkol	1:3 yağ:alkol
Novo 435	0.171	0.176	0.0179
TL IM	0.860	0.0019	-----
RM IM	0.633	0.0029	-----

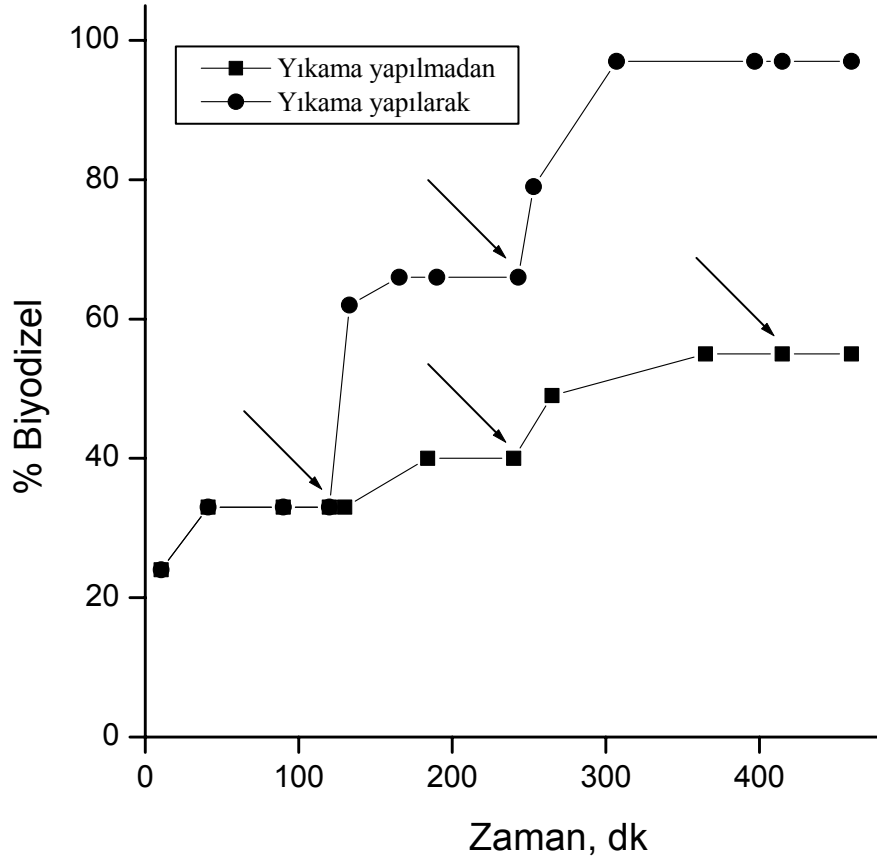
4.3.2. Gliserolün İnhibisyon Etkisinin Giderilmesi

Yaptığımız ilk çalışmalarda gliserolün, lipaz aktivitesini olumsuz yönde etkilediği ve verimi etkili bir şekilde düşürdüğü görülmüştür. Literatürde de benzer bir inhibisyon bahsedilmiştir; fakat hangi aşamaya kadar olduğu net değildir [Deineka *et. al.*, 2003].

Yapılan deneylerde, ticari lipaz enzimlerinin sabitlendiği matrislerin de gliserol ile etkileşim gösterdiği gözlenmiştir. İkinci metanol eklendikten kısa bir süre sonra, sabit enzim topaklanarak reaksiyon tüpünün çeperlerine yapışmakta ve bu aşamadan sonra reaksiyon çok yavaş ilerlemekte veya hiç devam etmemektedir; gliserolün matris çevresinde bir bariyer oluşturduğu gözlenmiştir.

Gliserol transesterifikasyonu iki açıdan olumsuz etkilemiş olabilir. Bunlardan ilki, immobilizasyon matrisine adsorplanıp ürün substrat difüzyonunun engellenmesi; ikincisi, enzimi inhibe etmesidir. Verimi yükseltmek için enzimi reaksiyon kabının ortasına konuşturılmaktan bir sonuç alınamadıktan sonra ikinci ve üçüncü MeOH ilaveleri yapılmadan önce sabit lipaz reaksiyon ortamından alınarak, ilk önce ter-BüOH ve daha sonra hekzan ile yıkanmıştır. Bu yıkama

prosedürü, gliserolü matriksten ayırmakta etkili olmuş, ve gliserolün inhibisyon etkisi büyük ölçüde giderilmiştir. Du *et. al.* [2003] immobilize lipazdan gliserolün desorpsiyonu için propanol, izopropanol, bütanol ve ter-BüOH organik çözücülerinin kullanılabileceğini belirtmiştir. Yıkama yapılmadan önce %60 olan transesterifikasyon verimi yıkama yapıldıktan sonra %97'ye ulaşmıştır (Şekil 4.9).

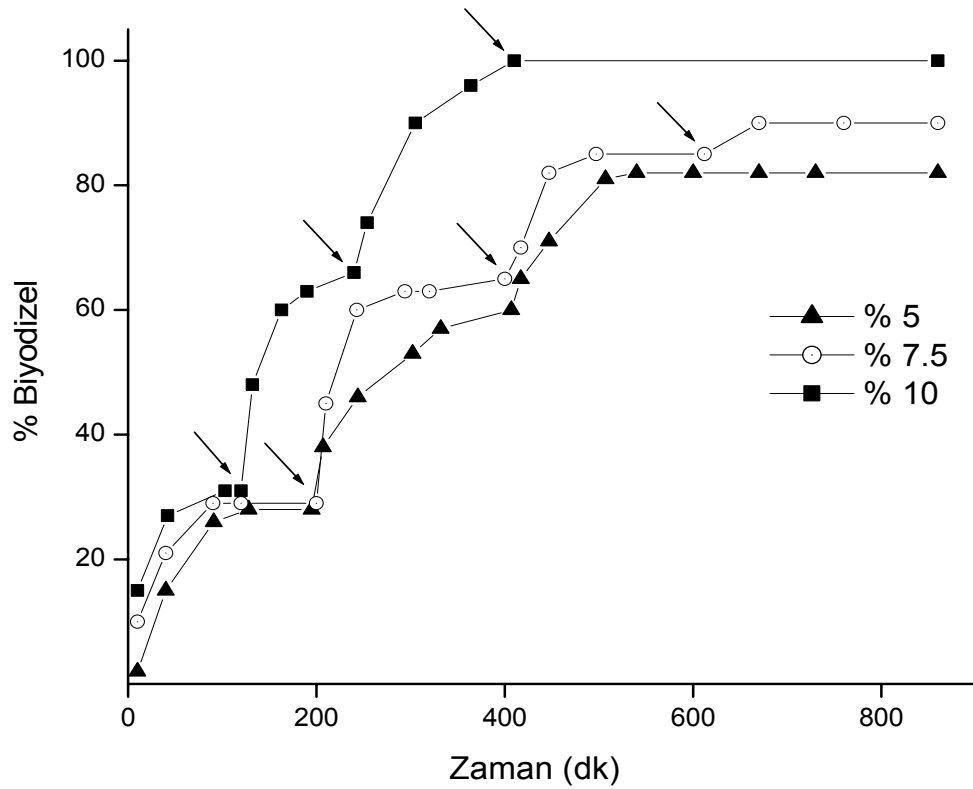


Şekil 4.9. Gliserolün inhibisyon etkisinin giderilmesi. A, sabit lipaz (TL IM) yıkanmadan; B, sabit lipaz yıkanarak metil ester üretilmesi. Oklar metanol ilavelerini göstermektedir. Deney şartları 3.2.1 ve 3.2.2 kısımlarında açıklanmıştır. Analizler kısım 3.2.3.'de açıklanan HPLC metod 1 şartlarında gerçekleştirilmiştir.

4.4. Enzim Miktarının Metil Ester Verimine Etkisi

4.4.1. Novozym 435

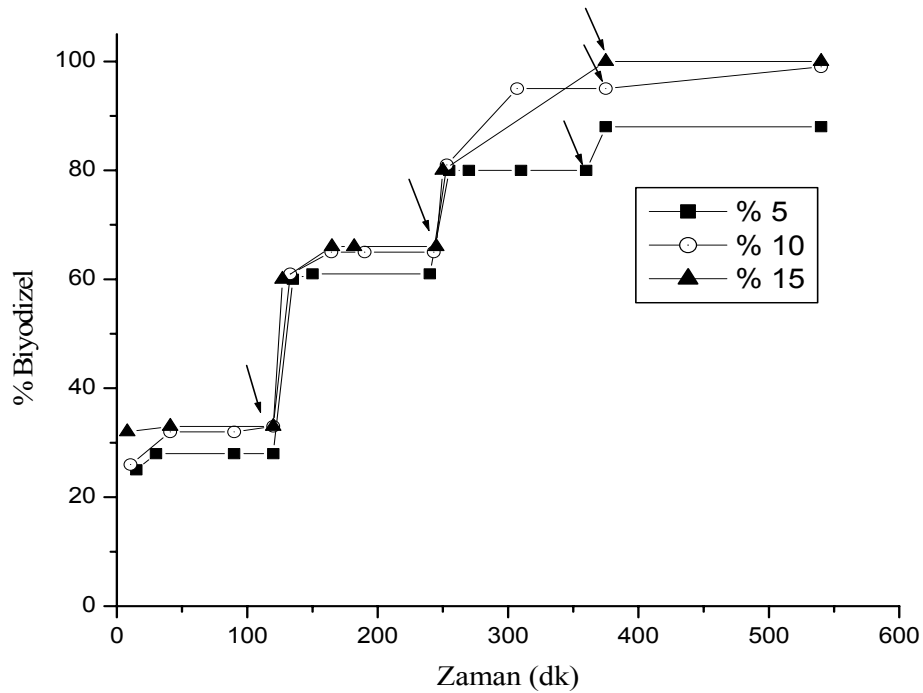
Novo 435 miktarının metil ester verimine etkisi Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Enzim miktarının artmasıyla daha hızlı reaksiyon gerçekleşmekte ve verimler %80-97 arasında değişmektedir. %5 ve %7.5 enzim kullanıldığında 4üncü MeOH ilavesi gerekirken %10 enzim kullanıldığında 4üncü MeOH ilavesine gerek kalmamıştır. Bunun sebebi enzim miktarı az olduğunda, immobilizasyon matriksi tarafından adsorplanan MeOH'nın, gliserol ile birlikte reaksiyon ortamından uzaklaştırılması olabilir. Enzim konsantrasyonu fazla olduğunda daha kısa zamanda daha fazla metil ester sentezlendiğinden dördüncü metanolün ilave edilmesine gerek kalmamıştır.



Şekil 4.10 Novo 435 miktarının metil ester verimine etkisi. Deneylerde yağa göre ağırlıkça %5, %7.5 ve %10 Novo 435 lipaz kullanılmıştır. Oklar, MeOH'nın ilave edildiği dakikalara göstermektedir. Diğer deney şartları kısım 3.2.1'de açıklanmıştır. Analizler 3.2.3 kısmında belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.4.2. Lipozyme TL IM

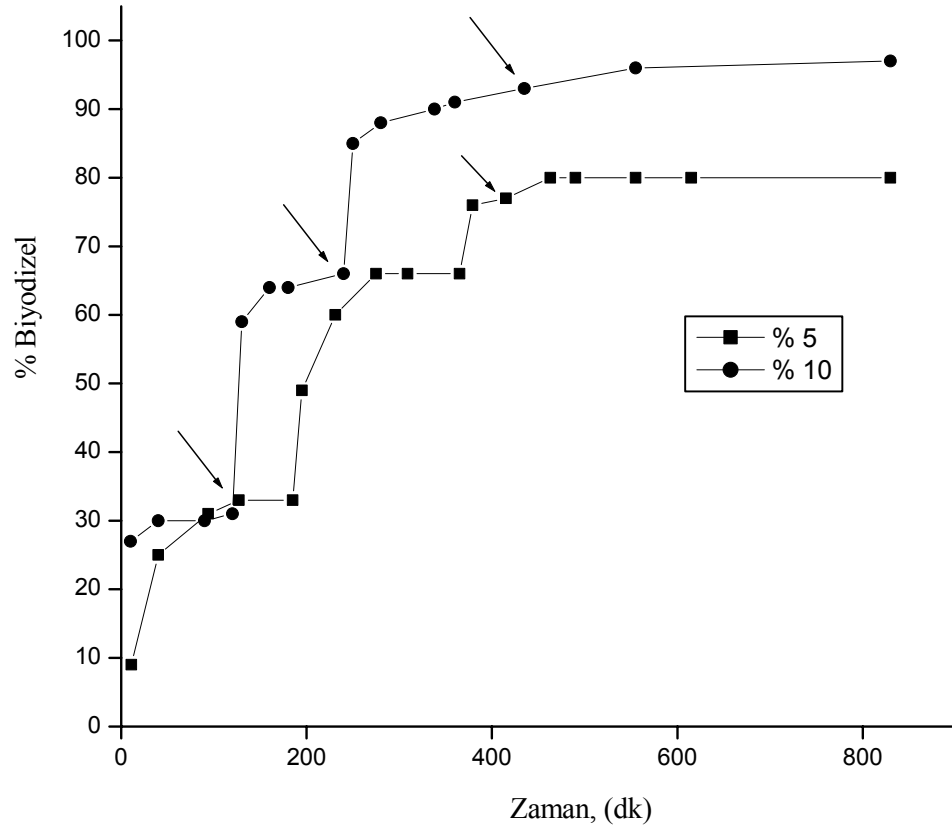
Novo 435 lipaz kullanılarak yapılan enzim miktarı deneyleri şartlar hiç değiştirilmeden TL IM lipaz kullanılıp yapılmıştır. Ayçiçek yağı ağırlığına göre %5 (yağıya göre ağırlıkça), %10 ve %15 TL IM lipaz kullanılıp gerçekleştirilen bu reaksiyonların zamana karşı metil ester miktarlarındaki değişim Şekil 4.11’de gösterilmiştir. TL IM konsantrasyonunun artışı başlangıç hızlarının artışına neden olmuştur. %10 TL IM kullanılması ile %15 TL IM kullanılması transesterifikasyon verimini değiştirmemiş, %5 TL IM kullanıldığında verim %88’de kalmıştır. %15 TL IM kullanıldığında immobilize enzimin agregasyonu %10 TL IM ile aynı verim elde edilmesini sağlamış olabilir. %15 TL IM kullanıldığında yüksek karıştırma hızına rağmen bir miktar TL IM’nin reaksiyon kabının dibine biriktiği görülmüştür. %5 TL IM kullanıldığında 4üncü MeOH ilavesi gerekmiştir. % 10’dan daha fazla enzim kullanılması reaksiyon ortamının bulanıklaşmasına sebep olup örnek alınmasını zorlaştırmıştır.



Şekil 4.11 TL IM miktarının metil ester verimine etkisi. Deneylerde yağıya göre ağırlıkça %5, %10 ve %15 TL IM lipaz kullanılmıştır. Oklar, MeOH’nın ilave edildiği dakikaları göstermektedir. Diğer deney şartları kısım 3.2.1, HPLC analiz şartları kısım 3.2.3’de belirtilmiştir.

4.4.3. Lipozyme RM IM

Yağa göre ağırlıkça %5 enzim kullanıldığında %80, yağa göre ağırlıkça %10 enzim kullanıldığında %97 verime ulaşılmıştır (Şekil 4.12). Verimin %80 çıkmasının sebebi MeOH'nın sebep olduğu enzim inhibisyonu veya yıkama işleminde kullanılan ter-BüOH ve hekzan solventlerinin enzim aktivitesini düşürmesi olabilir.

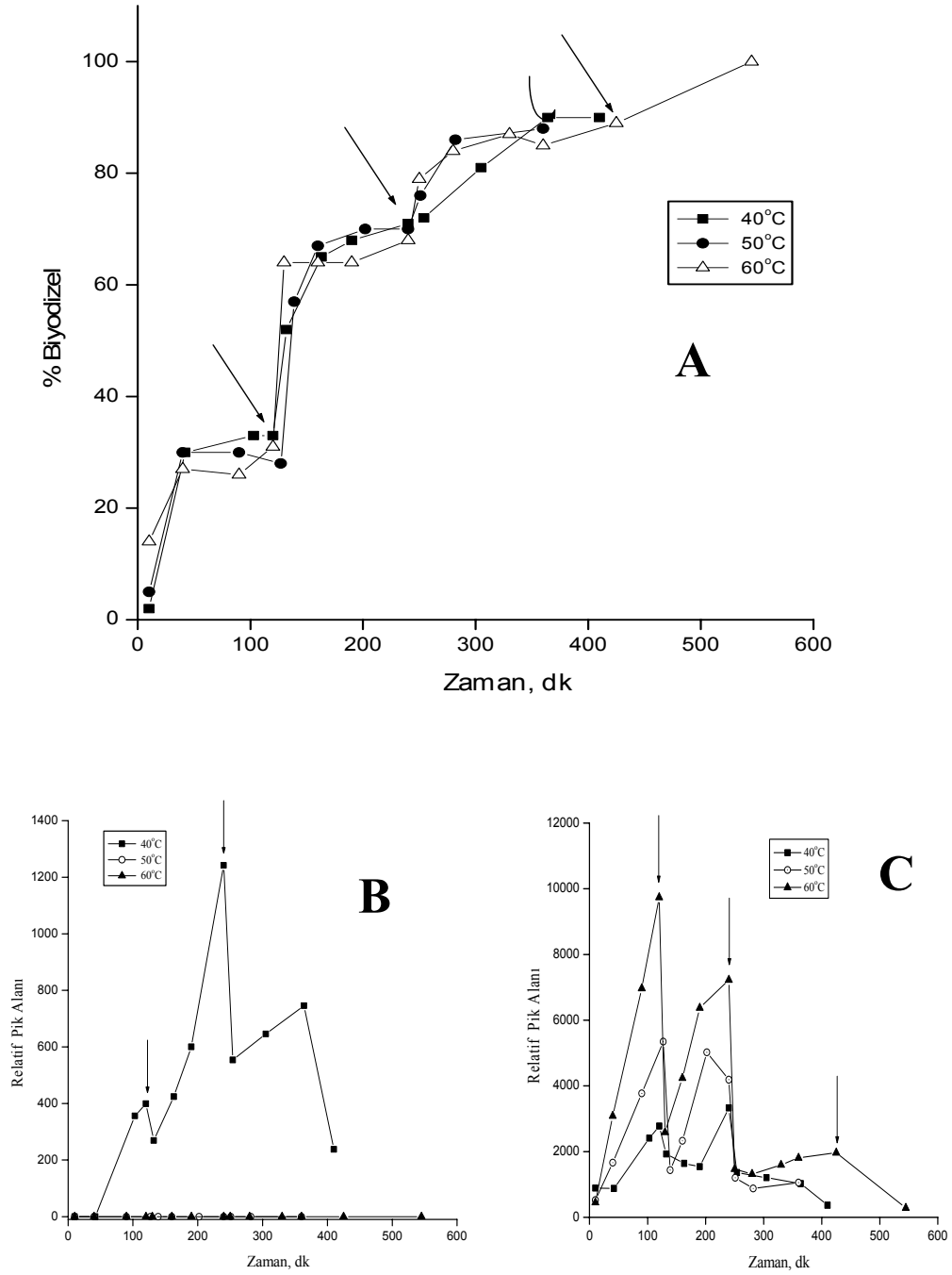


Şekil 4.12 RM IM miktarının metil ester verimine etkisi. Deneylerde yağa göre ağırlıkça %5 ve %10 RM IM lipaz kullanılmıştır. Diğer deney şartları kısım 3.2.1'de ve HPLC analiz şartları kısım 3.2.3'de belirtilmiştir.

