

152326

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LİPAZ ENZİMİ KULLANILARAK FINDIK YAĞININ
UZUN ZİNCİRLİ ÇOKLU DOYMAMIŞ OMEGA-3
YAĞ ASİTLERİNCE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda Müh. Aşlı CAN
506021405

152326

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26 Nisan 2004
Tezin Savunulduğu Tarih : 17 Mayıs 2004

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Beraat ÖZÇELİK *Beraat Özçelik*
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Necla ARAN *Necle Aran*
Prof.Dr. Güldem ÜSTÜN *G. Ustun*

MAYIS 2004

ÖNSÖZ

Ülkemiz fındık üretiminin ve ihracatının %70'ini gerçekleştirmektedir. Fındık ve fındık yağı, ulusal ekonomimize büyük katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda fındık yağı, fitosteroller, mineraller, vitaminler vb. gibi sağlık açısından faydalı pek çok bileşeni bünyesinde bulundurmaktadır.

Genellikle balık yağlarında bulunan uzun zincirli omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin diyetle alındığında kardiyovasküler hastalıklar, kanser, yüksek tansiyon, şeker hastalığı ve depresyon üzerinde etkili olduğu son yıllarda yapılan klinik çalışmalarla ispatlanmıştır.

Bu çalışmada, geleneksel bir ürünümüz olan fındık yağının lipaz enzimi kullanılarak n-3 çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmesi ve sağlık açısından daha faydalı fonksiyonel bir ürün haline getirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamın fikir aşamasından sonuna kadar her anında çok değerli katkılarıyla beni yönlendiren, her türlü destek ve emeğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan çok değerli hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Beraat Özçelik'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aynı zamanda tüm çalışmalarım boyunca büyük yardım ve desteklerini gördüğüm çok sevgili dostlarım Neşe Şahin, Esra Çapanoğlu, Aybars Güven, Dilara Nilüfer, Dilek Ercili ve Funda Karbancıoğlu Güler'e, her zaman destek ve moral veren canım dostum Başak Möröydor'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmalarım da beni yalnız bırakmayan ve her konuda yardımcı olan Nalan Demir'e ve değerli fikirleriyle yardımlarını esirgemeyen Sevil Yücel'e teşekkürlerimi iletirim.

Tez çalışmam sırasında büyük fedakarlıklar ve sabır gösteren, her zaman yardım, ilgi ve desteklerini bulduğum sevgili annem Semra Can ve babam Şevket Can'a teşekkür ederim.

Mayıs, 2004

Aslı CAN

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
2.1. Yapılandırılmış Yağların Tanımı	2
2.2. Yapılandırılmış Yağlarda Arzu Edilen Özellikler	2
2.2.1. Besinsel Özellikler	2
2.2.2. Fiziksel Özellikler	3
2.3. Yapılandırılmış Yağların Gıdalarda Kullanım Alanları	3
2.3.1. Tıbbi ve Nutrasetik Uygulamalarda Kullanılan Yapılandırılmış Yağlar	4
2.3.1.1. Bebek Mamaları	4
2.3.1.2. Enteral ve Parenteral Beslenme	4
2.3.1.3. Kalorisi Azaltılmış Yağlar	5
2.3.1.4. Zenginleştirilmiş Yağlar	5
2.3.2. Kullanım Açısından Fonksiyonel Yapılandırılmış Yağlar	6
2.3.2.1. Gıda Uygulamaları için Plastik Yağlar	6
2.3.2.2. Kakao Yağı İkameleri	6
2.3.2.3. Kızartma Yağları	7
2.4. Yapılandırılmış Yağların Üretimi	7
2.4.1. Yapılandırılmış Yağların Üretim Yöntemleri	8
2.4.1.1. Kimyasal Sentez	8
2.4.1.2. Enzimatik Sentez	9
2.4.1.3. Mikrobiyal Sentez	12
2.4.1.4. Biyolojik Yöntemler	12
2.4.2. Yapılandırılmış Yağların Üretiminde Kullanılan Yağ Asitleri	12
2.4.2.1. Kısa ve Orta Zincirli Yağ Asitleri	13
2.4.2.2. Omega-6 Yağ Asitleri	14
2.4.2.3. Omega-3 Yağ Asitleri	15
2.4.2.4. Omega-9 Yağ Asitleri	15
2.4.2.4. Uzun Zincirli Doymuş Yağ Asitleri	15

2.4.3. Yapılandırılmış Yağların Üretiminde Kullanılan Lipaz Enzimleri	16
2.4.4. Bitkisel Yağların ve Tohum Yağlarının Esansiyel Yağ Asitlerince Zenginleştirilmesini Etkileyen Faktörler	16
2.4.4.1. Sıcaklık	16
2.4.4.1. Reaksiyon Süresi	17
2.4.4.1. Substrat-Molar Oranı	18
2.4.4.1. Su Miktarı	18
2.5. Tepki-Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology)	19
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Materyal	22
3.2. Metot	22
3.2.1. Yağ Asitlerinin Analizlenmesinde Kullanılan Gaz Kromatografisi Metodu	22
3.2.2. Menhaden Yağından Serbest Yağ Asitlerinin Eldesi	23
3.2.3. Menhaden Yağından "Üre Fraksiyonlama" Yöntemi ile Doymamış Yağ Asitlerinin Konsantre Edilmesi	23
3.2.4. Asidoliz Reaksiyonu	23
3.2.5. Ürünlerin Analizi	24
3.2.5.1. Kolon Kromatografisi	24
3.2.5.2. İnce Tabaka Kromatografisi	24
3.2.6. Deneysel Tasarım	24
3.2.7. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Hammaddelerin Yağ Asidi Kompozisyonu Açısından Karakterizasyonu	27
4.1.1. Fındık Yağı	27
4.1.2. Menhaden Yağı ve Menhaden Yağının "Üre Fraksiyonlama" Yöntemi ile Konsantrasyonu	27
4.2. Ön Denemeler	28
4.3. Reaksiyon Ürünlerinin Yağ Asidi Kompozisyonları	29
4.4. Farklı Reaksiyon Koşullarının Fındık Yağına PUFA İnkorporasyonuna Etkilerinin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmeleri	29
4.5. Sonuçların Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafikleri ile Yorumlanması	33
5. SONUÇ	44
6. KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	50

KISALTMALAR

DAG	: Diaçilgliserol
DHA	: Dokosaheksaenoik Asit
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
GC	: Gaz Kromatografisi
KLA	: Konjuge Linoleik Asit
KZYA	: Kısa Zincirli Yağ Asidi
MAG	: Monoaçilgliserol
OZT	: Orta Zincirli Triaçilgliserol
OZYA	: Orta Zincirli Yağ Asidi
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
TAG	: Triaçilgliserol
UZT	: Uzun Zincirli Triaçilgliserol
UZYA	: Uzun Zincirli Yağ Asidi
YY	: Yapılandırılmış Yağ

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Yapılandırılmış yağların uygulama alanlarına göre sınıflandırılması.....	4
Tablo 2.2. Yapılandırılmış Yağların üretiminde kullanılacak yağ asitlerinin önerilen optimum miktarlarını ve fonksiyonları.....	13
Tablo 2.3. Çevrilebilir Merkezil Bileşik Deney Tasarımları.....	21
Tablo 3.1. Merkezil Bileşik Deney Tasarımında belirlenen noktalardaki kodlara karşı gelen değerler.....	25
Tablo 3.2. Merkezil Bileşik Deney Tasarımında belirlenen deney deseninin noktaları.....	26
Tablo 4.1. Fındık yağının yağ asidi kompozisyonu.....	27
Tablo 4.2. Menhaden yağının ve “Üre Fraksiyonlama” yöntemi ile elde edilen konsantrenin yağ asidi kompozisyonu.....	28
Tablo 4.3. EPA ve DHA'nın farklı lipaz enzimleriyle ön denemeler yapılarak elde edilen fındık yağına inkorporasyon oranları.....	28
Tablo 4.4. Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak geliştirilen deney tasarımına göre elde edilen reaksiyon ürünlerinin yağ asidi kompozisyonları.....	30
Tablo 4.5. Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları.....	31
Tablo 4.6. Varyans analizi sonuçları.....	32
Tablo 4.7. Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri.....	32