4.5. Sıcaklığın Lipaz-Katalizli Metil Ester Verimine ve Araürünlerin Oluşmasına Etkisi

4.5.1. Sıcaklığın Novozym 435-Katalizli Metil Ester Verimine ve Araürün Oluşumuna Etkisi

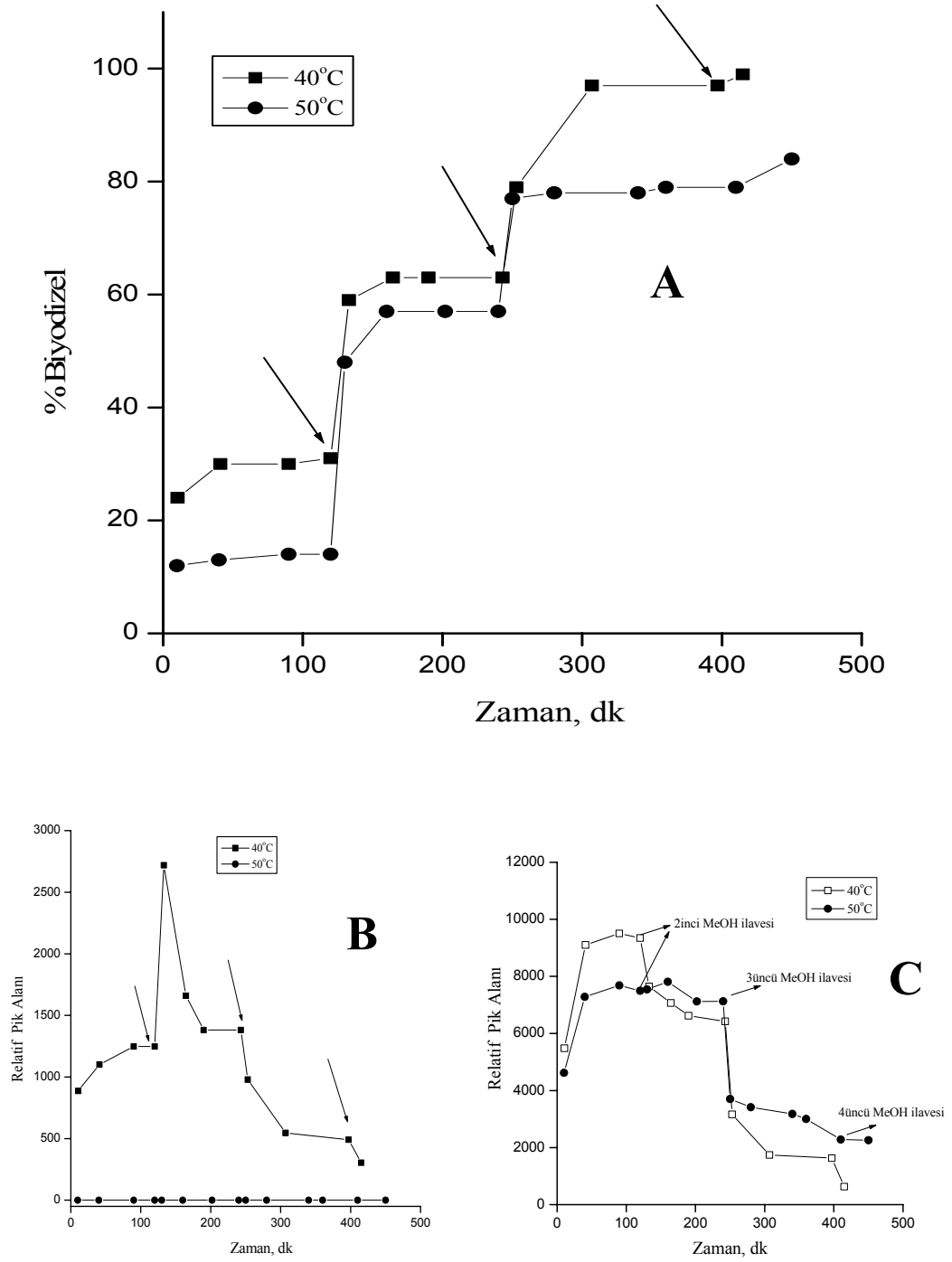
Yağ ağırlığına göre %10 Novo 435 lipaz kullanılarak farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen transesterifikasyon reaksiyonlarının metil ester verimleri Şekil 4.13A'da gösterilmiştir. 60°C'de gerçekleştirilen reaksiyonda 4üncü MeOH'nın ilave edilmesi verimi %100'e çıkarmıştır. 40°C'de MAG araürünleri oluşurken 50°C'de ve 60 °C'de MAG araürünleri çok az oluşmuştur (Şekil 4.13B). 50°C'de ve 60°C'de MAG oluşmamasının sebebi üçüncü geri dönüşümlü reaksiyon hızının artması olabilir. Sıcaklık artışı, DAG konsantrasyonlarının da değişmesine sebep olmuştur (Şekil 4.13C). Reaksiyon sıcaklığı arttıkça daha fazla DAG oluşmuştur. Sıcaklık artışıyla enzimin yapısında oluşan değişim, ilk geri dönüşümlü reaksiyonun hızını arttırarak, diaçilgliserol araürünlerinde artışa sebep olmuş olabilir.



Şekil 4.13. Sıcaklığın Novo 435-katalizli metil ester verimine ve araürün miktarına etkisi. A, % Metil ester; B, toplam MAG; C, toplam DAG. Reaksiyon sıcaklıkları şekilde gösterilmiştir. Oklar MeOH'nın ilave edildiği dakikaları göstermektedir. Deney şartları ve analiz şartları sırasıyla kısım 3.2.1. ve kısım 3.2.3'de açıklanmıştır; HPLC metod 2 kullanılmıştır.

4.5.2. Sıcaklığın TL IM-Katalizli Metil Ester Verimine ve Araürün Oluşumuna Etkisi

Sıcaklığın TL IM-katalizli transesterifikasyon reaksiyon verimine etkisi Şekil 4.14A'da gösterilmiştir. %10 TL IM lipaz kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde sıcaklık artışı verimi azaltmıştır. Bu verim düşmesi yüksek sıcaklıkta enzimin yapısının değişmesinden kaynaklanabilir. Wu et. al., [2003] benzer şartlarda 40°C'den yüksek sıcaklıklarda verimin düştüğünü bulmuştur. 40°C ve 50°C sıcaklıklarda MAG araürünlerinin zaman ile değişmesi Şekil 4.14.B'de gösterilmiştir. 50°C'de tüm reaksiyon boyunca hiç MAG oluşmamıştır. Halbuki 40°C'de oldukça fazla MAG oluşmuş (özellikle 2-L ve 1-L); 2-L, zamanla meydana gelen açıl göçü reaksiyonları ile 1-L'ye dönüşmüştür. 50°C'de TL IM katalizli transesterifikasyon reaksiyonunda, MAG oluşmadığı için $DAG \leftrightarrow MAG$ ara reaksiyonu ve MAG ürünlerinin açıl göçü reaksiyonları meydana gelmemiştir. Şekil 4.14C'de farklı sıcaklıklarda DAG araürünlerinin zaman ile değişmesi gösterilmiştir. Yüksek sıcaklıkta enzim inhibe olmasından kaynaklanabilecek DAG konsantrasyonlarının düşüşü gözlemlenmiştir. DAG konsantrasyonu 40°C'de 2inci MeOH ilavesi ile düşüşe geçerken 50°C'de bir düşüş olmamış ve 3üncü MeOH ilavesine kadar sabit bir seviyede gitmiştir (Şekil 4.14C).



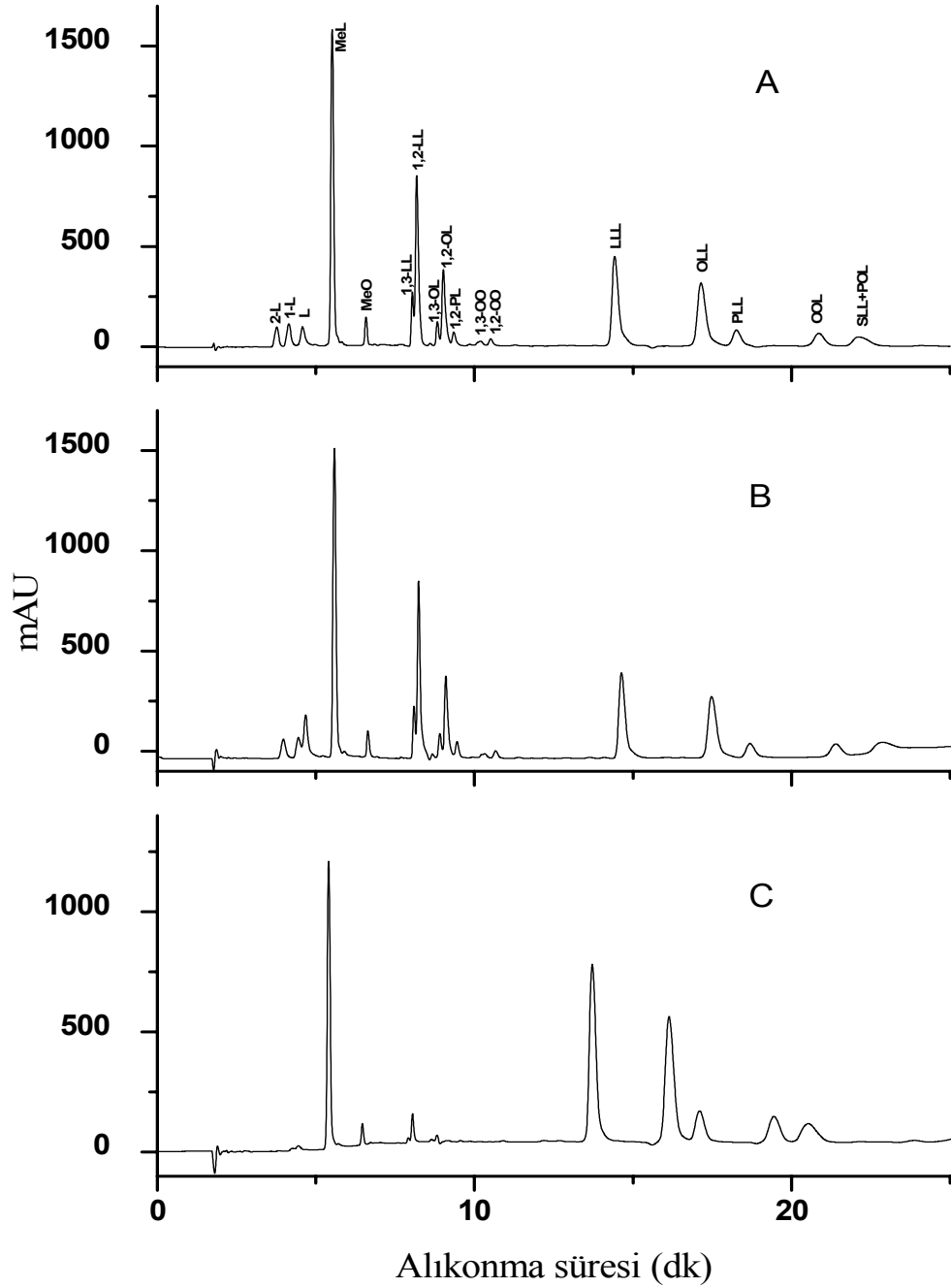
Şekil 4.14. Sıcaklığın TL IM-katalizli metil ester verimine ve araürün miktarlarına etkisi. A, % Metil ester, B, toplam MAG, C, toplam DAG. Reaksiyon sıcaklıkları 40 ve 50°C’de yapılmıştır. Oklar MeOH’nın ilave edildiği dakikaları göstermektedir. Deney şartları ve analiz şartları sırasıyla kısım 3.2.1. ve kısım 3.2.3’de açıklanmıştır; HPLC metod 2 kullanılmıştır.

4.6. Metil Ester Üretiminde Kullanılan Lipaz Enzimlerinin Mekanizmasının Aydınlatılması

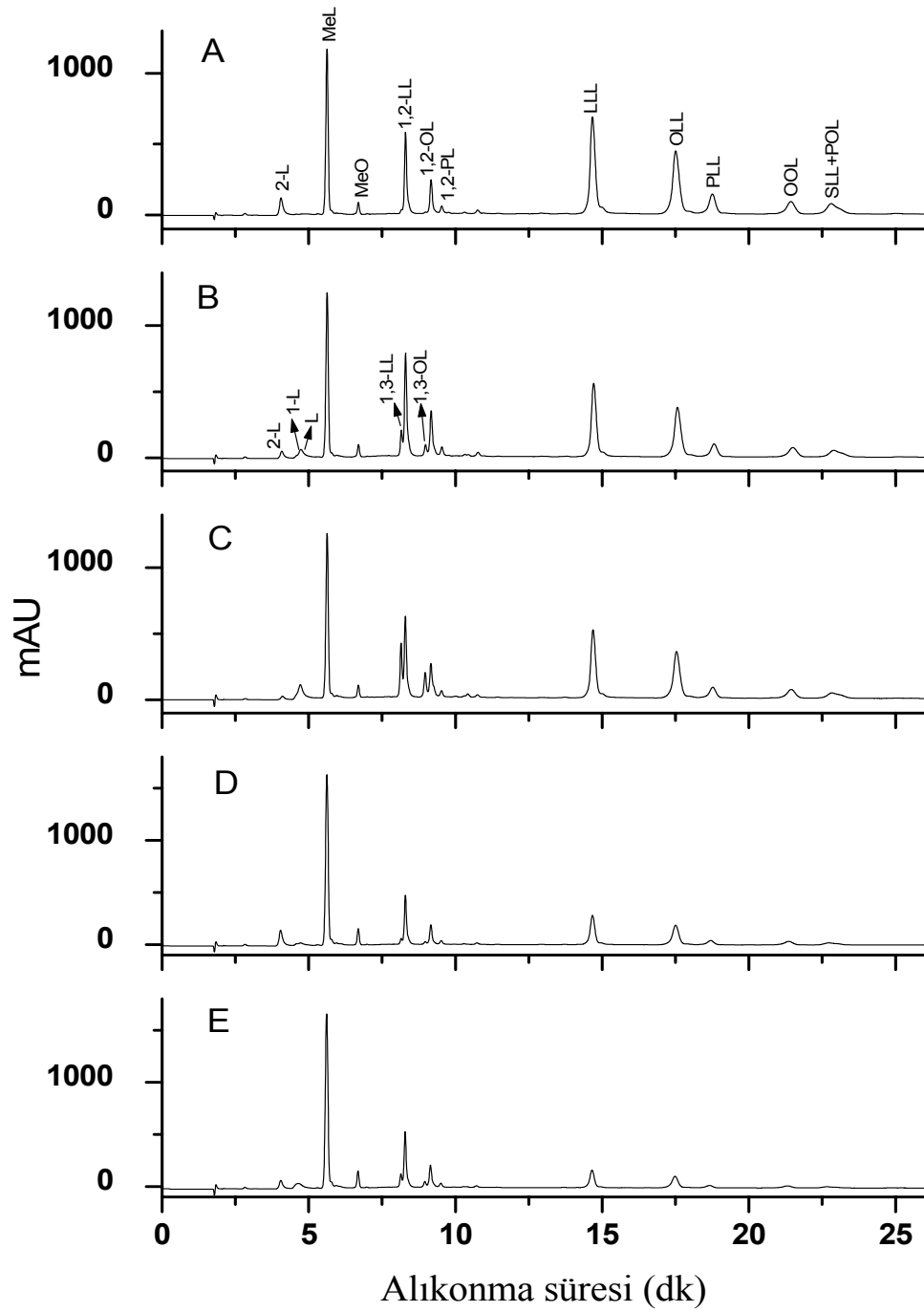
TAG'ların tamamen yağ asidi metil esterlerine dönüşümü mono ve diaçilgliserol araürünlerinin olduğu, aşağıda gösterilen, en az üç geri dönüşümlü reaksiyon aşamasıyla olmaktadır.

1. TAG + MeOH $\leftrightarrow$ ME + DAG
2. DAG + MeOH $\leftrightarrow$ ME + MAG
3. MAG + MeOH $\leftrightarrow$ ME + Gliserol

Lipazların reaksiyon mekanizmalarının aydınlatılması için ürün ve araürünlerin zamana karşı takibi gerekmektedir. HPLC metodu metil esterlerin, mono ve diaçilgliserol araürünlerinin ve aynı zamanda TAG (substrat) konsantrasyonlarındaki değişimlerin belirlenmesini sağlamıştır. Reaksiyon şartları ve HPLC şartları aynı tutularak, Novo 435, TL IM ve RM IM lipazların katalizlediği transesterifikasyon reaksiyonlarından 120 dk sonra alınan örnekler HPLC ile analiz edilip MAG ve DAG gibi araürün seviyeleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.15). Novo 435 katalizörlüğünde, TAG'ların fazla bir MAG ve DAG birikmesi olmadan metil esterlere dönüşmesi, ilk adımın (TAG'ın DAG'a geri dönüşümlü reaksiyonu) hız belirleyici adım olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan *sn*-1,3 seçici olan RM IM ve TL IM lipazlarda 1,2-DAG'lar ve 2-MAG'lar (özellikle 2-L ve 1,2-LL)'nin oldukça biriktiği görülmüştür (Şekil 4.15A, B). Metanol konsantrasyonu azaldıkça RM IM ve TL IM lipazların 2-L $\leftrightarrow$ 1-L ve 1,2-LL $\leftrightarrow$ 1,3-LL reaksiyonlarını katalizlediği görülmüştür. Reaksiyon tüpüne 2inci (veya 3üncü) MeOH ilave edilir edilmez, 1,3-DAG'lar ve 1-MAG'lar lipazların kullandığı substratlar olmuşlardır. Şekil 4.16'de RM IM-katalizli reaksiyonda bahsedilen bu aşamalar gösterilmiştir. TL IM lipaz ile de benzer sonuç elde edilmiştir. Sonuçlar açıl göçünün bu enzimlerin hız belirleyici basamağı olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara göre; açıl göçü, 1,2-DAG'ların 1,3-DAG'lara ve 2-MAG'ların 1(3)-MAG'lara dönüşümü, RM IM ve TL IM lipazın hız belirleyici adımları olmaktadır.



Şekil 4.15. Lipaz-katalizli yağın metanoliz reaksiyonundan alınan örneğin HPLC kromatogramları. A, Lipozyme RM IM; B, Lipozyme TL IM; C, Novozym 435. Reaksiyon şartları: 202 ± 2 rev/min, $41 \pm 1^\circ\text{C}$, metanol/yağ mol oranı 1:1. Enzimlerden yağ ağırlığının %4'ü kadar kullanıldı. HPLC şartları: Reaksiyon başlangıcından 120.dk sonra 10 µl örnek alınıp 990 µl aseton ile seyreltilmiştir, enjeksiyon hacmi 15 µl, dedektör dalga boyu 210 nm'dir. Ayrıştırmanın diğer şartları HPLC Metod 2'de yazılmıştır.

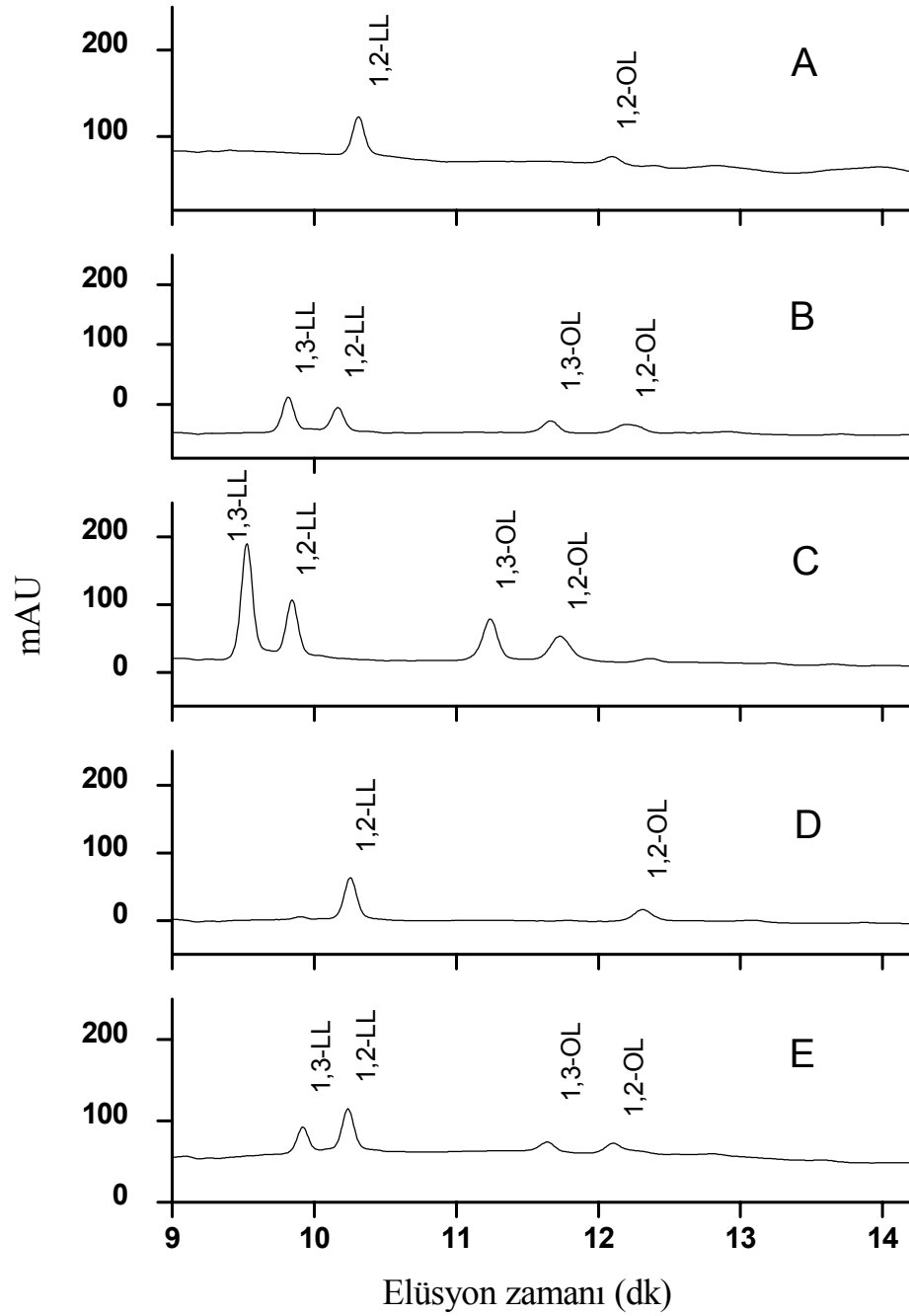


Şekil 4.16. Ayçiçek yağın RM IM lipaz-katalizli metanoliz reaksiyonundan alınan 10(A), 40(B), 120(C), 130(D) ve 160(E). dk örneklerinin HPLC kromatogramları. 120inci dk'da örnek alındıktan sonra 2inci MeOH ilavesi yapılmıştır. Deney şartları: Yağa göre ağırlıkça %10 enzim kullanılmıştır. Diğer deney şartları bölüm 3.2.1'de belirtilmiştir. Analizler bölüm 3.2.3'de belirtilmiştir.