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 : Kimyasal interesterifikasyonla randomize yapılandırılmış yağ üretimi için reaksiyon prensibi.....	8
Şekil 2.2 : 1,3-spesifik lipaz enzimi varlığında gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu.....	9
Şekil 2.3 : Spesifik olmayan lipaz enzimi varlığında gerçekleşen asidoliz reaksiyonu.....	10
Şekil 4.1 : Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişkiyi gösteren grafik.....	33
Şekil 4.2.a : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	34
Şekil 4.2.b : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.....	34
Şekil 4.3.a : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun substrat-molar oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	35
Şekil 4.3.b : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun substrat-molar oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	35
Şekil 4.4.a : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun su miktarı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	37
Şekil 4.4.b : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun su miktarı ve sıcaklık ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.....	37
Şekil 4.5.a : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun süre ve substrat-molar oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	38
Şekil 4.5.b : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun süre ve substrat-molar oranı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.....	38
Şekil 4.6.a : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun süre ve su miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	39
Şekil 4.6.b : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun süre ve su miktarı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.....	39
Şekil 4.7.a : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun su miktarı ve substrat-molar oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	40
Şekil 4.7.b : Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun su miktarı ve substrat-molar oranı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği...	40

**LİPAZ ENZİMİ KULLANILARAK FINDIK YAĞININ UZUN ZİNCİRLİ
ÇOKLU DOYMAMIŞ OMEGA-3 YAĞ ASİTLERİNCE
ZENGİNLEŞTİRİLMESİ
ÖZET**

Günümüzde bireylerin yaşam standartları yükseldikçe beslenme alışkanlıkları da değişmektedir. Gelişmiş toplumlarda ölüme en çok sebebiyet veren hastalıkların başında beslenme şekliyle, özellikle de diyetle alınan yağın niteliği ve miktarı ile yakından ilgili olan kalp rahatsızlıkları ve kanser gelmektedir. Fonksiyonel gıdalar, genel anlamda sağlık açısından olumlu etkileri bulunan gıdalar olarak adlandırılabilirler. Yapılandırılmış Yağ (YY)'lar, triaçilgliserollerin yapısı üzerinde yağ asitlerinin pozisyonlarının değiştirilmesi veya yeni yağ asitlerinin yerleştirilmesi ile oluşturulan özgün triaçilgliserol yapılarıdır. "Geleceğin yağları" olarak bilinen YY'lar, muhtemel hastalıkların önlenmesinde veya tedavisinde kullanılabilecek şekilde tasarlanmış yağlardır.

Bu çalışmada, ülkemize özgü bir ürün olan fındık yağının lipaz enzimi kullanılarak uzun zincirli omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmesi ve sağlık açısından daha faydalı fonksiyonel bir ürün haline getirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca zenginleştirme reaksiyonunda sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat-molar oranı ve su miktarı gibi farklı faktörlerin etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Tüm deney setlerinden elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda, %21.53 ile en yüksek inkorporasyon oranının elde edildiği koşulların, 47.5°C sıcaklık, 36 saat reaksiyon süresi, 1:1 substrat-molar oranı ve ağırlıkça %3 (gr/gr) su miktarı olduğu görülmüştür.

Fındık yağına uzun zincirli *n*-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin yüzde inkorporasyonun oranına sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat-molar oranı ve su miktarı gibi faktörlerin etkilerini gösteren tepki yüzey grafikleri değerlendirildiğinde, optimum sıcaklık aralığının 45-60°C, reaksiyon süresi aralığının 30-40 saat, substrat-molar oranı aralığının (fındık yağı/menhaden yağı konsantresi, mol/mol) 1:1-2:1, su miktarı aralığının ise %3-5 (gr/gr) olduğu söylenebilir.

ENRICHMENT OF HAZELNUT OIL BY LONG CHAIN POLYUNSATURATED OMEGA-3 FATTY ACIDS BY USING LIPASE

SUMMARY

Eating habits of people change according to their changing life standards. In developed countries, the primary reasons of death are heart diseases and cancer which are directly related to the diet and especially quality and quantity of fat in the diet. Functional foods are generally described as foods that provide specific health benefits. Structured Lipids (SL) are triacylglycerols that have been modified by incorporation of new fatty acids or changing the positions of naturally existing fatty acids. SLs are known as "Future's lipids" and they are designed to have the potential for the prevention or treatment of diseases.

In this study, enrichment of hazelnut oil, which is a specific product to our country with long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids by using lipase is aimed. The effects of incubation time, temperature, substrate molar ratio, and water content on incorporation ratio are investigated as well.

Among all the experimental results, the highest incorporation ratio (21.53%) is obtained by 47.5°C temperature, 36 hours of reaction, 1:1 substrate molar ratio and 3% water content (wt/wt).

From the evaluation of response surface graphs showing the interactions of different factors such as temperature, reaction time, substrate molar ratio and water content, the optimal conditions are 45-60°C for temperature, 30-40 hours for reaction time, 1:1-2:1 for substrate molar ratio (hazelnut oil/menhaden oil concentrate, mol/mol), and 3-5% (wt/wt) for water content for incorporation of long chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids into hazelnut oil.

1. GİRİŞ

Fındık, dünyada ve Türkiye’de çok yaygın olarak yetiştirilen bir meyve olmakla beraber Türkiye, fındık üretiminde dünya ülkeleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Esansiyel yağ asitleri ve fitosteroller, mineraller, vb. gibi bazı bileşenler açısından zengin olması fındık yağını sağlık açısından faydalı bir ürün haline getirmektedir.

Son yıllarda yapılan klinik çalışmalarda uzun zincirli omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin diyetle alındığında kardiyovasküler hastalıklar, kanser, yüksek tansiyon, şeker hastalığı ve depresyon üzerinde etkili olduğu ispatlanmış bulunmaktadır.

Triaçilgliserol yapısında spesifik pozisyonlarda esansiyel yağ asitlerini içeren yağların sentezi üzerinde sıkça çalışılan bir konu olmuştur.

Yapılandırılmış Yağlar, triaçilgliserollerin yapısı üzerinde yağ asitlerinin pozisyonlarının değiştirilmesi veya yeni yağ asitlerinin yerleştirilmesi ile sentezlenmektedirler.

Yağların daha sağlıklı ve kullanışlı hale getirilmesi amacıyla yapılandırılması, kimyasal, enzimatik ya da mikrobiyal sentezle veya çeşitli biyolojik yöntemlerle mümkün olmaktadır.

Yapılandırılmış yağların sentezinde sıkça kullanılan bir yöntem olan enzimatik yöntemler, lipaz enziminin katalizörlüğünde gerçekleşen esterifikasyon, transesterifikasyon ve asidoliz reaksiyonlarını içermektedirler. Ilımlı sıcaklık ve pH koşullarını gerektirdikleri, yağ asitlerinde istenmeyen değişikliklere yol açmadıkları ve son üründeki yağ asidi dağılımının kontrolüne imkan sağladıkları için diğer yöntemlere göre oldukça avantajlıdır.

Bu çalışmada, geleneksel bir ürünümüz olan fındık yağının lipaz enzimi kullanılarak n-3 çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmesi ve sağlık açısından daha faydalı fonksiyonel bir ürün haline getirilmesi ve zenginleştirmede sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat-molar oranı ve su miktarı gibi farklı faktörlerin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Yapılandırılmış Yağların Tanımı

Uzun yıllar yağların sağlık açısından zararlı oldukları düşünüldüğünden, insanlar yağ içermeyen diyetlere yönlendirilmiştir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar esansiyel yağ asitlerinin özellikle kalp ve beyin sağlığı üzerinde pek çok olumlu özelliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda, triaçilgliserol yapısında spesifik pozisyonlarda esansiyel yağ asitlerini içeren lipidlerin sentezi biyoteknolojik yöntemler ile mümkün olmaktadır. Yapılandırılmış Yağ (YY)'lar, kolesterolü düşürmek, bağışıklık sistemini güçlendirmek, beyin gelişimini olumlu yönde etkilemek ve kullanım açısından da fonksiyonelliği artırmak gibi amaçlarla doğal yağların veya yağ asitlerinin modifiye edilmesi veya yeniden yapılandırılmasıyla sentezlenmektedirler.

YY'lar, triaçilgliserollerin yapısı üzerinde yağ asitlerinin pozisyonlarının değiştirilmesi veya yeni yağ asitlerinin yerleştirilmesi ile oluşturulan özgün triaçilgliserol yapılar olarak tanımlanmakta ve geleceğin yağları olarak da bilinmektedirler (Akoh, 2002; Osório ve diğ., 2001; Akoh ve Moussata, 2001, Høy ve Xu, 2001).

2.2. Yapılandırılmış Yağlarda Arzu Edilen Özellikler

Bir yağın en önemli özellikleri kullanım amacına bağlı olarak değişmektedir. Bu özellikler genellikle besinsel ve fiziksel olmakla beraber; bazen kimyasal da olabilmektedir (Gunstone, 2001a).

2.2.1. Besinsel Özellikler

Yağlar, diyetin önemli bir bileşenidir. Bununla beraber, beslenme şeklinin ve özellikle de yağların sağlık üzerindeki etkisi ile ilgili araştırmalar her geçen gün artmaktadır.

Besinsel özellikler YY'larda, fonksiyonel gıdalarda, bebek mamalarında, diyet destekleyicilerde ve hem hastalıkların tedavisinde hem de önlenmesinde, sağlığın korunmasında kullanılan formülasyonlarda öne çıkmaktadır.

Yağ asitleri ve triaçilgliserollerinin (TAG) besinsel özellikleri şu şekilde sıralanabilmektedir:

- Toplam enerji değeri, (düşük) azaltılmış enerjiye sahip yağlarla veya yağ-benzeri maddelerle değiştirilebilmektedir.
- Yağ asidi kompozisyonu, mevcut besinsel hipotezler temel alınarak doymuş asitler, cis ve trans monoen asitler, esansiyel yağ asitleri ve uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin seviyeleri değiştirilerek tasarlanabilmektedir.
- TAG kompozisyonu ve yağ asitlerinin pozisyonu biyo-yararlılığı olumlu yönde etkileyecek şekilde ayarlanabilmektedir.
- Karoten, tokoferol, sterol vb. gibi istenen minör bileşenlerin varlığı ve seviyeleri beslenme açısından önemlidir.

2.2.2. Fiziksel Özellikler

Fiziksel özellikler sürülebilir yağlarda, pişirme ve fırınlama yağlarında, kızartma yağlarında, kremalarda, kozmetik ürünlerinde önem arz etmektedir. Yağların en önemli fiziksel özellikleri genellikle kristalizasyon, kristal yapı ve erime karakteristikleri ile ilgili olmaktadır. Örneğin kızartma yağları kristal içermemelidir ve kolayca kristalleşip kristalizasyonu tetikleyen TAG'leri içermemelidir (Gunstone, 2001a).

2.3. Yapılandırılmış Yağların Gıdalarda Kullanım Alanları

YY'lar gıdalardaki işlevleri ve tıbbi uygulamalardaki önemi açısından ikiye ayrılmaktadır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Yapılandırılmış Yağların uygulama alanlarına göre sınıflandırılması (Osborn ve Akoh, 2002)

Tıbbi ve Nutrasetik Uygulamalarda Kullanılan Yapılandırılmış Yağlar	Kullanım Açısından Fonksiyonel Yapılandırılmış Yağlar
<ul style="list-style-type: none">• Bebek mamaları (formülleri)• Enteral¹ ve parenteral² beslenme• Kalorisi azaltılmış yağlar• Zenginleştirilmiş yağlar (esansiyel yağ asitleri ve orta zincirli yağ asitleri ile)	<ul style="list-style-type: none">• Gıda uygulamaları için plastik yağlar• Kakao yağı ikameleri• Kızartma yağları

¹ enteral: ağızdan tüple beslenme

² parenteral: damardan serumla beslenme

2.3.1. Tıbbi ve Nutrasetik Uygulamalarda Kullanılan Yapılandırılmış Yağlar

2.3.1.1. Bebek Mamaları

Bebek maması formülasyonlarının yağ içeriği orta zincirli yağ asitleri, linoleik asit, linolenik asit ve çoklu doymamış yağ asitlerini anne sütününükle aynı oranlarda ve pozisyonlarda içermelidir. Anne sütü %20-30 oranında, %33'ü sn-2 pozisyonunda olmak üzere palmitik asit içermektedir. Bebek mamalarının çoğundaki yağ, bitkisel kaynaklıdır ve sn-2 pozisyonunda doymamış yağ asitlerini bulundurma eğilimindedir (Osborn ve Akoh, 2002).

Anne sütünün yağ asitlerinin dizilimine benzer nitelikte YY'ların üretimi, palm yağından elde edilen tripalmitin ile bitkisel yağlardan elde edilen oleik asitin 1,3-spesifik lipaz enzimi varlığında transesterifikasyonu ile gerçekleştirilebilmekte ve bu lipidler kullanılarak ideal bebek maması formülasyonları elde edilebilmektedir.

Sn-2 pozisyonunda yüksek oranda palmitik asit içeren YY'ların, bebekler için emilim özelliği geliştirilmiş yağlar sağlamaktadır (Willis ve diğ., 1998).

2.3.1.2. Enteral ve Parenteral Beslenme

Orta zincirli yağ asitlerinin (OZYA) çok sayıdaki avantajlarının yanısıra, esansiyel yağ asitleri gereksinimini karşılamak üzere minimum düzeyde de olsa uzun zincirli yağ asitlerine (UZYA) ihtiyaç duyulmaktadır. Geçmiş yıllarda OZYA ve UZYA'nin

fiziksel karışımları enteral (ağızdan tüple beslenme) ve parenteral (damardan serumla) beslenmede kullanılmıştır. Günümüzde ise UZYA ve OZYA'ni içeren yapılandırılmış triaçilgliseroller de benzer yağ asidi bileşimine sahip olsalar da hastaların tedavisinde fiziksel karışımlara bir alternatif olarak ortaya çıkmışlardır. Hem UZYA hem de OZYA'ni içeren YY'lar yağ asitlerinin kana eşzamanlı ve OZYA'lerinin daha düşük hızda ve kontrollü olarak salıverilmesini sağlamak amacıyla tasarlanmaktadır (Osborne ve Akoh, 2002, Høy ve Xu, 2001).