Ayçiçek yağ ve MeOH'nın Novo 435-katalizörlüğündeki transesterifikasyon reaksiyonlarında fazla araürün birikmesi olmamıştır. Fakat diğer iki lipaz ile karşılaştırıldığında oldukça az da olsa bu araürünlerin oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.17). Şekil 4.17 de reaksiyon başında çok az 1,2-DAG oluştuğu, MeOH tükendikçe 1,2-DAG'ın 1,3-DAG'a çevrildiği gösterilmiştir. Bu sonuca göre Novo435 açıl göçü yapmıştır; fakat hız belirleyici adım açıl göçü değildir. 2inci (veya 3üncü) MeOH ilavesi yapıldığında 1,3-DAG öncelikle kullanılmıştır. Ayrıca Novo435 lipaz *sn*-1(3) seçici davranmıştır. Salis *et. al.* [2003] hekzanda TAG ve setil (cetyl) alkolden mum sentezlerken Novo 435'in üç açıl grubundan özellikle birisini tercihen kullanmadığını (seçici davranmadığını) belirtmiştir. Diğer taraftan, Kirk *et. al.* [2002] aynı lipazın pH 7-10'da tribütirin hidrolizinde *sn*-1(3) seçici davrandığını belirtmiştir.

Açıl göçü 1,2-*sn*-DAG'ların 1,3-*sn*-DAG'lara veya 2-*sn*-MAG'ların 1(3)-*sn*-MAG'lara dönüşmesi ile meydana gelen durdurulması mümkün olmayan termodinamik bir prosestir [Yang *et. al.*, 2005]. Yang *et. al.* [2005] açıl göçünü sıcaklığı kontrol ederek baskılamıştır. Diğer taraftan metil-*ter*-bütil eter gibi solventlerde açıl göçünü baskılamaktadır [Fureby *et. al.*, 1997]. Solventler, polariteye (dipol moment, dielektrik sabiti gibi özellikler) bağlı olarak protein yapılarını etkileyebilmekte ve reaksiyon mekanizmalarını değiştirebilmektedirler.

Literatür bilgilerimize göre Novo 435 lipazın açıl göçü yapabildiği henüz belirtilmemiştir. Novo 435 kullanılıp metil ester sentezlenirken gerçekleşen açıl göçü Şekil 4.17'de gösterilmektedir. 40ıncı dakikada sadece 1,2-LL ve 1,2-OL oluşmuş, bunların 1,3-*sn* izomerleri oluşmamıştır. 90ıncı dk'da bunlara açıl göçü reaksiyonları ile 1,3-*sn* izomerlerde eklenmiştir. MeOH azaldığında, açıl göçü meydana gelmektedir. 240ıncı dakika'da 1,3-LL ve 1,3-OL konsantrasyonları, 1,2-*sn* izomerlerinin konsantrasyonlarından daha fazladır. Açıl göçü 1,3-*sn* izomer konsantrasyonu 1,2-*sn* izomer konsantrasyonunu geçinceye kadar sürmüş yada enzim 1,3-*sn* izomerlerden daha fazla 1,2-*sn* izomer oluşturmuş olabilir.

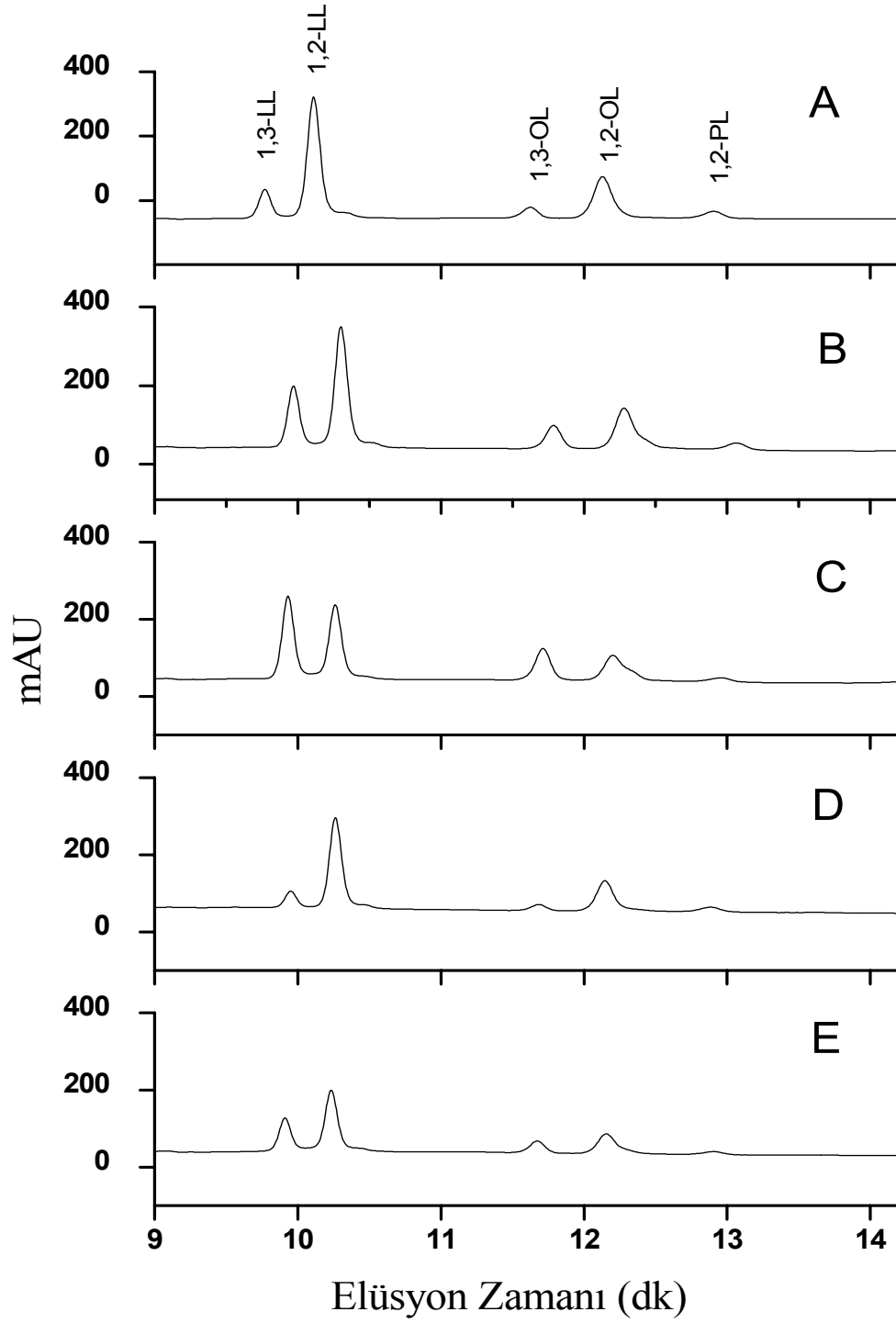


Şekil 4.17 Novo 435-katalizli ayçiçek yağı metanoliz reaksiyonundan farklı zamanlarda alınan örneklerin HPLC kromatogramları ile diaçilgliserol moleküllerindeki açıl göçünün görüntülenmesi. Reaksiyon örnekleri A, 40 dk; B, 90 dk; C, 240 dk; D, 250 dk; E, 280 dk’larda alınmıştır. Deney şartları ve analiz şartları sırasıyla kısım 3.2.1. ve kısım 3.2.3’de açıklanmıştır. HPLC metod 1 kullanılmıştır.

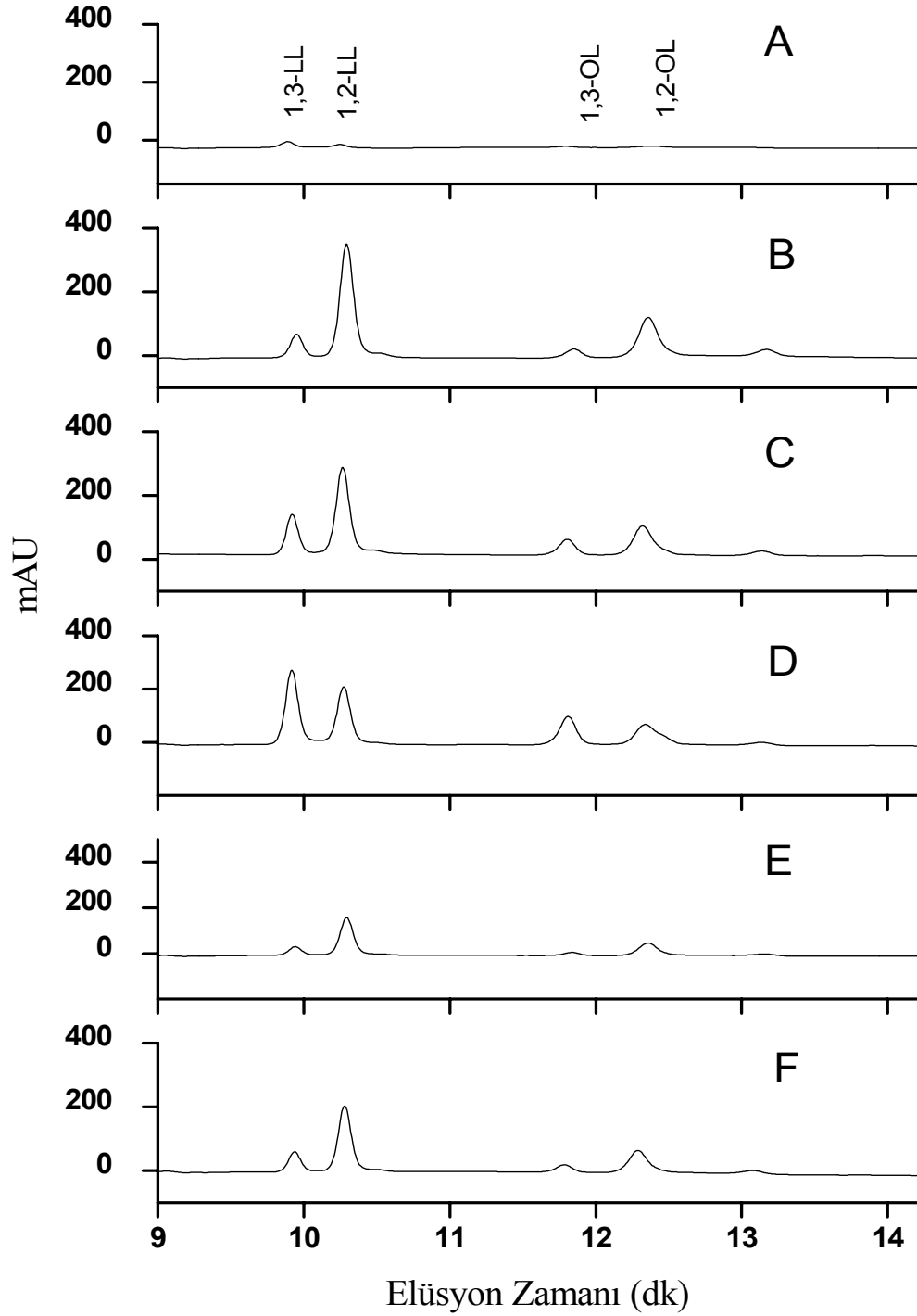
Du *et.al.* [2003] soya yağ ve MeOH'dan TL IM-katalizli metil ester üretiminde, TL IM lipaz immobilizasyon matriksinin açıl göçünü hızlandırdığını belirtmiştir. Diğer taraftan, RM IM lipazın konjuge linoleik asit ve tripalmitinin asidolizinde, hekszanda açıl göçü yaptığı rapor edilmiştir [Camacho *et. al.*, 2006]. Salis *et. al.* [2003] hekszanda RM IM-katalizli transesterifikasyonda açıl göçün hız belirleyici adım olduğunu belirtmiştir. TL IM- ve RM IM-katalizli transesterifikasyonlarda meydana gelen açıl göçü sırasıyla Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

TL IM ve RM IM lipaz ile karşılaştırıldığında Novo435 *sn*-1,2 izomerlere daha fazla afinite göstermiştir. Fakat 40°C'de tüm reaksiyona bakıldığında RM IM ve TL IM lipazlar Novo 435 lipazdan daha hızlı reaksiyon katalizlemişlerdir.

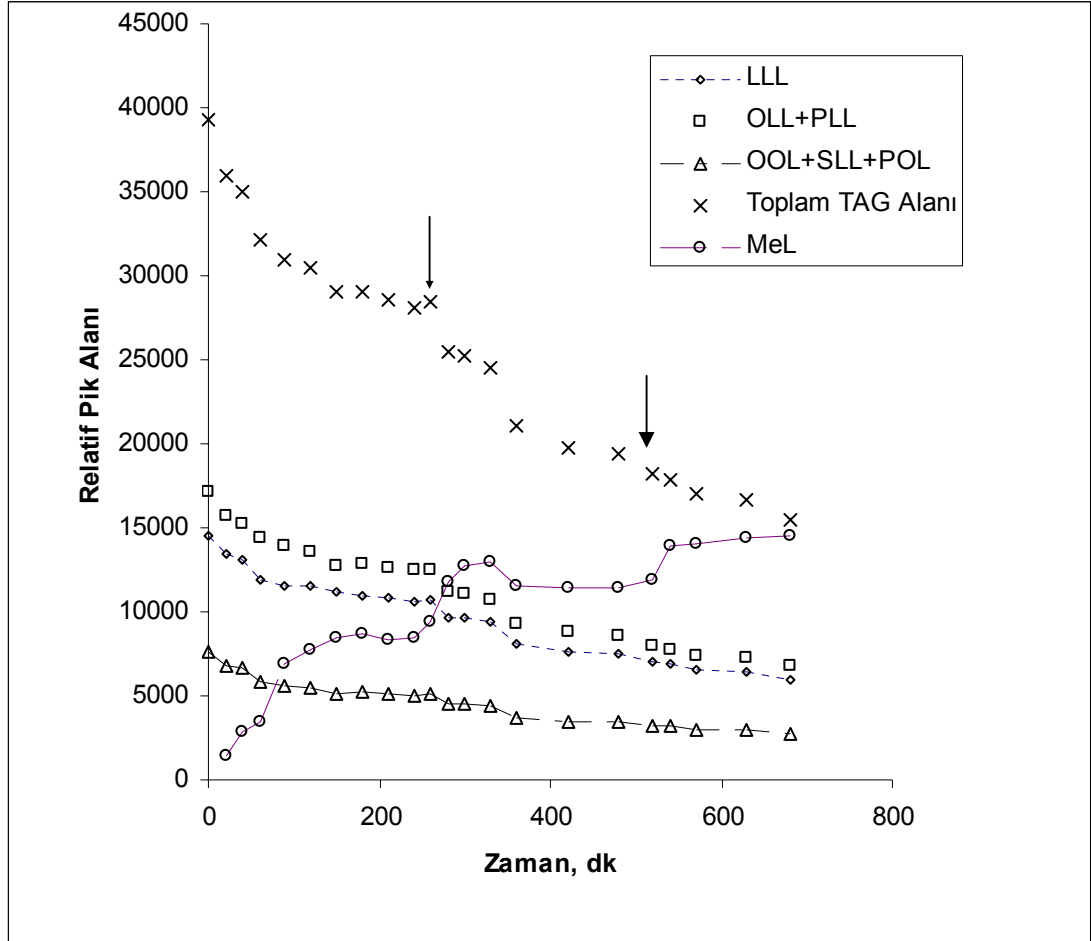
RP-HPLC metil ester üretimi sırasında oluşabilecek hidroliz ürünlerinin (serbest yağ asitleri) belirlenmesinde kullanılabilmektedir. Gerçekleştirilen deneylerde immobilizasyon matrikslerinin içerdiği %1-3'lük su, MeOH tükendikten sonra yağ asidi (başlıca L asit) oluşmasını sağlamıştır. Reaksiyon ortamına MeOH ilavesi yapılır yapılmaz yağ asitleri metil esterlere çevrilmiştir. Ayrıca geliştirilen HPLC metodu ile lipazların herhangi bir yağ asidine ve TAG molekülüne karşı seçici olup olmadıkları belirlenebilmektedir. Novo435, TL IM ve RM IM lipazları özellikle bir yağ asidini veya TAG molekülünü seçici olarak kullanmamıştır (Şekil 4.20). Şekil 4.20'de ayçiçek yağı oluşturan farklı TAG moleküllerinin transesterifikasyon reaksiyonu boyunca birbirleri ile orantılı bir şekilde azaldığı buna karşılık MeL pikinin orantılı bir şekilde arttığı görülmektedir. Eğer lipaz özellikle bir TAG molekülünü kullansaydı TAG pikleri orantılı bir şekilde azalmazdı.



Şekil 4.18. TL IM-katalizli ayçiçek yağın metanoliz reaksiyonundan farklı zamanlarda alınan örneklerin HPLC kromatogramları ile diaçilgliserol moleküllerindeki açıl göçünün görüntülenmesi. Reaksiyon örnekleri A, 40 dk; B, 90 dk; C, 240 dk; D, 250 dk; ve E, 290. dk’larda alınmıştır. Deney şartları ve analiz şartları sırasıyla kısım 3.2.1. ve kısım 3.2.3’de açıklanmıştır. HPLC metod 1 kullanılmıştır.



Şekil 4.19. RM IM-katalizli ayçiçek yağı metanoliz reaksiyonundan farklı zamanlarda alınan örneklerin HPLC kromatogramları ile diaçilgliserol moleküllerindeki açıl göçünün görüntülenmesi. A, 0 dk; B, 40 dk; C, 90 dk; D, 240 dk; E, 250; F, 280.dk. Deney şartları ve analiz şartları sırasıyla kısım 3.2.1 ve kısım 3.2.3’de açıklanmıştır. HPLC metod 1 kullanılmıştır.



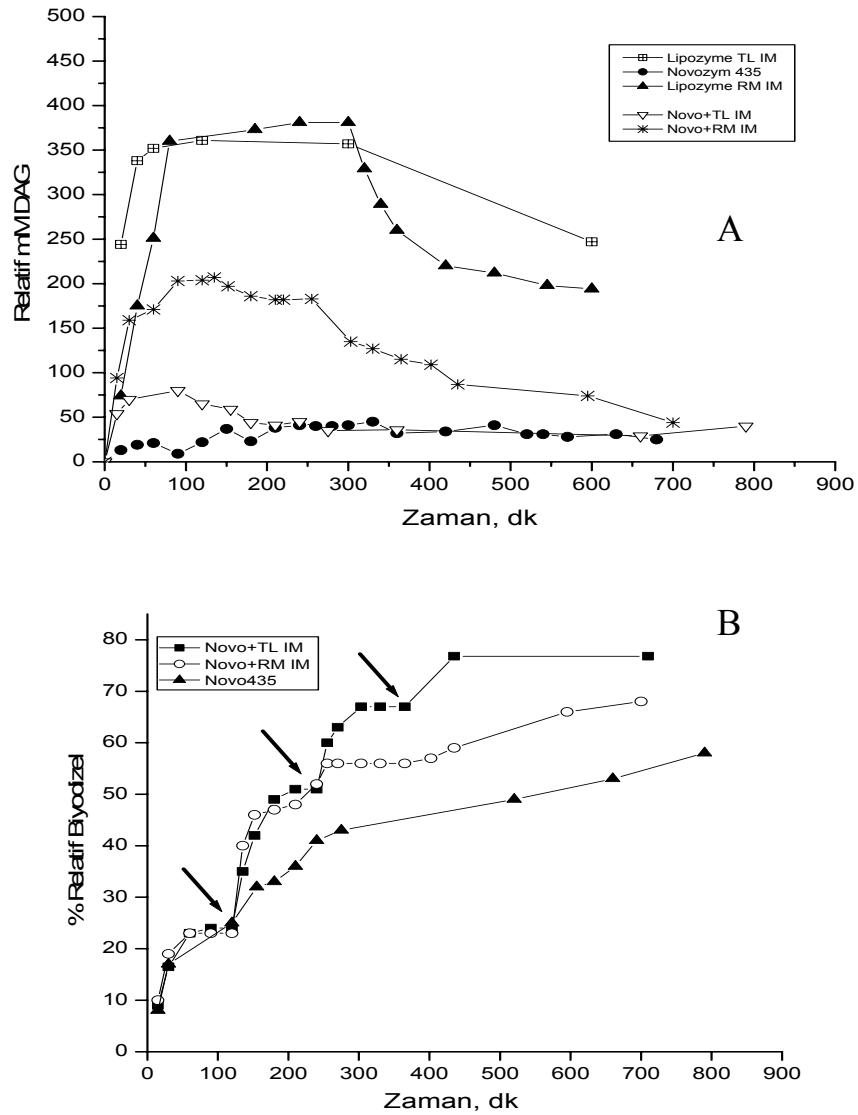
Şekil 4.20. Novo 435 lipazın ayçiçek yağındaki her bir TAG molekülünü tüketmesi Oklar 240 ve 480 dakika sonra yapılan MeOH ilavelerini göstermektedir. Diğer deney şartları kısım 3.2.2, analiz şartları kısım 3.2.3’de açıklanmıştır (HPLC Metod 2 kullanılmıştır).

4.7. Transesterifikasyon Reaksiyonunda Çift Enzim Sistemlerinin Kullanılması

Novozym 435 lipaz ile ayçiçek yağ ve MeOH'dan metil ester sentezlenirken ortamda fazla araürün (başlıca LL-DAG) birikimi olmamakta (Şekil 4.21A) ve reaksiyon uzun sürmektedir (Şekil 4.10). RM IM- ve TL IM-katalizli reaksiyonlar Novo 435-katalizli reaksiyondan daha kısa sürmektedir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12); fakat bu lipazların katalizledikleri reaksiyonlarda araürün birikmekte ve sonlara doğru bu araürünlerde enzim tarafından metil estere çevrilmektedir.

Novozym 435 ve Lipozyme RM IM, metil ester elde etmek için birlikte kullanıldığında RM IM'nin biriktirdiği araürün Novo 435 tarafından tercih edilmiş ve daha kısa sürede ve daha saf (herhangi bir MAG ve DAG içermeyen) metil ester üretilmiştir (Şekil 4.21B).

RM IM lipaz kullanıldığında ilk MeOH ilavesi ile 350 mM konsantrasyonda DAG oluşmuştur (Şekil 4.21A). Bu seviye RM IM + Novo 435 lipaz birlikte kullanıldığında neredeyse sıfıra düşmüştür. Buna göre RM IM + Novo 435 ikili katalizörü RM IM tek katalizörü ile karşılaştırıldığında daha az araürün birikmiştir. Ayrıca tekli katalizör kullanılan deneyler ile karşılaştırıldığında reaksiyon süresi kısalmıştır. RM IM lipazın oluşturduğu araürünler Novo 435 lipaz tarafından ürüne dönüştürülmüştür. Metil ester sentezinde TL IM lipaz tek başına kullanıldığında ilk MeOH ilavesi ile DAG konsantrasyonu 400 mM civarına ulaşmıştır (Şekil 4.21A). TL IM + Novo 435 kullanıldığında bu alan 100 mM seviyesine düşmüştür. Özellikle Novo+TL IM çift enzim sistemi Novo+RM IM çift enzim sisteminden daha avantajlı olmuştur (Şekil 4.21B).



Şekil 4.21. Novo435+TL IM ve Novo435+RM IM ikili enzim sistemleri ve Novo435, TL IM ve RM IM tekli enzim sistemleri katalizörlüğünde ayçiçek yağ ve metanolün transesterifikasyonu. A; başlıca LL DAG araürün ve B; % relatif metil ester. $40 \pm 1^\circ\text{C}$ ve 200 rpm sabit deney şartlarında 9.15 gr ONA ayçiçek yağ 0.183 gr Novo 435, 0.183 gr RM IM katalizörü kullanılarak (toplam katalizör yağın ağırlıkça %4'ü) 0.35 gr MeOH ile 120 dk reaksiyona sokulmuştur. Şekilde gösterilen oklara karşılık gelen 120, 240 ve 660. dakikalarda sırası ile 0.3376 gr, 0.3416 gr, 0.332 gr MeOH ilaveleri yapılmıştır. Gliserolün kütle trasferini engellememesi için çift enzim karışımı 120 ve 240. dakikalarda iki kez 5 ml ter-bütanol peşinden iki kez 5 ml hekzan ile yıkanmışlardır. Şekilde belirtilen her bir noktalarda 10 μL numune alınmış, bu numune 990 μL aseton ile seyreltilmiş ve HPLC analizleri yapılmıştır Diğer HPLC şartları kısım 3.2.3'de açıklanmıştır (HPLC metod 2).

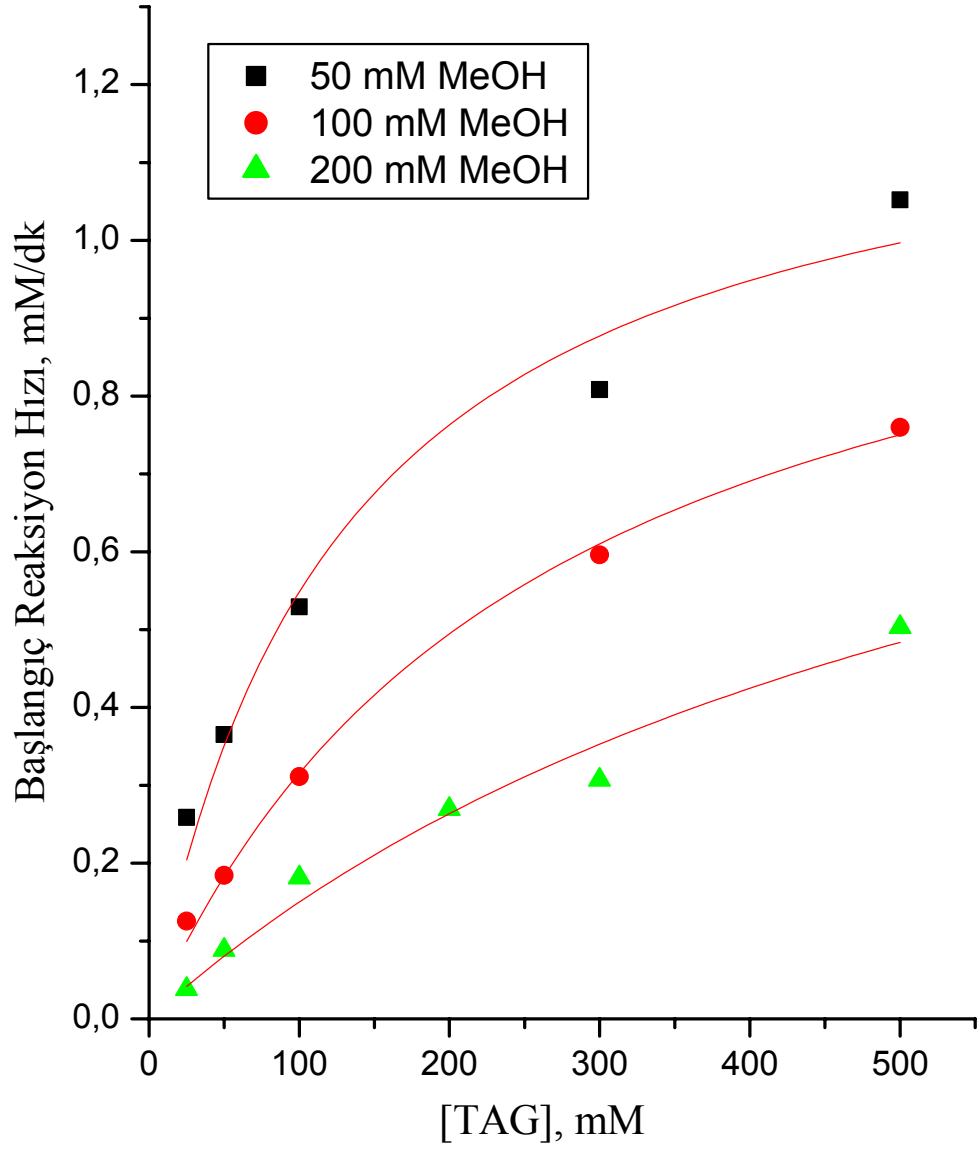
4.8. Kinetik Çalışmalar

4.8.1. Novozym 435

Enzim katalizli reaksiyonların kinetik çalışmaları reaksiyon mekanizmaları hakkında bilgi vermekle birlikte hız sabitlerinin bulunmasını da sağlamaktadır. Bazı lipazların kullanıldığı bitkisel yağ ve MeOH'nın kinetiğinin çalışıldığı bir kaç tane çalışma bulunmaktadır. Al-Zuhair *et. al*, [2005] RM IM ve TL IM lipaz katalizli ayçiçek yağı MeOH ile transesterifikasyonunda MeOH kompetitif inhibisyonunun olduğu ping-pong bi bi kinetik modelini önermiştir. Herhangi bir solventin kullanılmadığı rafine soya yağı ve metil asetatın Novo 435 lipaz ile kinetik çalışmasında da aynı model desteklenmiştir. Aşağıda ping-pong bi bi alkol kompetitif inhibisyon modeli hız eşitliği verilmiştir.

$$V_i = \frac{V_{\max} \times [TAG]}{K_{mTAG} (1 + \frac{[A]}{K_{iA}}) + K_{mA} \frac{[TAG]}{[A]} + [TAG]} \quad (1)$$

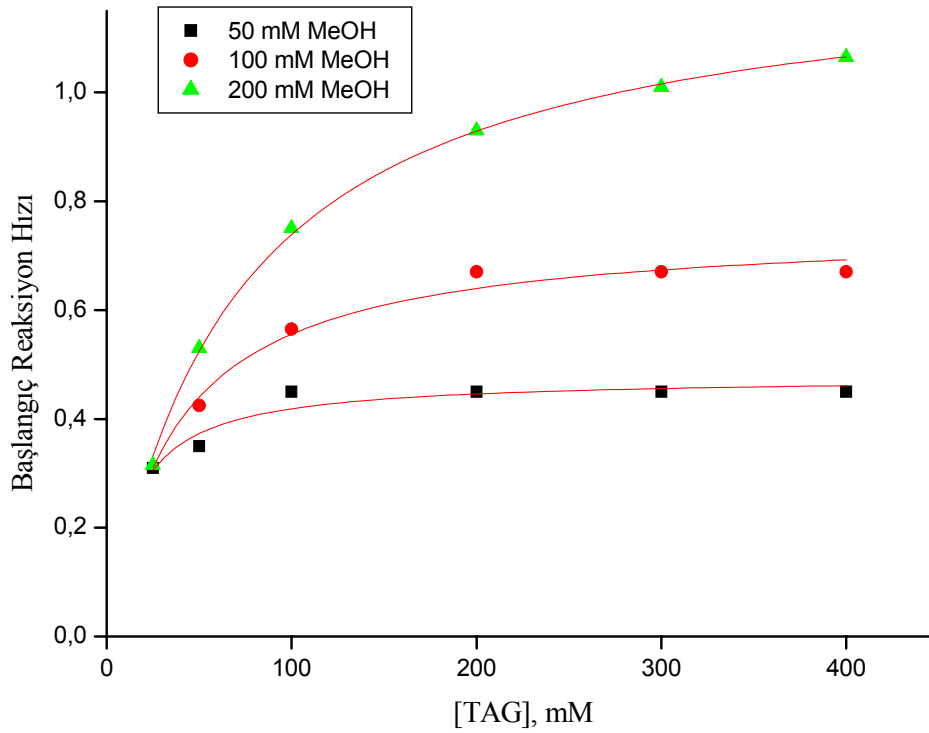
Hız eşitliğinde V_i , başlangıç reaksiyon hızı; $V_{\max}$, maksimum reaksiyon hızı; $[TAG]$, ayçiçek yağ konsantrasyonu; $[A]$, metanol konsantrasyonu; K_{mTAG} ve K_{mA} , sırasıyla, yağ ve alkolün bağlanma sabitleri; K_{iA} , alkolün inhibisyon sabitini göstermektedir. Novo 435 ile gerçekleştirdiğimiz kinetik çalışmada MeOH konsantrasyonu 50-200 mM arasında, yağ konsantrasyonu 25-500 mM arasında değiştirilip başlangıç reaksiyon hızları hesaplanmıştır (Şekil 4.22). Başlangıç reaksiyon hız dataları hem Michaelis-Menten eşitliği hemde alkol kompetitif inhibisyonunun olduğu ping-pong bi bi hız eşitliği kullanılarak analiz edilmiştir. 50, 100 ve 200 mM sabit MeOH kullanıldığında K_m^{app} değerleri sırasıyla 128 mM, 260 mM ve 627 mM; $V_{\max}^{app}$ değerleri sırasıyla 1.2 mM.dk⁻¹, 1.1 mM.dk⁻¹ ve 1.1 mM.dk⁻¹ bulunmuştur. Alkol konsantrasyonu arttıkça, K_m^{app} değerlerinin artıp $V_{\max}^{app}$ değerlerinin değişmemesi, alkol (MeOH) kompetitif inhibisyonunun olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.22. Sabit MeOH ve farklı TAG konsantrasyonlarında Novo 435-katalizli transesterifikasyon reaksiyonu başlangıç reaksiyon hızları. Deney ve Analiz şartları sırasıyla bölüm 3.2.7 ve 3.2.3’de belirtilmiştir. HPLC metod 2 kullanmıştır.

4.8.2. Lipozyme TL IM

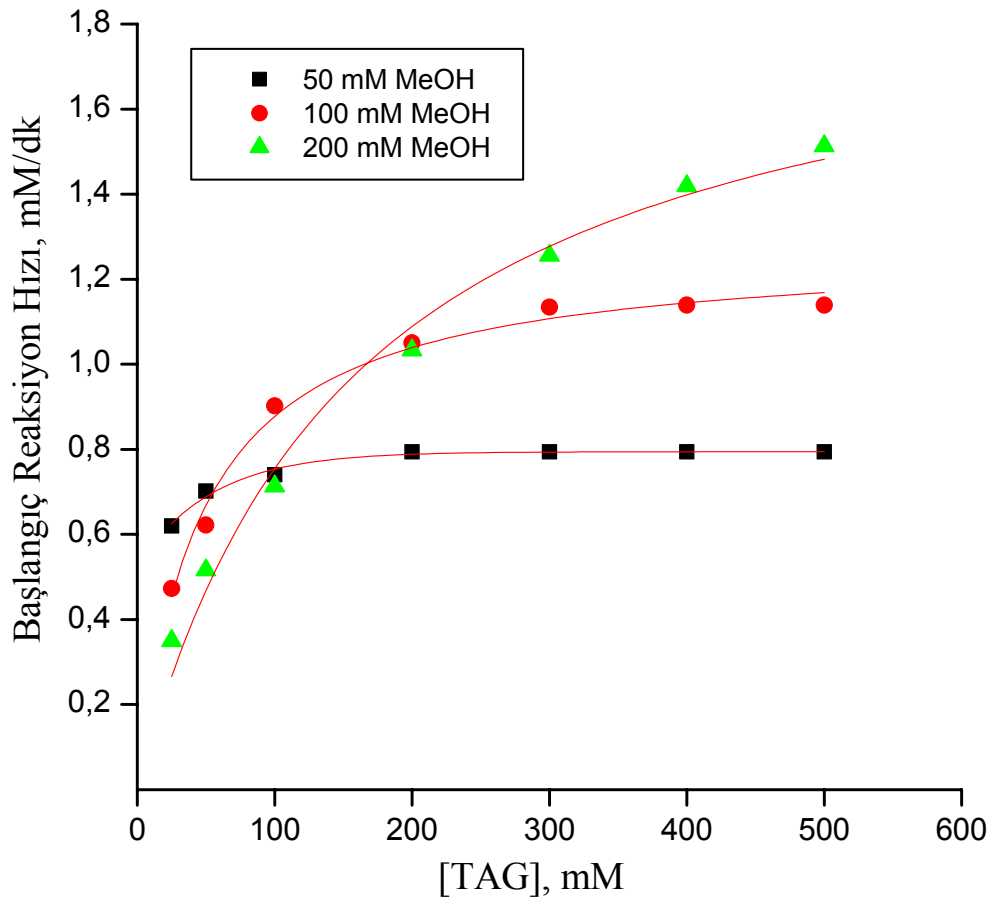
TL IM ile gerçekleştirilen kinetik deneylerde alkol konsantrasyonu arttıkça başlangıç reaksiyon hızları da artmıştır (Şekil 4.23). 50, 100 ve 200 mM sabit MeOH kullanıldığında K_m^{app} değerleri sırasıyla 13.9 mM, 35.6 mM ve 69.2 mM, V_{max}^{app} değerleri sırasıyla 0.48 mM.dk⁻¹, 0.75 mM.dk⁻¹ ve 1.25 mM.dk⁻¹ bulunmuştur.



Şekil 4. 23. Sabit MeOH ve farklı TAG konsantrasyonlarında TL IM-katalizli transesterifikasyon reaksiyonu başlangıç reaksiyon hızları. Deney ve Analiz şartları sırasıyla bölüm 3.2.7 ve 3.2.3’de belirtilmiştir. HPLC metod 2 kullanmıştır.

4.8.3. Lipozyme RM IM

RM IM ile gerçekleştirilen kinetik deneylerde yaklaşık 100 mM yağ konsantrasyonuna kadar alkol konsantrasyonlarının artması başlangıç reaksiyon hızlarını düşürmüştür; bu aralıkta bir alkol inhibisyonu görülmüştür. Yaklaşık 200 mM sabit yağ konsantrasyonundan sonra alkol konsantrasyonu arttıkça başlangıç reaksiyon hızları da artmıştır (Şekil 4.24). 50, 100 ve 200 mM sabit MeOH kullanıldığında K_m^{app} değerleri sırasıyla 7.8 mM, 45 mM ve 159 mM, V_{max}^{app} değerleri sırasıyla 0.8 mM.dk⁻¹, 1.3 mM.dk⁻¹ ve 1.9 mM.dk⁻¹ bulunmuştur.



Şekil 4. 24. Sabit MeOH ve farklı TAG konsantrasyonlarında RM IM-katalizli transesterifikasyon reaksiyonu başlangıç reaksiyon hızları. Deney ve analiz şartları sırasıyla bölüm 3.2.7 ve 3.2.3’de belirtilmiştir. HPLC metod 2 kullanmıştır.

5. GENEL SONUÇ

Bu çalışmada, RP-HPLC + 210 nm dalga boyunda UV dedektörü, sabit-lipaz sistemlerinin katalizlediği ayçiçek yağı metanoliz reaksiyonu mekanizmasını incelemek için kullanılabilmektedir. Reaksiyon esnasındaki her bir ara ürün ve ürünün tam analizi pozitif-iyon ve negatif-iyon APCI-MS ile yapılabilmektedir. Ayrıca ürünler metil ester standartları kullanılıp kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilmiştir. Diğer taraftan ayçiçek yağı metanol ile reaksiyonundaki sıcaklık, yağ:alkol mol oranı ve enzim miktarı için en uygun şartlar belirlenmiş ve lipazlar ile heptanda kinetik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Her bir lipazın yağ moleküllerine ilgisi kinetik analiz sonucunda belirlenebilmektedir. Bulgulara göre; Lipozyme TL IM ve Lipozyme RM IM reaksiyonunda ilk adım, Novozym 435-katalizli reaksiyonda ikinci ve üçüncü adımların daha hızlı gerçekleşmesi, tek enzim yerine iki enzim (örneğin, Novo 435/TL) kullanıldığında reaksiyonun kısa sürede tamamlanacağı sonucunu desteklemiştir. Lipazların regio-seçicilik, açıl göçünü katalizleyebilmesi, bazı yağ asitlerine olan seçiciliği de RP-HPLC metodu kullanılarak araştırılabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Al-Zuhair, S., "Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: A kinetic study." *Biotechnol Porg.*, 21 (2005), 1442-1448.
2. Camacho, F., Rolbes, A., Gonzales, P.A., Camacho, B., Esteban, L., Molina, E., 2006, "Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcholysis of triacylglycerol." *Applied Catalysis A: General*, 301 (2006), 158-168.
3. Chen, J.W., Wu, W-T., "Regeneration of immobilised *Candida antarctica* lipase for transesterification." *Journal of Bioscience and Bioenineereng*, 95-5 (2003), 466-469.
4. Christie, W.W., "Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography of Triacylglycerols." 2000, *Scottish Crop Research Institute*.
5. Chululaksananukul, W., Condoret, J.S., Delorme, P., Willemot, R.M., "Kinetic study of esterification by immobilized lipase in *n*-hexane." *FEB Letters*, 2-276 (1990), 181-184.
6. Deineka, V.I., Deineka, L.A., Gabruk, N.G., Fofanov, G.M., Manokhina, L.A., Sidel'nikova, N.A., "Analysis of vegetable oils by high-performance liquid chromatography." *Journal of Analytical Chemistry*, 12-58 (2003), 1160-1164.
7. Demirbaş, A., "Biodiesel production via non-catalytic SCF method and biodiesel fuel characteristics." *Energy Conversion and Management* 47,14-16 (2006), 2271-2282.
8. Dossat, V., Combes, D., Marty, A., "Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil." *Enzyme and Microbial Technology*, 30 (2002), 90-94.
9. Du, W., Xu, Y., Liu, D., "Lipase-catalyzed transesterification of soya bean oil for biodiesel production during continuous batch operation." *Biotechnol. App. Biochem.*, 38 (2003), 103-106.