2.3.1.3. Kalorisi Azaltılmış Yağlar

Yüksek oranda yağ tüketiminin yol açtığı risklerle ilgili olarak tüketici bilincinin artmasıyla birlikte, kalorisi azaltılmış yağlar ve yağ ikameleri için yeni bir pazar doğmuştur. Protein ve karbonhidrat bazlı yağ ikameleri mevcut bulunmaktadır; ancak yüksek sıcaklıklara maruz bırakılamamaktadırlar. Bu yüzden pişirme ve derin kızartma uygulamalarında kullanıma uygun ve doğal bir yağın tüm vasıflarını taklit eden tek alternatif yağ bazlı yağ ikameleridir. Düşük kalorili YY'lar uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin kısıtlı emilimi ve kısa zincirli yağ asitleri (KZYA)'lerinin düşük kalori değeri gibi avantajları biraraya getirilerek tasarlanmaktadır (Osborn ve Akoh, 2002).

Günümüzde kalorisi azaltılmış yağların ve yağ ikamelerinin büyük çoğunluğu katı ve sıvı yağlarda doğal olarak bulunmayan; fakat bu yağların kimyasal yapısına ve fonksiyonlarına benzer olan yağ asitlerini içermektedirler.

2.3.1.4. Zenginleştirilmiş Yağlar

Enzimatik yöntemler kullanılarak sağlık açısından faydalı eikosapentaenoik asit (EPA), dokosaheksanoik asit (DHA) , konjuge linoleik asit KLA vb. gibi esansiyel yağ asitleri trigliserit molekülünde spesifik pozisyonlara yerleştirilerek yağların zenginleştirilmesi ve daha sağlıklı hale getirilmesi mümkün olmaktadır. Orta zincirli yağ asitleri (OZYA) ise, uzun zincirliye göre daha hızlı metabolize edildikleri ve oksidasyonları ile daha az kalori verdikleri için yağların zenginleştirilmesinde tercih edilmektedirler. Bu tip YY'lar, palm yağı, hindistancevizi yağı, ayçiçek yağı gibi çeşitli bitkisel yağların 1,3-spesifik lipazlar katalizörlüğünde orta zincirli yağ asitleri ile asidoliziyle üretilmektedirler (Osborne ve Akoh, 2002, Akoh, 2002, Høy ve Xu, 2001).

2.3.2. Kullanım Açısından Fonksiyonel Yapılandırılmış Yağlar

2.3.2.1. Gıda Uygulamaları İçin Plastik Yağlar

Margarin, modifiye tereyağı ve diğer katı yağlar plastik yağlardır; yani katı görünümünde olup, küçük gerilimlere mukavemet gösterirler. Üreticiler, ürünlerinin buzdolabında katı formda olmasını, çıkarıldığında ise kolayca sürülebilir ve ağızda hızla eriyebilir nitelikte olmasını istemektedirler. Arzu edilen sürülebilirlik düzeyi %15-35 katı oranında ortaya çıkmaktadır.

İntersterifikasyon, orijinal yağın kimyasal özellikleri ve yağ asitlerinin doğasında var olan özellikleri değiştirmedigi için plastik yağların üretiminde elverişli bir yöntemdir. İlave olarak, yağ asitlerinde doymamışlık oranları sabit kalmakta ve cis-trans izomerizasyonu gerçekleşmemektedir. Kısa veya orta zincirli ve uzun zincirli yağ asitleri bir araya getirilerek iyi sürülebilirlik ve ısıl stabiliteye sahip triaçilgliserollerin üretimi mümkün olmaktadır (Osborn ve Akoh, 2002).

2.3.2.2. Kakao Yağı İkameleri

Çikolata endüstrisinin en önemli bileşenlerinden biri olan kakao yağının parlaklık, gevreklik, ısıl direnç, ağızda hızlı ve keskin erime profili ve çiçeklenmeye dayanıklılık gibi çeşitli fiziksel özellikleri büyük oranda polimorfizmi tarafından etkilenmektedir. Kakao yağının, çikolata ve şekerleme üretiminde kullanılan en yüksek maliyetli bileşen olması ve doğal bir madde olduğu için kalitesinde sürekli değişikliklerin gerçekleşmesi kakao yağı ikamesi olarak kullanılabilen alternatiflerinin üretilmesi yönünde araştırmaların hız kazanmasına yol açmıştır (Osborn ve Akoh, 2002, Özocak, 2003).

Doğada kakao yağının fiziksel özelliklerine benzer özellikte yağlar bulunmamakta ve tüm alternatifler yağları karıştırarak ve/veya modifiye ederek üretilmektedir.

Kakao yağı ikameleri, kompozisyonlarına ve çeşitli özelliklerine göre; kakao yağı eşdeğerleri, kakao yağı muadilleri ve kakao yağı benzerleri olmak üzere başlıca üç sınıfa ayrılmaktadırlar (Lipp ve Anklam, 1998, Özocak, 2003)

En sık kullanılan kakao yağı ikameleri arasında palm yağı, palm-orta fraksiyonları, *Shorea stenoptera*, *Butyrospermum parki*, *Shorea robusta* ve *Garcinia indica* gibi mikroorganizmaların yağları sayılabilmektedir. Bu doğal yağ kaynakları sn-1 ve sn-3

seçici lipazları varlığında palmitik veya stearik asit eklenerek modifiye edildiklerinde yağ asidi kompozisyonu kakao yağıninkiyle hemen hemen aynı olan kakao yağı benzeri yağların üretimi mümkün olmaktadır. Kakao yağı ikamelerinin üretiminde enzimatik yöntemler kullanıldığında göz önünde bulundurulması gereken faktörler, sentezlenecek olan yağın erime karakteristiklerinin kakao yağına benzer olması ve temperleme sırasında kristallenmeye müdahale etmemesidir. (Osborn ve Akoh, 2002).

2.3.2.3. Kızartma Yağları

Çoklu doymamış yağ asitlerinin ve bitki sterollerinin ısı olarak veya havayla temas sonucu oksidatif strese maruz kaldıklarında potansiyel olarak toksik ürünler üretebilecekleri bildirilmiştir. Yüksek oleik asit ayçiçek yağı termooksidasyon ve kızartma stabilitesi açısından kusursuz davranış göstermektedir. Genetik modifiye soya fasulyesi ve kanola yağları patates kızartmada kullanıldıklarında geleneksel yağlara göre daha üstün tat karakteristikleri göstermektedirler. Yüksek oleik mısır yağı ve düşük linolenik soya fasulyesi yağı gibi diğer genetik modifiye kızartma yağlarının da kızartma karakteristiklerinin daha gelişmiş olduğu bilinmektedir (Osborn ve Akoh, 2002, Gunstone, 2002).

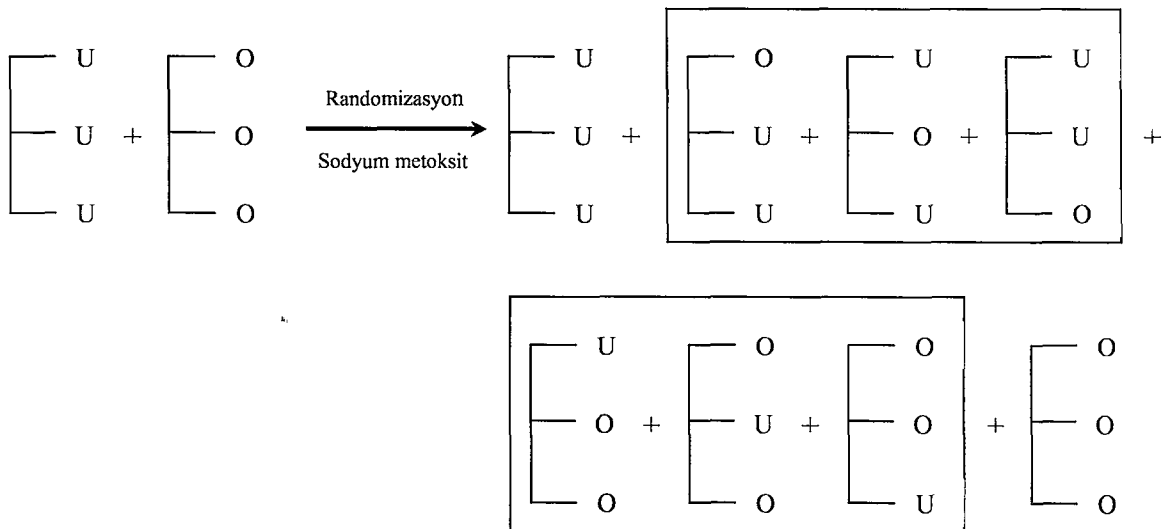
2.4. Yapılandırılmış Yağların Üretimi

Yağların modifiye edilerek fonksiyonel hale getirilmeleri kimyasal veya lipazla katalizlenmiş interesterifikasyon ve/veya asidoliz reaksiyonlarıyla, mikrobiyal sentezle veya yağlı tohumların/bitkilerin ıslahıyla veya genetik yapılarının değiştirilmesi gibi biyolojik yöntemlerle gerçekleştirilebilmektedir. Kimyasal sentez, düşük maliyete ve uygulama kolaylığına sahip olmasına rağmen spesifik değildir ve son ürünlerdeki yağ asidi dağılımının kontrolüne imkan vermemektedir. Enzimatik reaksiyonlar ise daha spesifik olmakla beraber, daha uygun koşullarda gerçekleştirilebilmektedirler. Enzimatik yöntemler, kimyasal sentez ile elde edilmesi mümkün olmayan gliserit karışımlarının üretilmesine olanak sağladıkları için YY'ların üretiminde öncelik kazanmış bulunmaktadır (Osborn ve Akoh, 2002; Willis ve Marangoni, 2002).

2.4.1. Yapılandırılmış Yağların Üretim Yöntemleri

2.4.1.1. Kimyasal Sentez

Yapısal lipidlerin kimyasal sentezi genellikle orta zincirli triaçilgliserol (OZT)'ler ve uzun zincirli triaçilgliserol (UZT)'lerden oluşan karışımın hidrolizini ve orta ve uzun zincirli yağ asitlerinin rasgele karışımının ardından transesterifikasyon (ester-iç değişimi) ile reesterifikasyonu içermektedir (Şekil 2.1). Reaksiyon genellikle %0.1-0.2 düzeyinde kullanılan alkali metaller veya alkali metal alkilatları tarafından katalizlenmekte ve yüksek sıcaklık ve susuz ortam koşullarını gerektirmektedir. Bu tip reaksiyonlarda gerçek katalistin alkali ve triaçilgliserolün etkileşimi ile oluşan bir diaçilgliserol anyonu olduğu düşünülmektedir. Bu katalist asit, su ve peroksitlerin varlığında kolaylıkla hasar görebileceğinden; hammadde bu tip safsızlıklardan arındırılmış olmalıdır. Kimyasal transesterifikasyon ile rasgele dağılmış TAG molekülleri ve bunların yanı sıra uzaklaştırılması güç bir dizi istenmeyen ürün oluşmaktadır. YY ürünü, rasgele dizilmiş bir (OUU, UOU) veya iki (UOO, OUO) orta zincirli yağ asidi ve düşük miktarda saf (reaksiyona girmemiş) OZT ve UZT içermektedir. Caprenin, Benefat/Salatrım, Captex, Neobee ve Intralipid, kimyasal sentezle elde edilen ticari ürünlere örnek olarak gösterilebilmektedir (Akoh, 2002, Gunstone, 2001b).

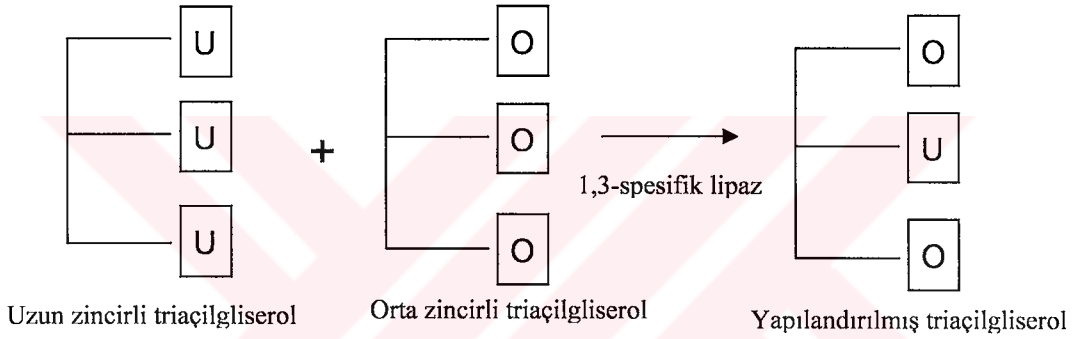


Şekil 2.1. Kimyasal transesterifikasyonla randomize YY üretimi için reaksiyon prensibi. U, uzun zincirli yağ asidi; O, orta zincirli yağ asidi (Høy ve Xu, 2001).

2.4.1.2. Enzimatik Sentez

Enzimler, uygun deneysel koşullarda tersinir tepkimeleri her iki yönde de katalizleyen katalizörlerdir. Bu bağlamda; genellikle yağların hidrolizinden sorumlu olan lipazlar, aynı zamanda esterifikasyonu, transesterifikasyonu ve asidolizi de etkileyebilmektedirler.

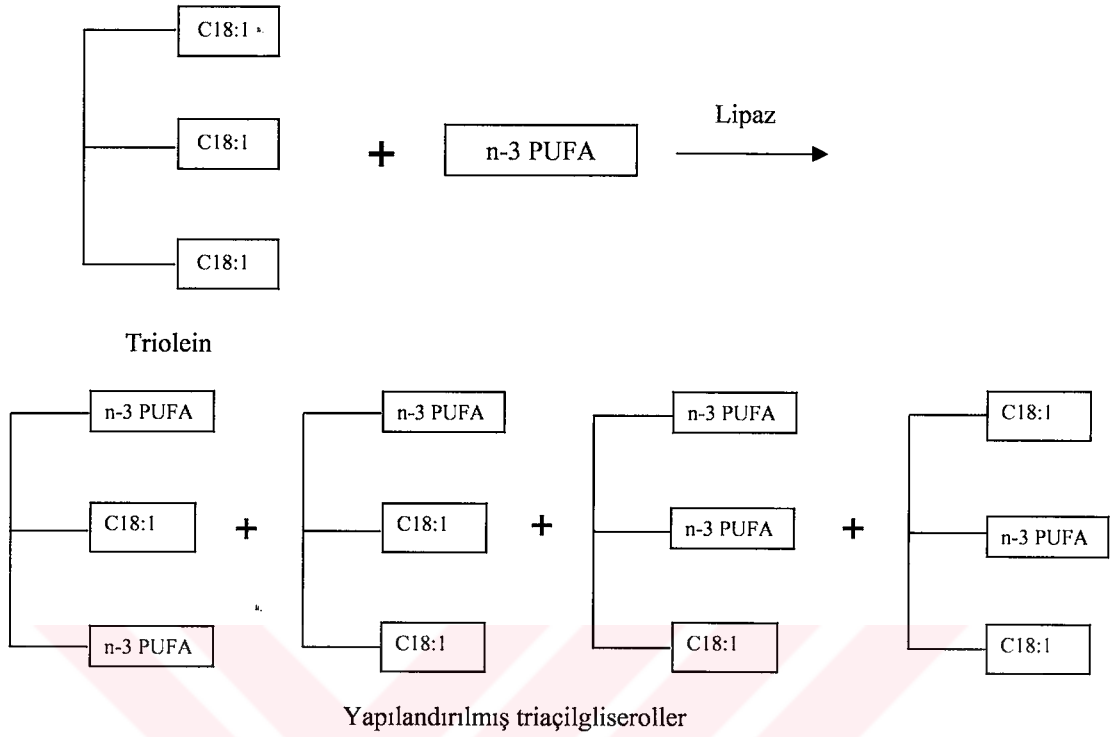
“Direkt esterifikasyon” serbest yağ asitlerinin gliserol ile tepkimeye sokulması, “Transesterifikasyon-Ester iç-değişimi” iki ester arasında açıl gruplarının değişimi (Şekil 2.2), “Transesterifikasyon-Asidoliz” bir ester ve yağ asidi arasında açıl grubu veya radikal değişimi (triaçilgliserollere yeni yağ asitlerinin yerleştirilmesi; Şekil 2.3), “Alkoliz” ise bir ester ve alkol arasındaki esterifikasyon reaksiyonu olarak tanımlanmaktadır (Akoh, 2002).