10. Du, W., Xu, Y-Y., Liu, D-H., Li, Z-B., "Study on acyl migration in immobilized lipozyme TL-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 37 (2005), 68-71.
11. Elmas, P., "Umudumuz Biyodizel." AR&GE Bülten. Araştırma ve meslekleri geliştirme müdürlüğü, Ekim 2005.
12. Fureby, A.M., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., "Preparation of diglycerides by lipase-catalyzed alcholysis of triglycerides." 1997, Vol 20.
13. Garcia, T., Sanchez, N., Martinez, M., Aracil, J., "Enzymatic synthesis of fatty esters Part I. Kinetic approach." *Enzyme and Microbial Technology* 25 (1999), 584-590.
14. Holcapek, M., Jandera, P., Fischer, J., Prokes, B., "Analytical monitoring of the production of the biodiesel by high performance liquid chromatography with various detection methods." *Journal of Chromatography A*, 858 (1999), 13-31.
15. Holmquist, M., "Alpha/Beta-Hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanism." *Current Protein and Peptide Science*, 1 (2000), 209-235.
16. Hui, Y.H., "Bailey's industrial oil fats: Industrial and consumer non edible products from oils and fats." 5th ed., Wiley Inter-Science New York, 1996, 5.
17. Jensen, G.W., "Improved seperation of triglicerides at low temperatures by reversed-phase liquid chromatography." *Journal of Chromatography*, 204 (1981), 407-411.
18. Ji, J., Wang, J., Li, Y., Yu, Y., Xu, Z., "Preparation of biodiesel with the help of ultrasonic and hydrodynamic cavitation." *Ultrasonics* In Press, Corrected Proof, Available online 2 June 2006.
19. Junek, H., Mittelbach, M., Andreae, F., 1988, German Patent 3,727,981.

20. Kirk, O., Christensen, W., "Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin." *Organic Process Research & Development*, 6 (2002), 446-451.
21. Krishna, S. H., Karanth, N. G., 2001, "Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl butyrate: A kinetic study." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1547 (2001), 262-267.
22. Komers, K., Stloukal, R., Machek, J., Skopal, F., 2001, "Biodiesel from rapeseed oil, methanol and KOH Analysis of composition of actual mixture." *Eur. J. Lipid Sci. Technol* 103 (2001), 363–371.
23. Koolman, J., Röhm, K.H., "Renkli biyokimya atlası." 2002, Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd.Şti.
24. Köse, Ö., Tüter, M., Aksoy, A., "Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium." *Bioresource Technology*, 83 (2002), 125-129.
25. Lipozyme TL IM Product Sheet.
26. Lipozyme RM IM Product Sheet.
27. Marangoni, A.G., "Enzyme Kinetic a Modern Approach." 2002, Wiley Publishers.
28. Nelson, L.A., Foglia, T.A., Marmer, W.N., "Lipase-catalyzed production of biodiesel." *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 73 (1996), 1191-1195.
29. Novozym 435 Product Shett.
30. Olivera, A.C., Rosa, M.F., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S., "Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid: a kinetic study." *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* 11 (2001), 999-1005.
31. Peterson, C.L., "Vegetable oils as a diesel fuels: status and research priorities." *Transaction of the ASAE*, 29 (1986), 1413-1422.

32. Salis, A., Solinas, V., Monduzzi, M., “Wax ester synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilized lipases.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21 (2003), 167-174.
33. Samukawa, T., Kaieda, M., Matsumoto, T., Ban, K., Kondo, A., Shimada, Y., Noda, H., and Fukuda, H., “Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil.” *J. Biosci. Bioeng.*, 90 (2000), 180-183.
34. Shimada, Y., Watanabe, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., “Enzymatic alcoholysis for biodiesel production and application of the reaction to oil processing.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17 (2002), 133-142.
35. Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugibara, A., Noda, IL, Fukuda, I-I., and Tominaga, Y., “Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase.” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76 (1999), 789-793.
36. Soumanou, M.M., Bornscheuer, U.T., “Lipase-catalyzed alcoholysis of vegetable oils.” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 (2003), 656-660.
37. Srivastava, A., Prasad, R., “Triglycerides-based diesel fuels.” *Renewable & Sustainable Energy Review*, 4 (2000), 111-133.
38. Xu, Y., Du, W., Zeng, J., Liu, D., 2004, “Conversion of soybean oil to biodiesel fuel using Lipozyme TL IM in a solvent-free medium.” *Biocat. And Biotrans.* 22 (2004), 45-48.
39. Xu, Y., Du, W., Liu, D., “Study on kinetics of enzymatic interesterification of trigliserides for biodiesel production with methyl acetate as the acyl acceptor.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32 (2005), 241-245.
40. Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., “Stepwise ethanolysis of tuna oil using immobilized *Candida antarctica* lipase.” *J. Biosci. Bioeng.*, 88 (1999), 622-626.

41. Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Noda, H., Fukuda, H., and Tominaga, Y., "Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase." *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 77 (2000), 355-360.
42. Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., "Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor." *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 78 (2001), 703-707.
43. Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., "Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 17 (2002), 151-155.
44. Wu, H., Zong, M., Luo, Q., Wu, H., "Enzymatic conversion of waste oil to biodiesel in a solvent-free system." *Prepr. Pap. Am. Chem. Soc. Div. Fuel Chem.*, 48 (2003), 533-534.
45. Yadav, G.D., Devi, K.M., "Enzymatic synthesis of perlauric acid using Novozym 435." *Biochemical Engineering Journal* 10(2002), 93-101.
46. Yadav, G.D., Lathi, P.S., "Lipase catalyzed transesterification of methyl acetoacetate with *n*-butanol." *Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic* 32 (2004), 107-113.
47. Yang, T., Fruekilde, M-B., Xu, X., "Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming." *Food Chemistry*, 92(2005), 101-107.
48. Yong, Y.P., Al-Duri, B., "Kinetic studies on immobilised lipase esterification of oleic acid and octanol." *J.Chem.Tech.Biotechnol.* 65 (1996), 239-248.
49. Zhang, J., Wu, J., Yang, L., "The kinetic study on lipase-catalyzed asymmetric alcoholysis of α -cyano-benzyl acetate in organic media." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 31(2004), 67-72.

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: Şaban KALAY

DOĞUM YERİ: BAFRA/SAMSUN

DOĞUM TARİHİ: 26.10.1980

LİSANS: ÇANAKKALE 18 MART ÜNİVERSİTESİ

FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ (2002)

YÜKSEK LİSANS: Eylül 2002-Haziran 2003 Yabancı Dil Hazırlık

Eylül 2003-Haziran 2004 Ders Dönemi

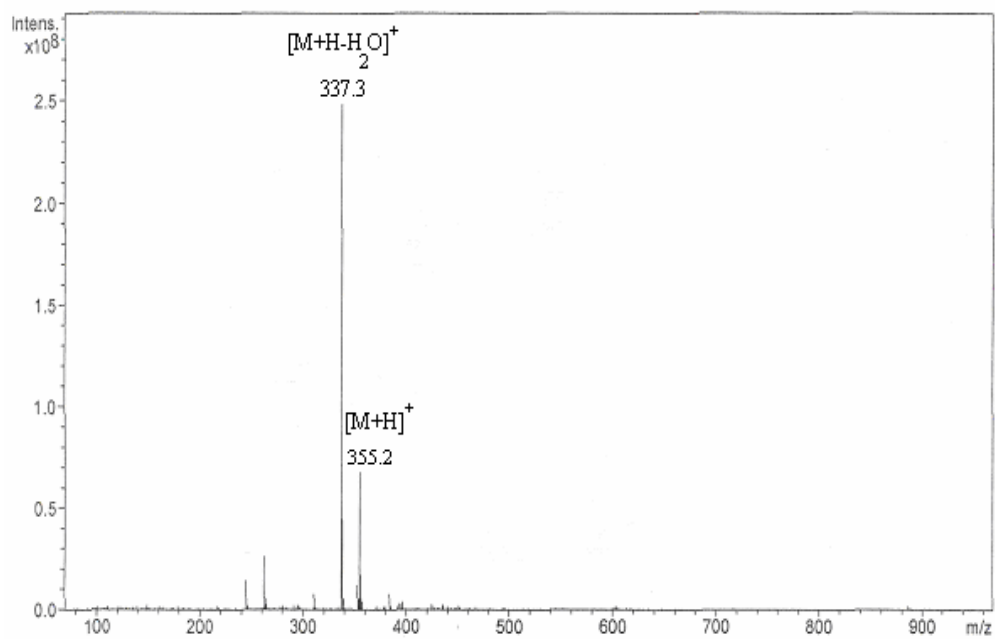
Eylül 2004-Haziran 2006 Tez Dönemi

EKLER

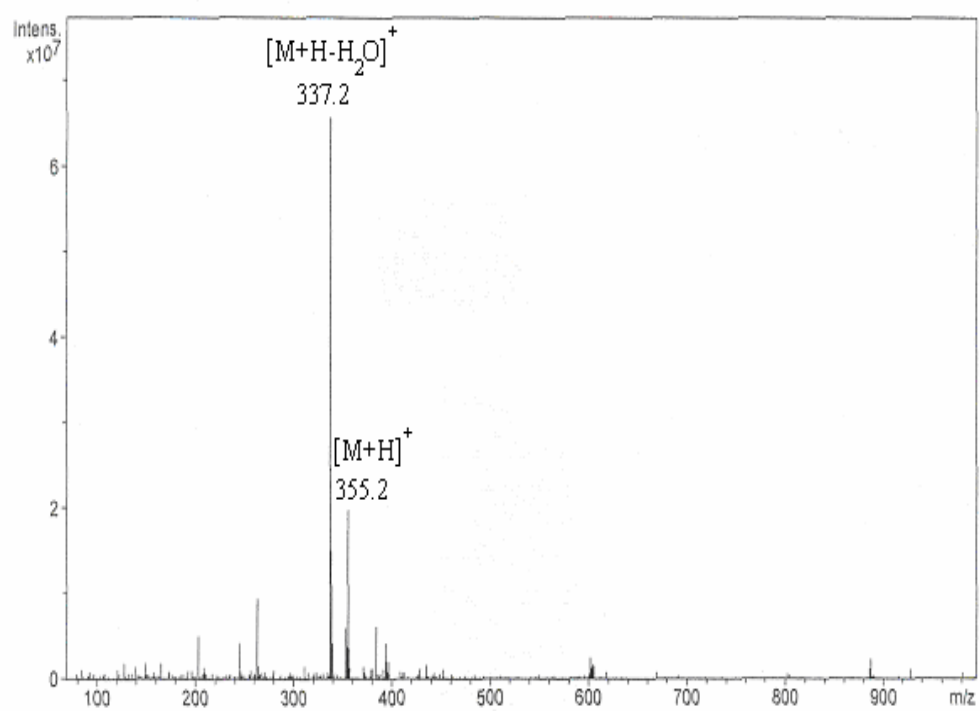
EK 1.

Ayçiçek Yağ ve Metanolden RM IM Lipaz-Katalizli
YAME Üretimi Sırasında Gözlemlenen Moleküllerin
Pozitif İyon APCI-MS Spektrumları

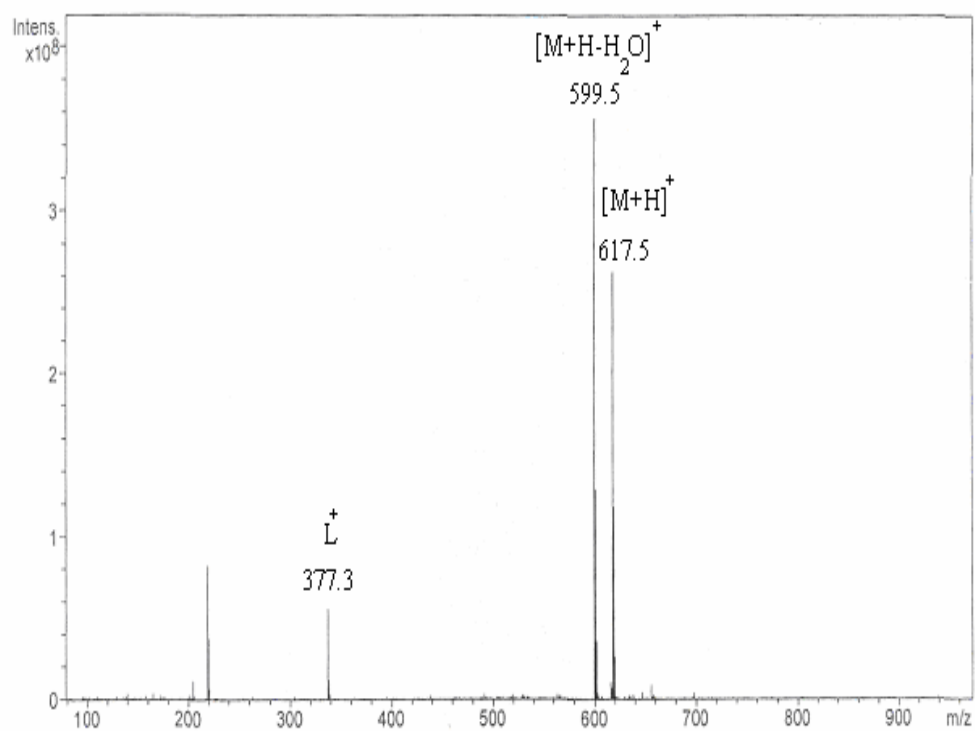
2-L (2-linoleilgliserol).



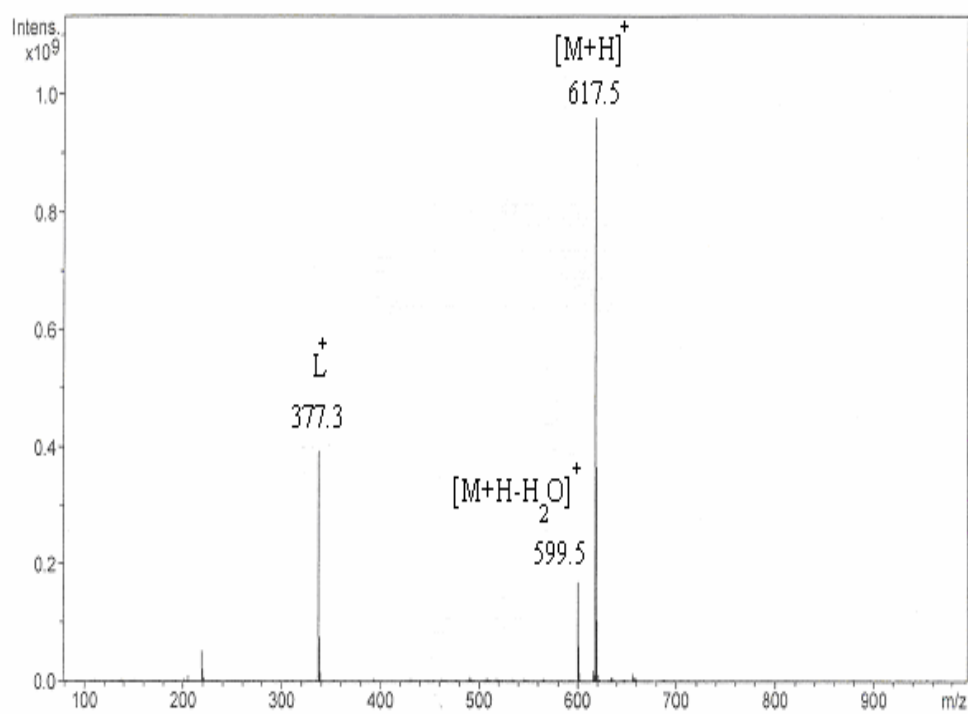
1(3)-L (1(3)-linoleilgliserol).



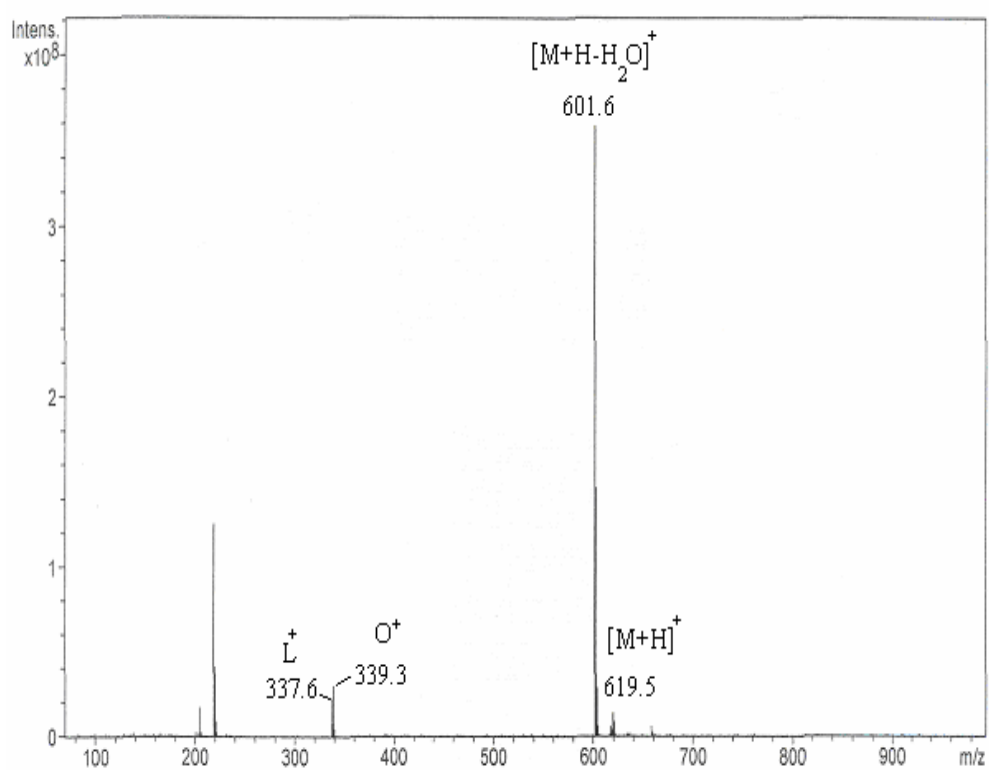
1,3-LL (1,3-dilinoleilgliserol).



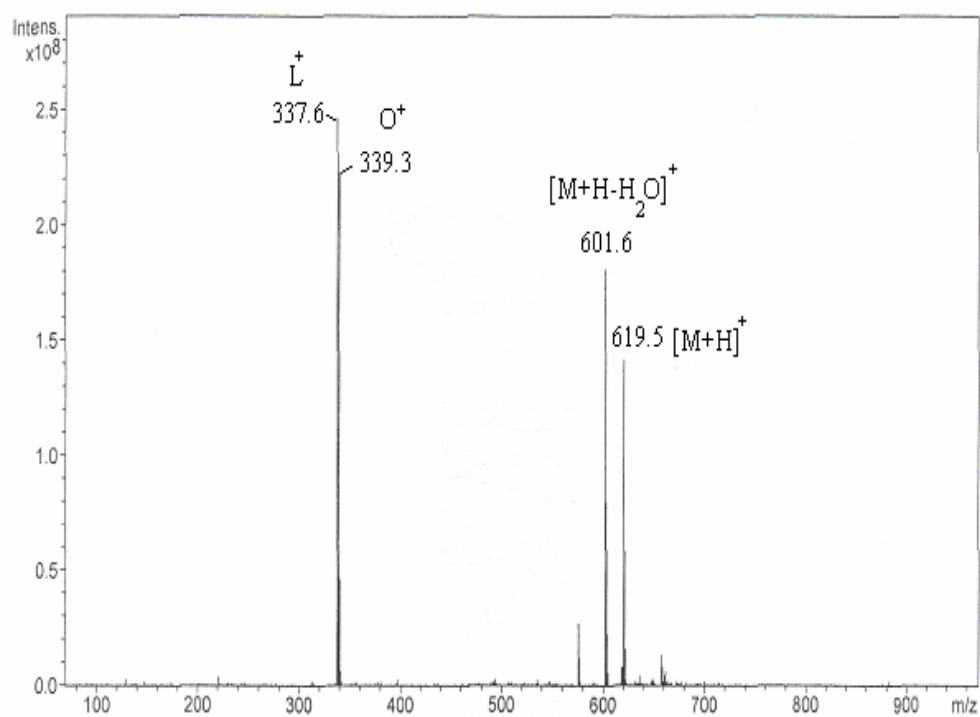
1,2-LL (1,2-dilinoleilgliserol).