Şekil 2.2. 1,3-spesifik lipaz enzimi varlığında gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu (Akoh, 2002).

Enzimatik reaksiyonların enzimatik olmayan reaksiyonlara göre belli başlı avantajları, daha ılımlı sıcaklık ve pH koşullarında gerçekleşmeleri ve istenmeyen değişikliklere (özellikle PUFA’larda) pek yol açmamalarıdır. En önemli özellikleri ise spesifik (pozisyonel seçicilik, stereospesifiklik, yapısal seçicilik) olmalarıdır (Gunstone, 2001b).

A. niger, *M. javanicus*, *M. miehei*, *R. arrhizus*, *R. delemar* ve *R. niveus*’dan elde edilen lipazlar 1,3-spesifiktir; yani triaçilgliserollerle tepkimelerinde triaçilgliserolün *sn*-1 ve *sn*-3 pozisyonlarında açıl değişimi olmakta, *sn*-2 pozisyonu ise değişmemektedir. Lipazların bu özelliğinden enzimatik interesterifikasyonda sıkça yararlanılmaktadır (Gunstone, 2001b).



Şekil 1.3. Spesifik olmayan lipaz enzimi varlığında gerçekleşen asidoliz reaksiyonu (Høy ve Xu, 2001).

Uygun enzim kullanılarak uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri EPA ve/veya DHA, besinsel özellikleri geliştirilmiş ürünlerin üretimi amacıyla bitkisel yağların yapısına veya sentetik gliseritlere eklenebilmektedir. Benzer şekilde, C₈ ve C₁₀ açıl zincirleri bitkisel yağlara eklenmekte ve besinsel özellikleri ve enerji değerleri değiştirilebilmektedir. Ürünler, bir uzun iki kısa veya iki uzun bir kısa zincirli triaçilgliserollerdir. Bu tip reaksiyonlarla kolay metabolize edilen kısa ve orta zincirli yağ asitlerini *sn*-1 ve *sn*-3 pozisyonlarında ve esansiyel yağ asitlerini *sn*-2 pozisyonunda içeren triaçilgliseroller elde edilebilmektedir (Akoh, 2002, Gunstone, 2001b).

Yağların enzimatik yöntemlerle esansiyel yağ asitlerince zenginleştirilmesinde menhaden, tuna, sardunya, hamsi vb. gibi balıkların yağları, hardal tohumu, boraj ve çuhaçiçeği tohumu, susam, kavun çekirdeği, keten tohumu yağları, kanola, soya fasulyesi, yer fıstığı, pirinç kepeği, aspir yağları gibi çeşitli bitkisel yağlar kullanılmaktadır. EPA, DHA, kaprik asit, γ -linolenik asit ve KLA ise zenginleştirme

amacıyla yağların yapısına ilave edilen esansiyel yağ asitleri arasındadır. Enzimatik reaksiyonlarda katalizör olarak *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar kullanılmaktadır.

Paez ve diğ. (2002), Jennings ve Akoh (2000), Rakshit ve diğ. (2000), Xu ve diğ. (2000), McNeill ve diğ. (1996) ve Maehr ve diğ. (1994) yaptıkları çalışmalarda menhaden, tuna, sardunya, hamsi gibi çeşitli balıkların yağlarını enzimatik yollarla EPA ve DHA içeriği açısından zenginleştirmişlerdir.

Jennings ve Akoh (1999 ve 2001) menhaden balığı yağı ile yaptıkları çalışmada lipaz enzimini biyokatalizör olarak kullanarak kaprik asidi balık yağının yapısına eklemişlerdir. Garcia ve diğ. (2000), menhaden balığı yağının açilgliserollerine KLA eklemiştir. Hills ve diğ. (1990), balık yağını DHA ve γ -linolenik asit ekleyerek zenginleştirmişlerdir.

Boraj yağının yapısında doğal olarak bulunan γ -linolenik asitin yanısıra EPA, DHA, kaprik ve kaprilik asitçe zenginleştirilerek yapısal lipid elde edilmesine ilişkin çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Senanayake ve Shahidi-1999, 2002; Shimada ve diğ.-1999; Akoh ve Moussata, 1998). Ayrıca susam yağına kaprik asit, kavun çekirdeği yağına EPA, çuhaçiçeği tohumu yağına n-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin eklendiği ve farklı tiplerde hardal tohumu yağlarının uzun zincirli tekli doymamış yağ asitlerince zenginleştirildiği çalışmalar mevcuttur (Jennings ve Akoh-2000; Akoh ve diğ.-1996; Mukherjee ve Kiewitt-1996; Kuan-Hsiang-Huang ve diğ.-1994).

Jennings ve Akoh (2000), pirinç kepeği yağının yapısına kaprik asidi eklemiştir. Kuan-Hsiang-Huang ve Akoh (1994), yer fıstığı, soya fasulyesi ve hidrojene soya fasulyesi yağlarına n-3 çoklu doymamış yağ asitlerini eklemişlerdir. Shimada ve diğ. (1996), aspir ve keten tohumu yağlarına kaprilik asit, Xu ve diğ. (1998) ise kanola yağına kaprik asit ekleyerek YY üretmişlerdir.

2.4.1.3. Mikrobiyal Sentez

Yağlar geleneksel olarak hayvansal ve bitkisel kaynaklardan elde edilmekle beraber, günümüzde bazı değerli yağlar tanklarda veya göllerde yetiştirilen mikroorganizmalardan fermentasyon yoluyla da elde edilebilmektedirler. Kurutulmuş misellerden ekstrakte edilen yağlar, kolesterol, ağır metal ve pestisitleri içermemekte ve hayvansal yağlara ve balık yağlarına göre daha basit bir kompozisyona sahip

olmaktadırlar. *Mortiella isabellina*, *Mortiellaalpina* ve *Crypthecodinium cohnii*'den çoklu doymamış yağ asitlerinin elde edildiği çok sayıda çalışma mevcuttur (Gunstone, 2001b).

2.4.1.4. Biyolojik Yöntemler

Bitkisel kaynaklardan yeni yağlar üç şekilde elde edilebilmektedir. İlki, ilginç bir yağ asidi ve/veya triaçilgliserol profiline sahip bir bitkinin ticari üretim ve hasat için uygun hale getirilmesidir. Kuzey Amerika ve Avrupa'da denenmekle beraber; genellikle uzun yıllar gerektiren yavaş bir prosestir.

İkinci yaklaşımda, çok çeşitliliğe sahip bir gen havuzu gerekmektedir ve uygun türler standart tohum ıslahı yöntemleriyle çarpazlanmaktadır. İstenen özelliklere sahip yeni türlerin elde edilebilmesi için gen havuzu çeşitli kimyasal işlemlerle veya radyasyonla genişletilebilmektedir. Bu yöntem, modern kolza tohumu elde etmek amacıyla Brassica türlerinde başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Bunların yanısıra, yağ asidi ve triaçilgliserollerin biyosentezi için gerekli olan genler için uygun kaynaklardan sağlanabilmekte, klonlanabilmekte ve diğer bitkilere transfer edilebilmektedir. Bu tip genetik modifikasyon prosedürleri kolza tohumu, soya fasulyesi ve diğer yağlı tohumlara uygulanabilmektedir (Gunstone, 2001b).

2.4.2. Yapılandırılmış Yağların Üretiminde Kullanılan Yağ Asitleri

YY'ların sentezinde farklı yağ asitleri kullanılmakta; her birinin fonksiyon ve özellikleri maksimum yarar sağlamak amacıyla bir araya getirilmektedir. Bu yağ asitleri, kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), orta zincirli yağ asitleri (OZYA), çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), doymuş uzun zincirli yağ asitleri (UZYA) ve tekli doymamış yağ asitlerini kapsamaktadır. Tablo 2.2, klinik uygulamalarda kullanılacak YY'lar için bu yağ asitlerinin önerilen miktarlarını vermektedir. Yağ asitleri ve TAG molekülündeki pozisyonları YY'ın metabolik hız, sağlık açısından faydaları gibi fonksiyonel ve fiziksel özelliklerini belirler. Bu yüzden yağ asitlerinin fonksiyon ve metabolizmasının bilinmesi önemlidir (Akoh, 2002).

Tablo 2.2. Yapılandırılmış Yağların üretiminde kullanılacak yağ asitlerinin önerilen optimum miktarlarını ve fonksiyonları (Akoh, 2002).

Yağ asidi	Miktar ve fonksiyonu
<i>n</i> -3	%2-5. Bağışıklık sistemini güçlendirme, kanın pıhtılaşmasını azaltma, serum TAG'lerini azaltma ve koroner kalp hastalıkları riskini azaltma
<i>n</i> -6 <i>n</i> -9	%3-4. İnsan vücudunun esansiyel yağ asidi gereksinimini karşılama Uzun zincirli yağ asidi dengesi için tekli doymamış yağ asidi (18:1 <i>n</i> -9)
Kısa ve orta zincirli yağ asitleri*	%30-65. Hızlı enerji kaynağı, kolay absorbe edilebilir. Özellikle prematüre bebekler, hastalar ve malabsorbsiyon bozukluklarına sahip bireylerin beslenmesinde önemli

*Temel bileşen olarak kısa zincirli ve/veya orta zincirli yağ asitlerini içeren yapılandırılmış yağ

2.4.2.1. Kısa ve Orta Zincirli Yağ Asitleri

KZYA'leri 2 ila 6 karbon içeren zincire sahiptirler (C2 – C6). Memelilerin gastrointestinal bölgesinde, karbonhidratların mikrobiyal sindiriminin son ürünü olarak bulunmaktadırlar. KZYA, insan beslenmesinde genellikle yaklaşık %5-10 bütirik asit ve %3-5 kaproik asitten oluşan bir TAG karışımına sahip inek sütünün tüketilmesi sırasında alınmaktadırlar. Bütirik asit tereyağında da bulunmakta ve TAG'un %30'unu oluşturmaktadır. Aynı zamanda uçucu yağ asitleri olarak da bilien KZYA, yüksek çözünürlükleri, küçük molekülleri ve kısa zincirli olmaları nedeniyle midede OZYA'lerinden daha hızlı emilirler (Akoh, 2002).

Orta zincirli triaçilgliseroller, gliserol yapısına esterlenmiş C6:0-C12:0 yağ asitlerini içermektedir. Lipid emülsiyonlarının üretiminde veya enteral ve parenteral beslenme formüllerinde UZT'lerle karıştırılarak kullanılmaktadır. OZT'ler, oda sıcaklığında sıvı veya katıdır ve erime noktaları yağ asidi kompozisyonlarına bağlı olarak değişmektedir. OZT'ler, boya, aroma maddeleri, vitaminler ve farmasetikler için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Genellikle tohum yağlarında veya laurik yağlarda bulunmaktadır (ör: hindistancevizi yağı %10-15 C8:0 – C10:0 asidini içermektedir ve OZT hazırlanmasında hammadde olarak kullanılmaktadır). UZT'lerin 9 kcal'lik kalori değerine karşılık OZT'lerin kalori değeri 8.3 kcal'dir. Bu özellikleri sayesinde OZT'ler düşük kalorili tatlılarda kullanım açısından dikkat çekmektedirler. %20 ve

%30 lipid konsantrasyonları içeren beslenme diyetleri, OZT'lerin obezite kontrolünde kullanılabileceğini göstermiştir. OZT'ler, bazı hastalara tokluk, doyunluk hissi vermektedir Aynı zamanda salata sosları, fırıncılık ürünleri ve dondurulmuş yiyecekler gibi kalorisi düşürülmüş gıdalarda kullanılabilmektedirler. OZT'ler, UZT'leri içeren karışımlarda tüketildikleri zaman sağlık açısından faydalı özellikler göstermektedirler. OZYA/OZT tüketiminin avantajları şu şekilde sıralanabilmektedir: (a) OZYA, UZYA'ne göre daha kolay yükseltgenirler; (b) mitokondriye OZT'lerin taşınması için karnitine ihtiyaç yoktur; bu yüzden OZT bebekler ve stres altındaki yetişkinler için ideal bir substrattır; (c) OZYA, şilomikron oluşumunu gerektirmezler; (d) OZYA, karaciğere direkt olarak taşıma sistemi ile taşınırlar (Akoh, 2002, Bell ve diğ., 1997).

2.4.2.2. Omega-6 Yağ Asitleri

En çok bitkisel yağlarda ve hindistancevizi, kakao ve palm fıstıklarının yağları haricindeki bitki tohumu yağlarında bulunan linoleik asit ($18:2n-6$) çok bilinen $n-6$ yağ asitlerinden biridir. Linoleik asitin plazma kolesterolünü düşürücü etkisinin bulunduğu ve atar damarda pıhtı oluşumunu önlediği bilinmektedir. $n-6$ yağ asitleri insanlar ve memeliler tarafından sentezlenemedikleri için esansiyel yağ asitleri olarak kabul edilmektedirler (Akoh, 2002).

Linoleik asitin diyetle %1-2 oranında alındığında bebeklerde çeşitli biyokimyasal ve klinik eksiklikleri önlediği önerilmiştir. Yetişkinler diyetlerinde yeteri miktarda $18:2n-6$ tükettikleri için eksikliği söz konusu olmamaktadır. Linoleik asit eksikliği dermatit, aşırı terleme, büyüme-gelişme bozuklukları ve yaraların güç iyileşmesi gibi belirtilerle ortaya çıkmaktadır. Beslenme uzmanları YY'nin %3-4 oranında $n-6$ içermesinin esansiyel yağ asidi gereksinimi açısından yeterli olduğunu önermektedirler (Akoh, 2002).

2.4.2.3. Omega-3 Yağ Asitleri

Omega-3 yağ asitleri de tıpkı tüm memelilerde olduğu gibi insanlar tarafından sentezlenemedikleri ve diyetle alınmaları gerektiği için esansiyel yağ asitleri olarak bilinmektedirler. $n-3$ yağ asitleri, genellikle soya fasülyesi ve keten tohumu yağlarında ve yeşil yapraklı bitkilerin kloroplastında bulunan linolenik asit ($18:3n-3$) ile temsil edilmektedirler. YY sentezinde dikkat çeken diğer çoklu doymamış $n-3$ yağ asitleri genellikle balık yağlarında; özellikle okyanus balıklarının yağlarında

bulunan eikosapentaenoik asit, EPA (20:5 n -3) ve dokosahekzanoik asit, DHA (22:6 n -3)'tir. Diyetleri yeterli miktarda n -3 çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içermeyen çocuklar nörolojik rahatsızlıklar ve görme bozuklukları, dermatit, büyüme geriliği gibi problemler yaşamaktadırlar. Bu nedenle DHA gibi n -3 PUFA'lar diyetlerinde ve YY tasarımında yer almalıdır (Akoh, 2002).