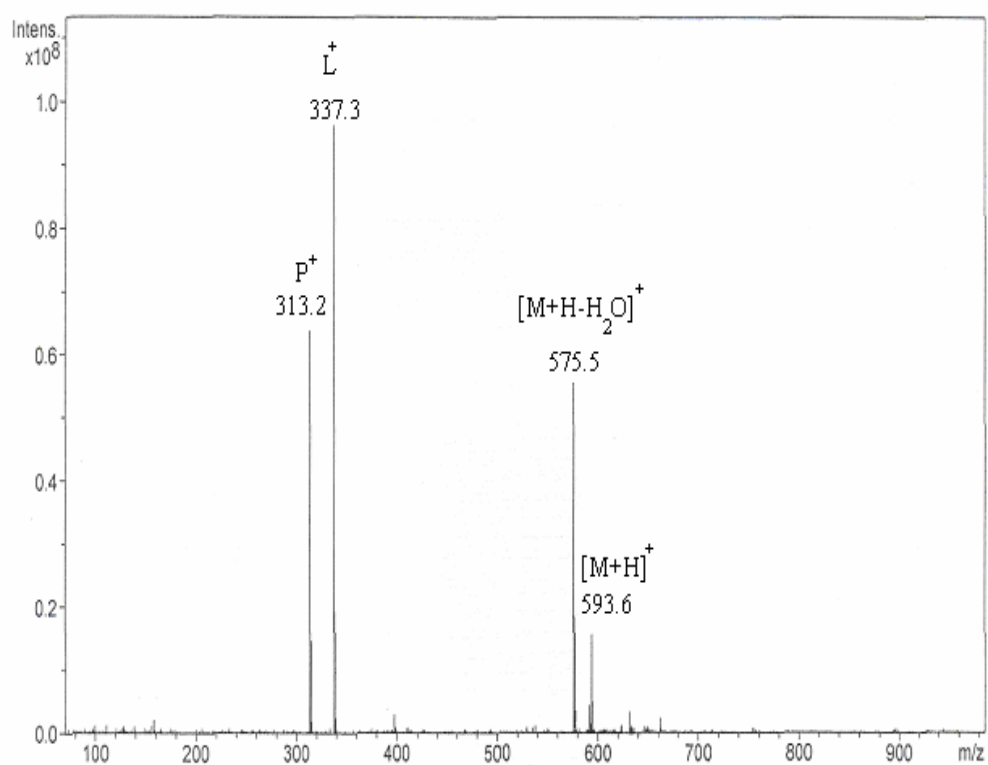
1,3-OL (oleillinoleilgliserol).



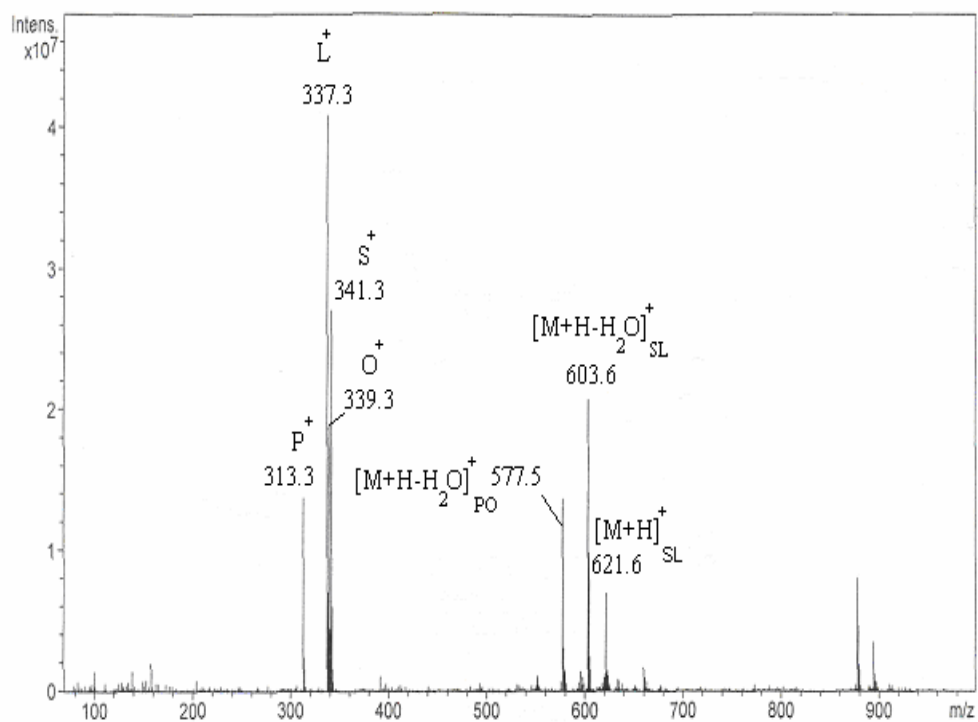
1,2-OL (oleillinoleil gliserol).



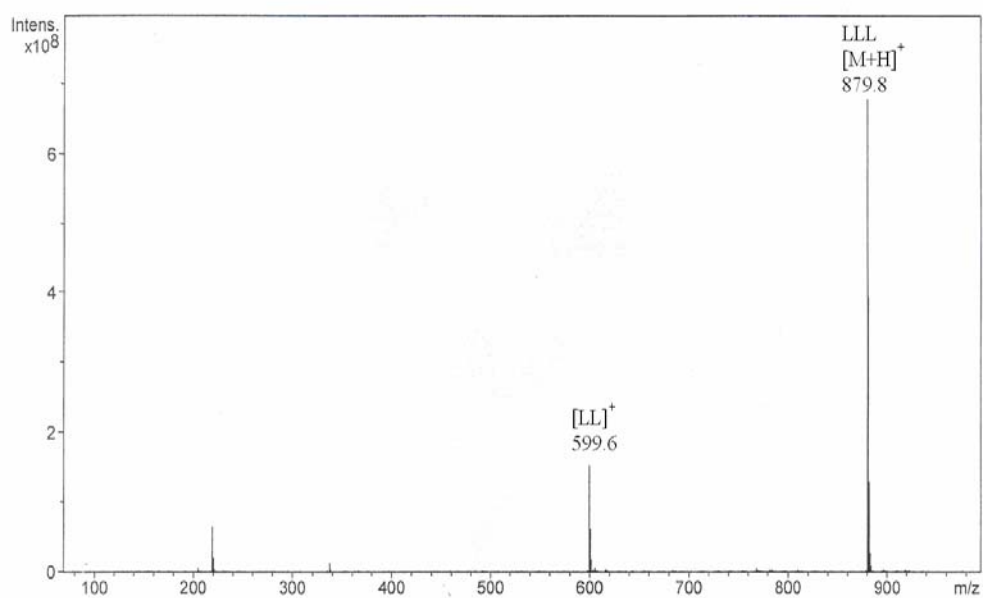
1,2-LP (1,2-linoleilpalmitilgliserol).



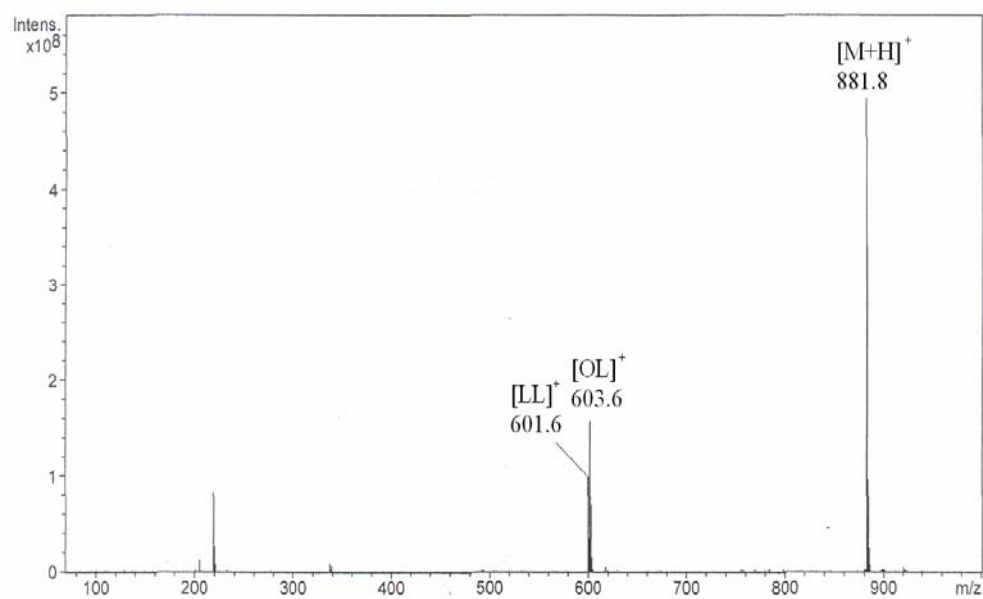
SL (stearillinoleilgliserol).



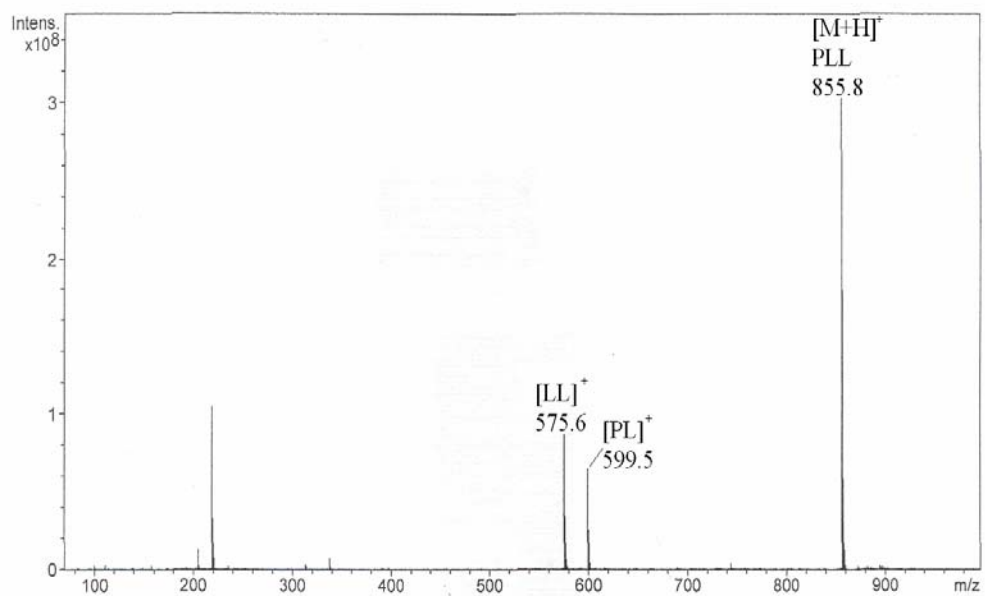
LLL (trilinolein).



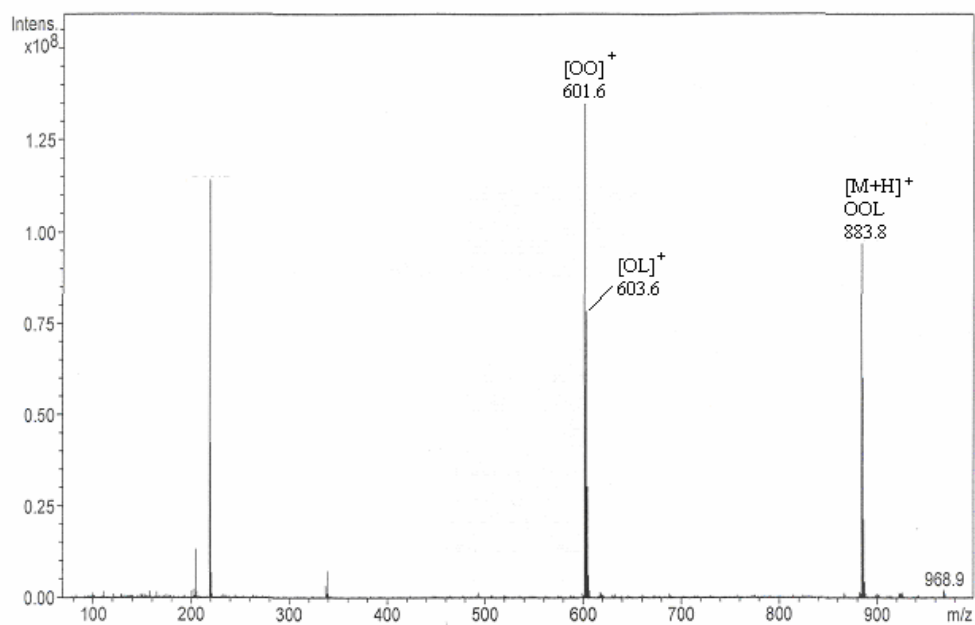
OLL (oleildilinolein).



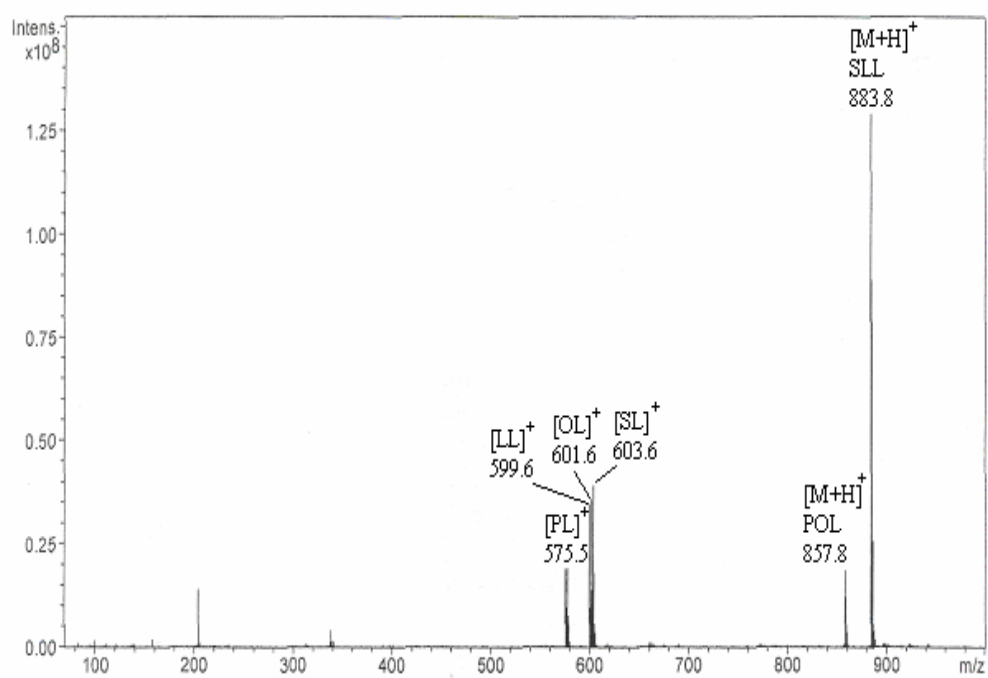
PLL (palmitildilinolein).



OOL (dioleillinolein).



SLL (stearildilinolein) = 882.7 g/mol, POL (palmitiloleillinolein) M1 = 856.7 g/mol



EK 2.

Bu tezdeki bazı sonuçlarla

“Journal of Chromatography A”

dergisinde yapılan yayın



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Chromatography A, xxx (2006) xxx–xxx

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY Awww.elsevier.com/locate/chroma

Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases

Ali Türkan*, Şaban Kalay

Department of Chemistry, Faculty of Science, Gebze Institute of Technology, Çayırova 41400 Gebze/Kocaeli, Turkey

Received 20 April 2006; received in revised form 17 May 2006; accepted 22 May 2006

Abstract

Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV detection at 210 nm was used to monitor the formation of the major compounds during the lipase-catalyzed transesterification reaction of sunflower oil with methanol. Individual triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerols as well as fatty acids and their corresponding methyl esters were separated using acetonitrile/acetone as a mobile phase and a combined linear gradient-isocratic-step gradient-isocratic elution procedure. Another relatively short method consisting of a linear gradient elution followed by an isocratic elution gave similar results, yet with lower resolution. HPLC/mass spectrometry with an ion trap analyzer and atmospheric pressure chemical ionization source was used for the identification of the individual compounds. Individual calibration curves obtained with UV detection at 210 nm were found to be of use for quantitative analyses of double-bond containing methyl esters and acylglycerols. The use of the RP-HPLC methods in the elucidation of the mechanisms of three immobilized lipases, namely Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM and Novozym 435, in biodiesel production was described.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Reversed-phase HPLC; Biodiesel; Immobilized-lipases; Mechanism; Sunflower oil

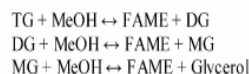
1. Introduction

Enzymatic production of biodiesel (fatty acid methyl esters, FAMES) from vegetable oils by transesterification reaction with methanol has drawn a great attention because of some of its advantages over traditional chemical catalysis such as having mild reaction conditions and producing no chemical waste [1,2]. Lipases (E.C.3.1.1.3) are the enzymes of interest that are used in biodiesel production as well as in hydrolysis of lipids [1,2]. Complete conversion of triacylglycerols (TGs) to FAMES catalyzed by a lipase occurs at least at three reversible steps with monoacylglycerol (MG) and diacylglycerol (DG) intermediates (Scheme 1).

Lipases from various sources have been used so far for transesterification of vegetable oils with methanol in organic solvents as well as in solvent-free systems [2–8]. Particularly, a number of

immobilized-lipase systems such as Novozym 435 from *Candida antarctica*, Lipozyme RM IM from *Rhizomucor miehei*, and Lipozyme TL IM from *Thermomyces lanuginosus* have been shown to be effective in biodiesel production from vegetable oils in solvent-free media [6–8]. Many studies have been carried out to select the most suitable lipase system for biodiesel production, yet the mechanisms of the enzymatic reactions have not been investigated thoroughly [6–8]. The studies of the kinetics and the mechanism of enzymes provide the essential parameters for the selection of the best lipase system in biodiesel production. In this regard, a reliable technique is required to monitor the compounds occurring during the biodiesel production from the vegetable oils. Gas chromatography is the most widely used method for the analysis of FAMES, but is not convenient for the analysis of DGs and MGs unless they are derivatized before the analysis by trimethylsilylation or acetylation of the free hydroxyl groups, which is time-consuming and labor-intensive [9,10]. Although high temperature gas chromatography with a short capillary column can be used for the analysis of FAMES, TGs, DGs and MGs in a single run, trimethylsilylation of

* Corresponding author. Tel.: +90 262 605 3132; fax: +90 262 605 3101.
E-mail address: a.turkan@gyte.edu.tr (A. Türkan).



Scheme 1.

glycerol, DGs and MGs still has to be done prior to analysis [9].

On the other hand, HPLC makes viable direct analysis of FAMES, TGs, DGs and MGs in a single run without derivatization [11]. Reversed-phase HPLC (RP-HPLC) has been widely used for the separation of acylglycerols in the isocratic elution mode as well as in the gradient elution mode [12]. Isocratic elution with acetonitrile (ACN)-dichloromethane (68:32), ACN-acetone (30:70), or 100% *n*-propionitrile is sufficient in the RP-HPLC resolution of TGs [13–15]. However, the gradient (linear, step, etc.) elution has been the choice of the method for the separation of FAMES, TGs, DGs and MGs in a single run [11,16–18]. In the gradient elution mode, the choice of the mobile phase depends on its compatibility with the available detection mode; particularly, chlorinated solvents such as chloroform and dichloromethane cannot be used with UV detection because they show strong absorbance at wavelengths (i.e., 205–220 nm) where TGs are detected. Also, acetone has some absorbance at 205–220 nm, yet not as strong as those of chlorinated solvents. In such cases, other modifiers, such as methanol, ethanol, methyl butylether, *n*-propionitrile, and 2-propanol have been utilized [15,16,19,20]. A linear gradient from 100% methanol or 100% acetonitrile to 100% 2-propanol can be used in the RP-HPLC separation of TGs [17,21]. Holcapek et al. [11] used a combined linear gradient with aqueous-organic and non-aqueous mobile phase steps (from 70% ACN + 30% water to 100% ACN in 10 min, and then to 50% ACN + 50% 2-propanol-hexane (5:4, v/v) in 20 min) to separate the compounds occurring during the production of biodiesel from rapeseed oil by chemical catalysis.

Various detection techniques including UV detection [11,20], refractive index detection [14,22], flame ionization detection [23,24], evaporative light scattering (ELS) detection [11,24], and mass spectrometric (MS) detection [11,19,25] have been employed along with HPLC for the determination of acylglycerols. The quantification of the acylglycerols can be achieved using UV at 205–210 nm, ELSD and MS detectors [11,24]. Unlike ELS and MS detectors, UV is the most widely available detector. However, as mentioned above, UV has limited use with the solvents (e.g., chlorinated solvents) having absorbance at wavelengths where acylglycerols are detected. MS methods with various ionization techniques such as electron ionization [26], chemical ionization [27], electrospray ionization [28] and atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) [11,17,29] have also been successfully used for the determination of the lipid structures. The APCI has been considered the most successful ionization technique [11,25], as it provides both the structural and the molecular mass information and full compatibility with common HPLC conditions for the separation of acylglycerols.

The main objective of this study was to develop an HPLC method to monitor, qualitatively and quantitatively, the compounds occurring during a lipase-catalyzed biodiesel production

from vegetable oils, which, in turn, can be used in the elucidation of the mechanism of the lipase-catalyzed reaction. For this purpose, two RP-HPLC procedures with UV detection at 210 nm were proposed and used in the analysis of the samples taken at certain time intervals from the transesterification reactions of sunflower oil with methanol catalyzed by Novozym 435, Lipozyme RM IM, and Lipozyme TL IM. The individual compounds occurring during the transesterification reactions were determined by HPLC/MS with an ion trap analyzer and atmospheric pressure chemical ionization source. Using individual calibration curves obtained with UV detection at 210 nm, the quantitative analyses of double-bond containing products (methyl esters) and the intermediates (mono- and diacylglycerols) were found to be feasible. Finally, the HPLC results were evaluated in terms of the elucidation of the mechanisms of the lipases in biodiesel production.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Novozyme 435, Lipozyme RM IM, and Lipozyme TL IM were generous gifts from Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark). The standards of methyl linoleate, methyl oleate, methyl stearate, methyl palmitate, 1-oleoyl glycerol, 1,2-dioleoyl glycerol, trioleoyl glycerol and 1,2-dilinoeoyl glycerol were from Sigma. All solvent used were HPLC grade and from Merck (Darmstadt, Germany). Refined sunflower oil was purchased from a local store. For the determination of fatty acid composition, sunflower oil (0.5 g oil in 10 mL heptane) was transmethylated with 1 N NaOH in methanol at 80 °C for 30 min. Glycerol and excess methoxide were removed by aqueous extraction as suggested by Bannon et al. [30]. Fatty acid methyl esters were analyzed on an Agilent 6890 (Agilent Tech., USA) gas chromatography (GC) equipped with a split/split-less injector ($t = 250^\circ\text{C}$) and flame ionization detector ($t = 250^\circ\text{C}$). A silica capillary column (30 m $\times$ 0.53 mm i.d. $\times$ 0.5 μm film thickness) coated with DB-WAX (polyethylene glycol, JW) was used. Helium was used as the carrier gas at a flow-rate of 5.1 mL/min. Air and hydrogen flow-rates were 400 and 50 mL/min, respectively. The oven temperature was set to 100 °C for 2 min and then heated to 210 °C with a heating rate of 20 °C/min and maintained at this temperature for 15 min. Methyl heptadecanoate was used as an internal standard. The fatty acid composition was linoleic acid 64.9%, oleic acid 23.5%, palmitic acid 6.0% and stearic acid 4.2% (minors not included). The acid and saponification values of the oil were 0.057 and 132, respectively.

2.2. Transesterification reactions in solvent-free conditions

Batch reactions were carried out in 30 mL glass-vials containing sunflower oil (10 g), and methanol (added at three steps, each 0.33 g or 1.03 mmol). The reactions were initiated by adding the enzyme (4 or 10%, w/w oil) last after equilibrating the reaction mixture at 40 °C. The reactions were agitated by mixing with a magnetic stir at 200 rpm in a water bath at 40 °C. At specified time-intervals, 10–30 μL aliquots were withdrawn and diluted

to 500–1000 μL final volume with acetone (HPLC grade) and subjected to the HPLC analysis.

2.3. HPLC analyses

HPLC analyses were performed with an HP1100 (Agilent Tech.) series liquid chromatograph consisting of a quaternary pump with an online vacuum degasser, an autosampler with a variable injection capacity from 1 to 900 μL , a column oven with a temperature range of 7–60 $^{\circ}\text{C}$ and a diode array UV–vis detector. Lipid molecules were separated on an ACE 3 C18 column (150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 3 μm) with guard column (30 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 3 μm) of the same phase at a column flow-rate of 1.0 mL/min and at a column temperature of about 10 $^{\circ}\text{C}$ using the following methods:

Method 1: a linear gradient elution from 100% acetonitrile to 50% acetonitrile + 50% acetone over 3 min, followed by 12 min isocratic elution at 50% acetonitrile + 50% acetone, and then step gradient to 30% acetonitrile + 70% acetone, and 25 min isocratic elution at the same final composition.

Method 2: a linear gradient elution from 100% ACN to 30% ACN + 70% acetone over 3 min, followed by a 25 min isocratic elution at the same final composition.

Note that it takes about 5 min, at the flow-rate of 1.0 mL/min, for the mobile phase to reach the column from the mixing chamber of the instrument. The column was equilibrated for 10 min before the next injection. Sample injection volume was 5–20 μL . Acquisition and processing of data was made using the HP Chemstation software provided with the instrument. The background chromatogram obtained with the injection of acetone alone was subtracted.

2.4. HPLC/mass spectrometry (HPLC/MS) analyses

HPLC/MS analyses were conducted with an HPLC 1100/MSD Ion Trap SL Model (Agilent Tech.) using RP-HPLC method 1 and Zorbax XDB C18 (150 mm $\times$ 4.6 mm i.d., 5 μm) column with atomic pressure chemical ionization probe connected in series to a diode array UV detector. The flow-rate was 1.0 mL/min and the column temperature was about 10 $^{\circ}\text{C}$. The mass spectrometric data were acquired in the range m/z 35–1000 with the following setting of tuning parameters: alternating ion-polarity mode, pressure of the nebulizing gas 60 psi, drying gas flow-rate 5 mL/min, the temperatures of the drying gas and APCI heater were 350 and 400 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The retention time of all the compounds identified by APCI-MS are given in Table 1.

2.5. Quantitative analyses

The calibration curves were measured in two series of experiments. Each data point was obtained from at least two repeated measurements. Stock solutions of the standards MeL and 1,3-LL were prepared as about 5 mg/mL, and of the standards MeO, 1-O and 1,3-OO as about 10 mg/mL in acetone, and then serial dilutions were made as required. Relative integrated peak

areas versus amount of the methyl ester standard were plotted for MeL and MeO. The constants of calibration curves (relative peak areas versus amount of compound) of the standards determined by linear regression analysis are given in Table 3.

3. Results and discussion

3.1. HPLC separation of the compounds occurring during lipase-catalyzed transesterification reaction

Reversed-phase HPLC (RP-HPLC) method 1 with UV detection at 210 nm was proposed for the separation and the determination of the major compounds occurring during the lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil. Since 90% of the total fatty acids of sunflower oil are composed of linoleic (containing two double bonds) and oleic (containing single double bond) acids, the majority of the compounds are detectable at 210 nm.

Fig. 1 demonstrates the separation of the individual fatty acid methyl esters (FAMES), monoacylglycerols (MGs), diacylglycerols (DGs) and triacylglycerols (TGs) occurring in the sample taken from the Lipozyme RM IM-catalyzed transesterification reaction of sunflower oil using the RP-HPLC method 1. The major products were methyl linoleate and methyl oleate. The major intermediates were *sn*-2 and *sn*-1 monolinoleoyl glycerol, *sn*-1,2 and *sn*-1,3 dilinoleoyl and oleoyl-linoleoyl glycerols, and 1,2-palmitoyl-oleoyl glycerol. Furthermore, in Fig. 1, the main triacylglycerol molecules of sunflower oil (LLL, OLL, PLL, OOL, and SLL+POL) are also apparent (see Table 1 for abbreviations). Fig. 2 illustrates the separation of a mixture of some standards and a sample taken from RM IM-catalyzed transesterification reaction under the conditions of RP-HPLC method 1. The retention time increases in the order: MGs < FAMES < DGs < TGs. The individual FAME, MG, DG and TG molecules were separated from each other, except the pairs, SLL/POL (ECN = 46), and SOL/POO (ECN = 48). Fur-

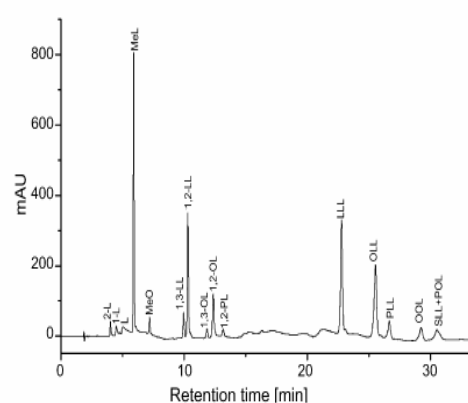


Fig. 1. HPLC separation of the reaction mixture of lipozyme RM IM-catalyzed methanolysis of sunflower oil. Reaction carried out with 4% (w/w oil) enzyme as described in Section 2.2 and the sample withdrawn at 40 min. HPLC conditions of method 1 as described in Section 2.3, UV detection at 210 nm, flow-rate 1 mL/min, column temperature about 10 $^{\circ}\text{C}$, injection volume 10 μL . Notation of compounds as in Table 1.

Table 1

Retention times and molecular masses of the components identified by APCI/MS with an ion trap analyzer during the transesterification of sunflower oil with methanol catalyzed by Lipozyme RM IM

t_R (min)	r^a	Name	Notation	ECN ^b	Molecular mass
Fatty acids					
5.5	0.74	Linoleic acid	L acid	–	280.3
6.6	1.00	Oleic acid	O acid	–	282.3
7.5	1.21	Palmitic acid	P acid	–	256.3
9.1	1.60	Stearic acid	S acid	–	284.3
Monoacylglycerols					
4.5	0.66	2-Monolinolein	2-L	14	354.3
4.8	0.75	1-Monolinolein	1-L	14	354.3
5.4	0.94	2-Monoolein	2-O	14	356.3
5.6	1.00	1-Monoolein	1-O	16	356.3
5.8	1.06	1-Monopalmitin ^c	1-P	16	330.3
6.8	1.38	1-Monostearin ^c	1-S	18	358.3
Methyl esters of fatty acids					
6.1	0.79	Methyl ester of linoleic acid	MeL	–	294.3
7.1	1.00	Methyl ester of oleic acid	MeO	–	296.3
7.3	1.06	Methyl ester of palmitic acid	MeP	–	270.3
9.9	1.60	Methyl ester of stearic acid	MeS	–	298.3
Diacylglycerols					
9.7	0.60	1,3-Dilinolein	1,3-LL	28	616.5
10.0	0.62	1,2-Dilinolein	1,2-LL	28	616.5
11.7	0.76	1,3-Oleoyl-linoleoyl-glycerol ^d	1,3-OL	30	618.5
12.2	0.80	1,2-Oleoyl-linoleoyl-glycerol ^d	1,2-OL	30	618.5
12.4	0.82	1,3-Palmitoyl-linoleoyl-glycerol ^d	1,3-PL	30	592.5
13.0	0.87	1,2-Palmitoyl-linoleoyl-glycerol ^d	1,2-PL	30	592.5
14.6	1.00	1,3-Diolein	1,3-OO	32	620.5
15.2	1.05	1,2-Diolein	1,2-OO	32	620.5
15.3	1.06	1,3-Stearoyl-linoleoyl-glycerol ^d	1,3-SL	32	620.5
15.4	1.07	1,3-Palmitoyl-oleoyl-glycerol ^d	1,3-PO	32	594.5
16.3	1.14	1,2-Stearoyl-linoleoyl-glycerol ^d	1,2-SL	32	620.5
16.4	1.15	1,2-Palmitoyl-oleoyl-glycerol ^d	1,2-PO	32	594.5
18.9	1.35	1,3-Stearoyl-oleoyl-glycerol ^d	1,3-SO	34	622.6
19.5	1.40	1,2-Stearoyl-oleoyl-glycerol ^d	1,2-SO	34	622.6
Triacylglycerols					
22.8	0.62	Trilinolein	LLL	42	878.8
25.9	0.72	Oleoyl-dilinoleoyl-glycerol ^d	OLL	44	880.8
27.0	0.75	Palmitoyl-dilinoleoyl-glycerol ^d	PLL	44	854.8
29.8	0.84	Dioleoyl-linoleoyl-glycerol ^d	OOL	46	882.8
31.2	0.88	Stearoyl-dilinoleoyl-glycerol ^d	SLL	46	882.8
31.4	0.89	Palmitoyl-oleoyl-linoleoyl-glycerol ^d	POL	46	856.8
35.1	1.00	Triolein	OOO	48	884.8
36.6	1.05	Stearoyl-oleoyl-linoleoyl-glycerol ^d	SOL	48	884.8
37.1	1.06	Palmitoyl-dioleoyl-glycerol ^d	POO	48	858.8

^a Relative retention $r = (t_R - t_M)/(t_S - t_M)$, where t_M is 2.4 min and t_S are retention times of a standard compound in each group (standards: O acid, 1-O, MeO, 1,3-OO, OOO). HPLC conditions of method 1 as described in Section 2.4.

^b ECN is the equivalent carbon number, $ECN = CN - 2DB$, where CN is the number of carbon atoms in all acyls and DB is the number of double bonds.

^c Since only a single peak was observed for monostearin as well as for monopalmitin, and saturated fatty acids are mostly located at *sn*-1 position, low amounts of 2-P and 2-S are neglected.

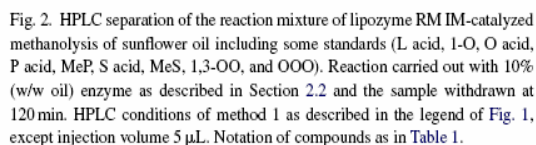
^d Positional isomers (e.g., 1,2-LL-3-O vs. 1,3-LO-2-L or 1-O-2-L vs. 1-L-2-O) are not distinguished.

thermore, *sn*-2 and *sn*-1 isomers of MGs as well as *sn*-1,2 and *sn*-1,3 isomers of DGs were completely resolved.

RP-HPLC method 2, which is 10 min shorter than method 1, was intended for faster analysis of the reaction samples. With the method 2, the separation of the FAMES, MGs, DGs, and TGs are also feasible and in the same order as obtained with RP-HPLC method 1, though the resolution was not as good as in method 1 (Fig. 3). The method 2 was employed in the quantitative determination of methyl esters (biodiesel) as well as in monitoring

the variations in the concentrations of the intermediates during lipase-catalyzed biodiesel production reactions (Fig. 3).

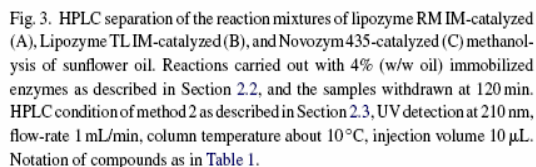
HPLC-mass spectrometry was used, as mentioned below in detail, to identify each compound (including the minors not detectable by UV at 210 nm) occurring during the lipase-catalyzed reaction. In addition to confirming the peaks identified by pure standards and identifying those not detected by UV, the mass data also helped determine the coeluting compounds, 1,2-OL/1,3-PL (ECN = 30), 1,2-OO/1,3-SL/1,3-PO



(ECN = 32), 1,2-SL/1,2-PO (ECN = 32), SLL/POL (ECN = 46), and SOL/POO (ECN = 48). Holcapek et al. [11] described the deconvolution of overlapping APCI-MS peaks of some DGs and TGs. Fig. 4 illustrates the reconstruction of the selected ion chromatograms of ions m/z 339 and 337, as an example, from the total ion chromatogram in the positive-ion mode. Furthermore, the selected ion chromatograms of the ions that gave good signal in the negative-ion mode such as ions produced from the methyl esters and fatty acids were constructed from the total ion chromatogram obtained in the negative-ion mode. By this way, the exact retention times of coeluting compounds were determined. Table 1 shows the masses of the compounds identified and their relative retention times. As expected, the retention times obtained with another instrument showed some variations. Hence, the table also lists the relative retention times, related to an easily identifiable compound in each group: O acid, 1-O, MeO, 1,3-OO and OOO, as suggested by Holcapek et al. [11].

The molecular masses of individual compounds and, therefore, the structure of acylglycerols can be readily determined by atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry (APCI-MS) [11,17,31]. Table 2 shows the masses and the relative abundances of the important ions of the compound(s) in each peak in the positive-ion mode. The positive APCI-MS spectra of TGs showed two major ions: protonated molecule $[M+H]^+$ (ion A) and the ions $[M+H-R_i\text{COOH}]^+$ (ion C) formed by loss of one fatty acid moiety from the ion A. Representative mass spectra of tri-, di-, and monoacylglycerols are shown in Fig. 5. Five major peaks corresponding to LLL, OLL, PLL, OOL and SLL + POL, and two relatively small peaks corresponding to OOO and SOL + POO were observed in the RP-HPLC chromatograms of sunflower oil. As expected LLL and OOO provided only a single ion C, while OLL, PLL, OOL, SLL and POO produced two different types of ion C, and POL and SOL three different types of ion C. The statistical abundance ratios of C ions are supposed to be 2:1 for OLL, PLL, OOL, SLL and POO, and 1:1:1 for POL and SOL. However, the actual ratio values deviate from the theoretical values. For example, the ratio $[OL]^+/[LL]^+$ is about 1.5, $[PL]^+/[LL]^+$ is 1.4, $[SL]^+/[LL]^+$ is 1.1 and $[PO]^+/[OO]^+$ is 1.6, and the abundance ratio of C ions of POL (i.e., $[PO]^+:[PL]^+:[OL]^+$) is 1.2:1:2. These results indicate that *sn*-1, *sn*-2 and *sn*-3 positions are not equally susceptible to cleavage. Cleavages of fatty acid moieties from *sn*-1 and *sn*-3 positions are more likely compared to that from *sn*-2 position [31]. Mottram et al. [32] reported that *sn*-2 position is energetically less susceptible to cleavage, thus the relative abundance of the different types of the $[M+H-R_i\text{COOH}]^+$ ions can be utilized to identify the acyl group predominant in the *sn*-2 position. However, Holcapek et al. [17] showed that the relative abundance of the different types of the $[M+H-R_i\text{COOH}]^+$ ions depend on the ionization technique as well as on the instrument type, and thus suggest using pure standards on that particular instrument.

In the mass spectra of DGs, in addition to the ions of the protonated molecules (i.e., $[M+H]^+$), $[M+H-H_2O]^+$



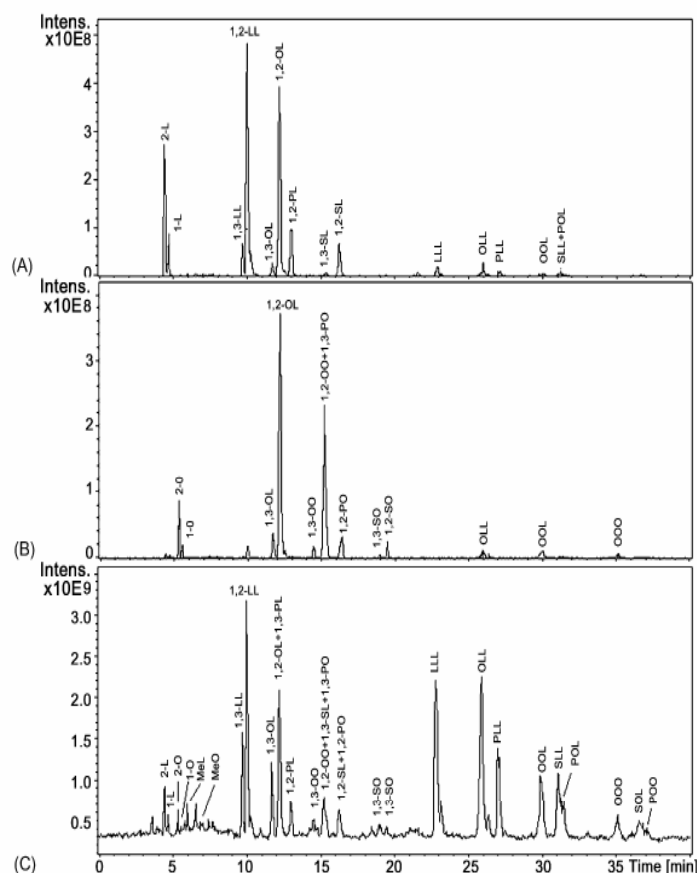


Fig. 4. HPLC separation of the reaction mixture of lipozyme RM IM-catalyzed methanolysis of sunflower oil. Reaction carried out with 4% (w/w oil) enzyme as described in Section 2.2 and the sample withdrawn at 40 min. APCI-MS, HPLC conditions as described in Section 2.4. Selected ion current chromatograms of ions m/z 337 (A) and 339 (B), and positive-ion modes of total ion current (TIC) chromatogram (C) are shown.

and $[M+H-R_1COOH]^+$ ions were apparent. As suggested by Holcapek et al. [11] as a rule, the ratio $[M+H-H_2O]^+ / [M+H-R_1COOH]^+$ can be used to distinguish *sn*-1,3 isomers from *sn*-1,2 isomers in that the ratio is higher for 1,3-DAG isomers. Using this rule we were able to distinguish *sn*-1,2 isomers from *sn*-1,3 isomers. The peaks corresponding to 1,2-LL and 1,3-LL were already unambiguously identified using pure standards, but APCI-MS analysis provided further confirmation.

Two ions, $[M+H]^+$ and $[M+H-H_2O]^+$, were observed in the mass spectra of the MGs. It was impossible to differentiate between *sn*-2 and *sn*-1 isomers since both had exactly similar mass spectra. However, the following clues helped us distinguish one from another: (a) it has been well established that *sn*-2 isomers elute before *sn*-1 isomers in RP-HPLC methods [11]; (b) *sn*-2 isomers build up first in the beginning of methanolysis of sunflower oil catalyzed by lipozymes RM IM and TL IM which are *sn*-1(3) specific lipases as discussed below. We observed that *sn*-2 isomers accumulated first and then were converted to *sn*-1 isomers through acyl migration (see Section 3.4). In contrast to monolinolein and monoolein peaks, monostearin and monopalmitin peaks were identified in the negative-ion mode APCI, where more distinct signals were observed.

The positive-ion APCI mass spectra of the methyl esters were not as clear as those of TGs, DGs or MGs. For example, the masses of the base peaks in the mass spectra of MeL and MeO were 371.3 (+76 m/z units higher than the mass of $[M+H]^+$ ion) and 354.3 (+57 m/z units higher than the mass of $[M+H]^+$ ion), respectively. The relative abundances of the protonated molecules were low and there were many other fragments. On the other hand, the negative-ion APCI, besides much fewer other fragments, provided the base peaks with masses corresponding to the masses of individual fatty acids (data not shown). Free fatty acids also produced good signals in the negative-ion APCI.

3.3. Quantitative analyses

Quantitative determination of the reaction products and the intermediates is essential for the studies of kinetics and mechanism of chemical and enzymatic reactions. In this study, we also tried to find the suitability of the UV detection at 210 nm for the determination of the concentrations of the methyl ester products and the mono- and diacylglycerol intermediates even though acetone used in the mobile phase has some absorbance at 210 nm. The construction of the calibration curves for each com-

Table 2

The masses of the important ions of some compounds occurring during the lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil determined by APCI-MS with ion trap analyzer in the positive-ion mode

Compound [M]	Ion B [M+H] ⁺	Ion A [M+H-H ₂ O] ⁺	Ion C [M+H-RCOOH] ₂ ⁺	
2-L	355.2 (27)	337.3 (100)	–	–
1-L	355.3 (30)	337.2 (100)	–	–
2-O	357.3 (21)	339.3 (100)	–	–
1-O	357.3 (15)	339.3 (100)	–	–
1,3-LL	617.5 (74)	599.5 (100)	337.3 (15)	–
1,2-LL	617.5 (100)	599.6 (18)	337.3 (41)	–
1,3-OL	619.5 (4)	601.6 (100)	337.2 (6)	339.3 (8)
1,2-OL ^a	619.5 (57)	601.5 (73)	337.3 (100)	339.3 (90)
1,3-PL ^a	ND	575.5 (10)	ND	ND
1,2-PL	593.6 (16)	575.5 (58)	337.3 (100)	313.2 (66)
1,3-OO	ND	603.6 (100)	339.3 (16)	–
1,2-OO ^b	621.6 (6)	603.6 (40)	339.3 (100)	–
1,3-SL ^b	621.6	603.6 (50)	337.3 (7)	341.3 (10)
1,3-PO ^b	ND	577.5 (45)	313.3 (5)	339.3 (5)
1,2-SL ^c	621.6 (17)	603.6 (67)	337.3 (100)	341.3 (67)
1,2-PO ^c	595.6 (5)	577.5 (69)	313.3 (80)	339.3 (100)
1,3-SO	ND	605.6 (100)	339.3 (12)	341.3 (6)
1,2-SO	623.6 (8)	605.6 (61)	339.3 (100)	341.3 (65)
LLL	879.8 (100)	–	599.6 (22)	–
OLL	881.8 (100)	–	601.6 (32)	599.6 (20)
PLL	855.8 (100)	–	599.5 (21)	575.6 (29)
OOL	883.8 (72)	–	601.6 (100)	603.6 (58)
SLL	883.8 (100)	–	599.6 (28)	603.6 (30)
POL	857.8 (60)	–	601.6 (100)	577.6 (60)
				575.5 (50)
OOO	885.8 (12)	–	603.6 (100)	–
SOL	885.8 (56)	–	601.5 (100)	603.6 (79)
				605.6 (80)
POO	859.8 (13)	–	603.6 (62)	577.5 (100)

Numbers in parentheses indicate the relative abundance of the ions. See Table 1 for abbreviations. NDNot Detected.

^a Coeluting compounds. The ion with mass of 337.3, a common ion, is mostly provided by 1,2-OL.

^b Coeluting compounds. The relative abundances of the ions of 1,2-OO were determined from the first half of the peak, which mainly contained 1,2-OO. The second half of the peak included all three compounds and the relative abundances of the ions of 1,3-SL and 1,3-PO was roughly estimated.

^c Coeluting compounds. The relative abundances of the ions of 1,2-SL were determined from the first half of the peak, which mainly contained 1,2-SL and the relative abundances of the ions of 1,2-PO were determined from the second half of the peak, which mainly contained 1,2-PO.

pound would not be practical because there are many products and the intermediates present in the reaction mixture. Therefore, only several examples are presented here.

Fig. 6 shows the calibration curves of methyl linoleate and methyl oleate standards as a function of relative integrated peak area versus amount of standard. As can be seen from the figures the calibration curves are linear up to 12 µg for MeL, and 80 µg for MeO (Fig. 6, insets); the correlation coefficients of both are 0.999 (see Table 3) indicating good linearity. The disadvantage of using acetone represents itself in terms of lowering these linear ranges. However, diluting the samples, and thus bringing the readings into the linear region can overcome this drawback of acetone. Since the total amount of stearic and palmitic acids is low (about 10%) and saturated fatty acids do not have significant absorbance at 210 nm, the methyl ester products of stearic and palmitic acids of sunflower oil cannot be measured by the same way as methyl esters of linoleic and oleic acids. Yet, since the lipases are not specific for a particular fatty acid molecule as discussed below, the total amount of methyl esters (biodiesel) can be calculated by adding 10% to the sum of methyl esters of linoleic and oleic acids.

Similar calibration curves were obtained with 1-O, 1,3-OO and 1,3-LL standards. The constants of calibration curves (relative peak areas versus amount of compound) of MeL, MeO, 1-O, 1,3-OO and 1,3-LL standards determined by linear regression analysis are given in Table 3. As can be seen, the response factors are very similar for MeO, 1-O and 1,3-OO; like MeO, 1-O

Table 3

The constants of calibration curves (relative peak areas vs. amount of compound) of several pure methyl ester, mono- and diacylglycerol standards determined by linear regression analysis^a

Compound	Slope (IU/µg) ^b	Intercept (IU) ^b	Correlation coefficient	Linear ranges (lower-upper limits)	
				µg	IU ^b
MeL	643	169	0.999	0.3–12.0	200–8000
MeO	75	113	0.999	2.0–80.0	200–6000
1-O	67	–43	0.999	2.0–80.0	200–6000
1,2-OO	69	237	0.999	2.0–80.0	200–6000
1,3-LL	512	213	0.997	0.3–12.0	200–6500

^a HPLC conditions of method 2 as described in Section 2.3.

^b IU: integration units, arbitrary.

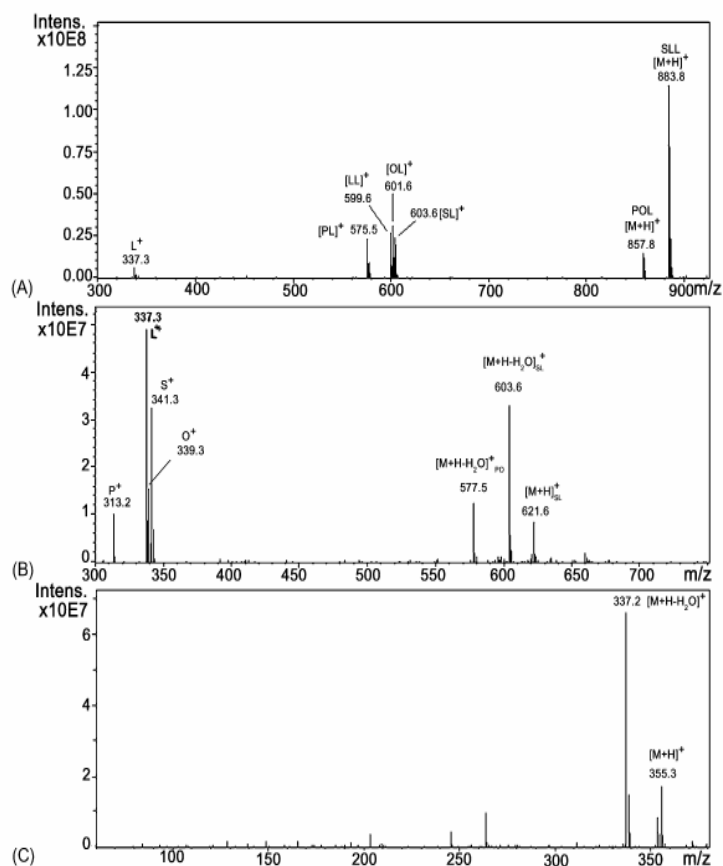


Fig. 5. Positive-ion APCI mass spectra of SLL + POL (A), 1,2-SL + 1,2-PO (B) and 1-L (C). The spectrum of SLL + POL reflects the center of the peak, and the spectrum of 1,2-SL + 1,2-PO first half of the peak. Masses of important ions are given in Table 2.

and 1,3-OO display similar slight curving off at high amounts (>80 µg). The patterns of the calibration curves of 1,3-LL and MeL are also alike; both significantly deviate from linearity at high amounts (>12 µg), however, 1,3-LL has a lower slope.

3.4. Elucidation of the mechanisms of the lipases in biodiesel production by HPLC

As mentioned above, the complete conversion of triacylglycerols to FAMES catalyzed by lipases occurs at least at three reversible steps with mono- and diacylglycerol intermediates. HPLC has provided a faster and a simple means for simultaneous determination of the molecular species of methyl esters, mono-, di-, and triacylglycerols forming during the lipase-catalyzed transesterification of sunflower oil with methanol, which helped us understand, to some extent, the mechanisms of the transesterification reactions catalyzed by the three lipases, namely Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM and Novozym 435.

We monitored the reactions into which methanol was added at three steps by taking samples at certain time-intervals and applying them to the above RP-HPLC methods. In the transesterification reactions of TGs catalyzed by Lipozyme RM IM and Lipozyme TL IM, significant amount of *sn*-2 monoacyl-

glycerols (primarily 2-L) and *sn*-1,2 diacylglycerols built up (Figs. 3A and B and 7), consistent with the fact that RM IM and TL IM are *sn*-1,3 specific lipases (i.e., they exclusively cleaves at *sn*-1 and/or *sn*-3 positions). At depleting methanol concentrations, RM IM and TL IM converted 2-L to 1-L, and *sn*-1,2 DGs to *sn*-1,3 DGs. As soon as the second (or third) molar equivalent of methanol was added into the reaction tube, 1,3-DGs and 1-MGs were the preferred substrates for the lipases. Fig. 7 demonstrates these steps for RM IM-catalyzed reaction, but similar results were also obtained with Lipozyme TL IM which are not shown. These results altogether indicate that the acyl migrations, i.e., conversion of 1,2-DGs to 1,3-DGs and of 2-MGs to 1-MGs, are the rate-determining steps for RM IM and TL IM lipases. The acyl migration ability of TL IM lipase has been shown before [33]. Using individual calibration curves as mentioned in Section 3.3, the concentrations of the products and the intermediates can be calculated as a function of time, and therefore, the individual rate constants can be determined under given conditions.

In the Novozym 435-catalyzed transesterification reactions, triacylglycerols were converted to methyl esters without significant accumulation of mono- and diacylglycerols indicating the first step (i.e., conversion of TG to DG) is the rate-determining

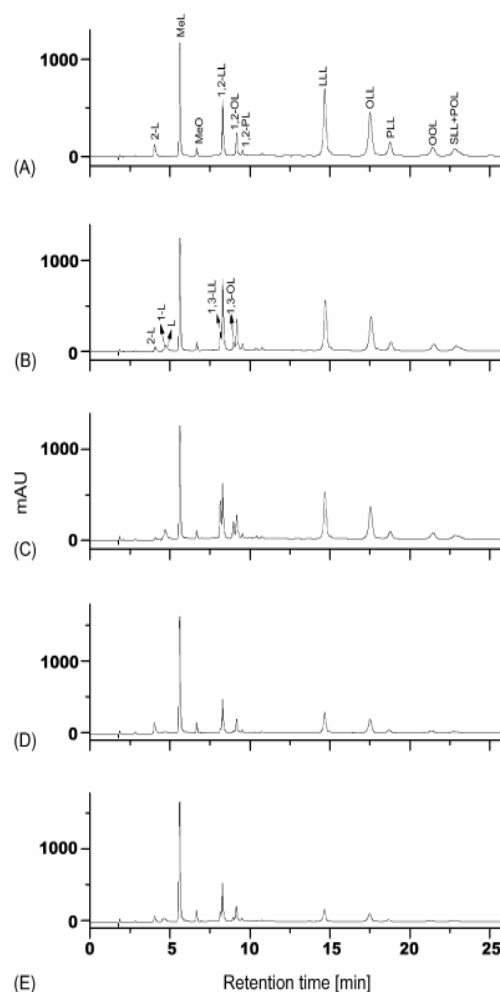


Fig. 7. HPLC chromatograms of the reaction samples of Lipzyme RM IM-catalyzed methanolysis of sunflower oil taken at 10 (A), 40 (B), 120 (C), 130 (D), and 160 (E) mins. At 120 min, after taking the sample, second molar equivalent of methanol was added. Reaction conditions: 10% enzyme (w/w oil), 10 μ L samples withdrawn and diluted to 1 mL with acetone, other conditions as described in Section 2.3. HPLC conditions: HPLC method 2, injection volume 10 μ L, other conditions as described in Section 2.5.

IM and RM IM, that is why much less amount of 1,2-DGs build up. However, overall RM IM and TL IM catalyze the biodiesel production faster at 40 °C compared to Novozym 435.

The RP-HPLC method is also useful for monitoring the formation of the hydrolysis products (free fatty acids) during the biodiesel production. In our reactions, since the immobilization matrices of the enzymes contain small amount of water (about 1–3%, according to the product sheets [36–38]), small amount of free fatty acids (mostly L acid) formed after methanol was used up, but were converted to the corresponding methyl esters as soon as methanol was added into the reaction system (for example, see Fig. 7). Furthermore, fatty acid specificity can also be investigated with the proposed RP-HPLC method. Our results indicate that all three enzymes do not show a preference for a particular fatty acid or TG molecules. The decreases in the

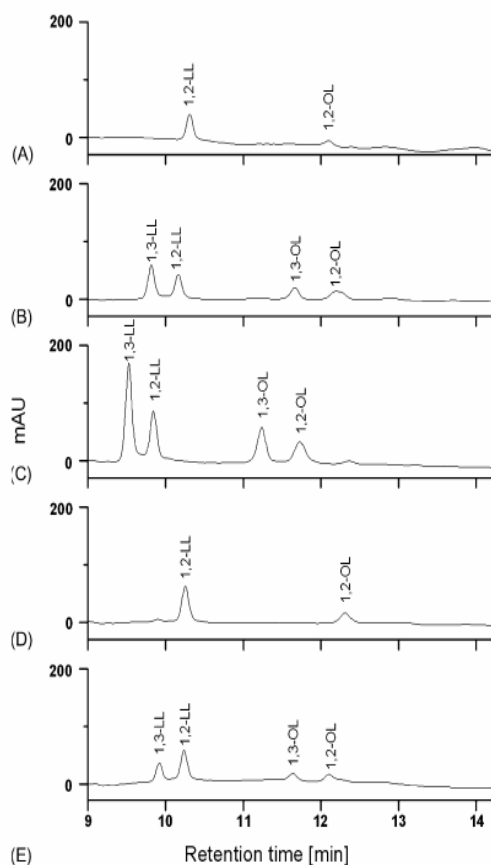


Fig. 8. Selected peaks of the HPLC chromatograms of the reaction samples of Novo 435-catalyzed methanolysis of sunflower oil taken at 40 (A), 120 (B), 240 (C), 250 (D), and 280 (E) mins. At 240 min, after taking the sample, second molar equivalent of methanol was added. Reaction conditions: 10% enzyme (w/w oil), 10 μ L samples withdrawn and diluted to 1 mL with acetone, other conditions as described in Section 2.3. HPLC conditions: HPLC method 1, injection volume 10 μ L, other conditions as described in Section 2.5.

peaks of TGs as well as the increases in the product peaks were proportional.

4. Conclusions

In this study we showed that the RP-HPLC procedure with universal UV detection at 210 nm proposed here is efficient in the separation and the detection of the major compounds occurring during the lipase-catalyzed transesterification of sunflower oil with methanol. The identification of the individual compounds can be done by APCI-MS in the positive-ion and negative-ion modes. Using individual calibration curves, the quantitative analyses of double-bond containing products (methyl esters) and the intermediates (mono- and diacylglycerols) can be performed. The proposed RP-HPLC method is particularly of use in the determination of the rate-limiting step of a lipase-catalyzed transesterification reaction and, therefore, in the elucidation of the reaction mechanism. The findings that lipozymes RM IM and TL IM catalyze the first step faster, whereas Novozym 435

catalyze the second and third steps faster have prompted us to use a dual enzymatic system (e.g., Novo 435/TL IM) rather than single lipase systems in the biodiesel production from vegetable oils and the studies are in progress. In addition, some properties of the lipases such as regio-specificity, ability to catalyze the acyl migration, and specificity for a particular fatty acid can also be investigated by the RP-HPLC methods. Although acetone has some absorbance at 210 nm, UV detector can still be used for the qualitative and quantitative determination of the double-bond containing methyl ester products. Acetone can be replaced by 2-propanol, which has much lower absorbance at 210 nm. Yet, the HPLC analysis carried out with 2-propanol takes longer because 2-propanol creates higher pressure at flow-rate of 1 mL/min, and therefore, the analysis should be done at lower flow-rates (~ 0.5 mL/min).

Acknowledgements

We acknowledge the support from the Scientific Research Council of Gebze Institute of Technology (project no: A7-2005). We express our thanks to Celal Çakmak, Suna Uçar and Timur Karadağ of the SEM Lab, Istanbul-TURKEY, for the technical help with the APCI-MS analysis.

References

- [1] H. Fukuda, A. Kondo, H. Noda, J. Biosci. Bioeng. 92 (2001) 405.
- [2] A.L. Nelson, T.A. Foglia, W.N. Marmer, J. Am. Oil Chem. Soc. 73 (1996) 1191.
- [3] M. Mittelbach, J. Am. Oil Chem. Soc. 67 (1990) 168.
- [4] M.M. Soumanoou, U.T. Bornscheuer, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105 (2003) 656.
- [5] L. Deng, T. Tan, F. Wang, X. Xu, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 105 (2003) 727.
- [6] Y. Watanabe, Y. Shimida, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, Y. Tomimaga, J. Am. Oil Chem. Soc. 77 (2000) 355.
- [7] M. Iso, B. Chen, M. Eguchi, T. Kudo, S. Shrestha, J. Mol. Catal. B 16 (2001) 53.
- [8] M.M. Soumanoou, U.T. Bornscheuer, Enzyme Microb. Technol. 33 (2003) 97.
- [9] C. Plank, E. Lorbeer, J. Chromatogr. A 697 (1995) 461.
- [10] M. Lechner, C. Bauer-Plank, E. Lorbeer, J. High Resolut. Chromatogr. 20 (1997) 581.
- [11] M. Holcapek, P. Jandera, J. Fischer, B. Prokes, J. Chromatogr. A 858 (1999) 13.
- [12] M. Buchgraber, F. Ulberth, H. Emons, E. Anklam, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 106 (2004) 621.
- [13] M.A.M. Zeitoun, W.E. Neff, E. Selke, T.L. Mounts, J. Liq. Chromatogr. 14 (1991) 2685.
- [14] V.I. Deineka, L.A. Deineka, N.G. Gabruk, G.M. Fofanov, L.A. Manokhina, N.A. Sidel'nikova, J. Anal. Chem. 58 (2003) 1160.
- [15] E. Frede, Chromatographia 21 (1986) 29.
- [16] P.R. Redden, Y.S. Huang, X.R. Lin, D.F. Horrobin, J. Chromatogr. A 694 (1995) 381.
- [17] M. Holcapek, P. Jandera, P. Zderadicka, L. Hrubá, J. Chromatogr. A 1010 (2003) 195.
- [18] T.A. Foglia, K.C. Jones, A. Nunez, J.G. Phillips, M. Mittelbach, Chromatographia 60 (2004) 305.
- [19] B. Herslof, G. Kindmark, Lipids 20 (1985) 783.
- [20] L.J.R. Barron, G. Santa-Maria, Chromatographia 28 (1989) 183.
- [21] J.T. Lin, L.R. Snyder, T.A. McKeon, J. Chromatogr. A 808 (1998) 43.
- [22] G. Sempore, J. Bezard, J. Chromatogr. 366 (1986) 261.

- [23] F.C. Philips, W.L. Erdahl, J.A. Schmit, O.S. Privett, *Lipids* 19 (1984) 880.
- [24] W.E. Neff, G.R. List, W.C. Byrdwell, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22 (1999) 1649.
- [25] W.E. Neff, G.R. List, W.C. Byrdwell, *J. Chromatogr.* 18 (1995) 4165.
- [26] M. Barber, T.O. Merren, W. Kelly, *Tetrahedron Lett.* 18 (1964) 1063.
- [27] C.G. Crawford, R.D. Plattner, *J. Lipid Res.* 24 (1983) 456.
- [28] W.C. Byrdwell, W.E. Neff, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 300.
- [29] M. Holcapek, M. Lisa, P. Jandera, N. Kabatova, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 1315.
- [30] C.D. Bannon, G.J. Breen, J.D. Craske, N.T. Hai, N.L. Harper, K.L. O'Rourke, *J. Chromatogr.* 247 (1982) 71.
- [31] W.E. Neff, W.C. Byrdwell, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 169.
- [32] H.R. Mottram, S.E. Woodbury, R.P. Evershed, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 1240.
- [33] W. Du, Y. Xu, D. Liu, Z. Li, *J. Mol. Catal. B* 37 (2005) 68.
- [34] Y. Xu, W. Du, D. Liu, *J. Mol. Catal. B* 32 (2005) 241.
- [35] O. Kirk, M.W. Christensen, *Org. Process Res. Dev.* 6 (2002) 446.
- [36] Novo Nordisk Product Sheet for Lipzyme RM IM.
- [37] Novo Nordisk Product Sheet for Lipzyme TL IM.
- [38] Novo Nordisk Product Sheet for Novozym 435.