EPA ve DHA gibi n -3 çoklu doymamış yağ asitlerinin diyetle alındığında kardiyovasküler hastalıklar, kanser, yüksek tansiyon, şeker hastalığı ve depresyon üzerinde etkili olduğu son yıllarda yapılan klinik çalışmalarla ispatlanmıştır. EPA, özellikle kan koagülasyon profili üzerindeki olumlu etkileri (antitrombotik etki) sayesinde kalp krizlerini önlemede önemlidir. EPA'nın kanda akışkanlığı sağlayıcı etkiye sahip olduğu ve serum kolesterol konsantrasyonunu düşürdüğü de bildirilmiştir. DHA özellikle prematüre bebeklerde retina ve beyin normal fonksiyonlarını yerine getirmesinde ve büyüme-gelişmeyi hızlandırmada etkili olduğu bilinmektedir (Akoh, 2002, Puiggros ve diğ., 2002, Özçelik ve Karaali, 2002).

2.4.2.4. Omega-9 Yağ Asitleri

Omega-9 yağ asitleri veya tekli doymamışlar kanola, zeytin, fıstık ve yüksek-oleik ayçiçek yağı gibi bitkisel yağlarda oleik asit (18: n -9) olarak bulunmaktadır. Oleik asit insan vücudu tarafından sentezlenebildiği için esansiyel yağ asidi olarak kabul edilmemektedir; ancak vücutta plazma kolesterolünü düşürmede ılımlı bir rol oynamaktadır (Akoh, 2002).

2.4.2.5. Uzun Zincirli Doymuş Yağ Asitleri

Genellikle doymuş yağ asitlerinin plazma ve serum kolesterol seviyelerini yükselttiği düşünülmekte; ancak 4-10 C'lu yağ asitlerinin kolesterol seviyesini yükseltmediği bilinmektedir. Stearik asitin (18:0) de plazma kolesterol seviyesini yükseltmediği bildirilmiştir. Yüksek miktarda uzun zincirli doymuş yağ asidi; özellikle de stearik asit içeren TAG'lar insan vücudunda çok düşük oranda emilime uğramaktadır; çünkü 18:0'ın erime noktası vücut sıcaklığından yüksektir; bu yüzden emülsiyon oluşturma eğilimleri ve çözünürlükleri düşüktür. Emilimlerinin düşük olması, doymuş uzun zincirli TAG'ları düşük kalorili YY sentezi için potansiyel bir substrat haline getirmektedir (Akoh, 2002).

2.4.3. Yapılandırılmış Yağların Üretiminde Kullanılan Lipaz Enzimleri

YY'ların enzimatik sentezi lipazlar varlığında gerçekleştirilmektedir. TAG açilhidrolazları (EC 3.1.1.3) olarak da bilinen TAG lipazları, TAG'ları diaçilgliserol, monoaçilgliserol, serbest yağ asitleri ve gliserole hidrolize eden enzimlerdir. TAG'ların hidrolizini, yağ asitleri ile transesterifikasyonunu veya yağ asitlerinin gliserol ile direkt esterifikasyonunu katalizleyebilmektedirler. Lipaz enzimleri, bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilmektedir. Bitkisel lipazların ticari uygulamaları bulunmamakla birlikte, mikrobiyal ve hayvansal lipazlar yeni gıda ingrediyenlerinin üretiminde sıkça kullanılmaktadır. Mikrobiyal lipazlar, birçok mantar, küf ve bakteriden elde edilebilmektedir (Al-Taweel ve Sungur, 1995).

Lipaz enzimleri ile katalizlenen hidroliz, gliseroliz, esterifikasyon, asidoliz ve interesterifikasyon gibi reaksiyonlarda amaç en yüksek verim ve saflıkta spesifik son ürünler üretmektir. Reaksiyon veriminin artırılmasında su aktivitesi, sıcaklık ve substrat kompozisyonu gibi proses koşullarının optimizasyonunun yanısıra en uygun spesifikliğe sahip doğru lipaz enziminin seçilmesi de son derece önemlidir (Diks ve Bosley, 2000).

2.4.4. Bitkisel Yağların ve Tohum Yağlarının Esansiyel Yağ Asitlerince Zenginleştirilmesini Etkileyen Faktörler

2.4.4.1. Sıcaklık

Sıcaklığın enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir. Her enzim için optimum sıcaklık aralığı enzimin kaynağı olan mikroorganizmaya, immobilizasyon prosesine, enzimin kimyasal modifikasyonuna ve pH'ya bağlı olarak değişmektedir (Paez ve diğ., 2002). Literatürdeki çalışmalarda, optimum bir hıza ulaşıncaya kadar, ortam ısındıkça enzim aktivitesinin arttığı ve sıcaklıktaki artışın açil migrasyonunu hızlandırdığını belirtilmiştir (Mu ve diğ., 1998; Xu ve diğ. 1998). Enzim aktivitesinin sıcaklıkla değişim nedenine ilişkin literatürde farklı yorumlar bulunmaktadır. Wanasundara ve Shahidi (1999), bu durumu enzimi üç boyutlu şeklinde tutan hidrojen bağlarının ve diğer zayıf çekim kuvvetlerinin, çevredeki sıcaklık değişimlerine hassas olmalarıyla açıklar. Sıcaklığın artmasıyla

inkorporasyon yüzdesindeki artışın nedeni olarak, sıcaklıkla ilişkili olarak substratın viskozitesinin düşmesiyle beraber substrat ve enzim arasındaki temasın gelişmesi gösterilmektedir (Mu ve diğ.,1998; Xu ve diğ. 1998). Ancak, 60°C' gibi ulaşılan optimum noktadan yüksek sıcaklıklarda, reaksiyon hızının artmayıp, hatta bir miktar azalması da, çoklu doymamış yağ asitlerinin ısı bozunmaya uğraması ve ayrıca, çok yüksek sıcaklıklarda lipaz enzimin geri dönüşsüz olarak denature olacağı şeklinde açıklanabilir.

2.4.4.2. Reaksiyon Süresi

Yağların enzimatik modifikasyon reaksiyonlarında sürenin etkisinin bilinmesi, hem reaksiyonun gelişiminin incelenmesi, hem de yüksek verim elde edilen en kısa sürenin belirlenerek proses için üretim maliyetinin düşürülmesi açısından önemlidir. (Senanayake ve Shahidi 1999; Akoh ve Moussata 1998).

Senanayake ve Shahidi (1999)'nin, boraj yağının yapısına DHA'yı *Candida antarctica* lipazı varlığında inkorpore ettikleri çalışmada, 24 saate kadar olan süre zarfında reaksiyondan elde ettikleri ürünün %DHA miktarı süre ilerledikçe artmıştır. Ancak 24 saatten sonra ürünün DHA içeriğinde önemli bir farklılık olmadığı bildirilmiştir.

Akoh ve Moussata (1998)'nin, *Candida antarctica* orijinli spesifik olmayan SP 435 lipazı ve *Rhizomucor miehei* orijinli *sn*-1,3 spesifik IM 60 lipazı katalizörlüğünde boraj yağına kaprik asit ve EPA inkorpore ettikleri çalışmada, inkübasyon süresi ilerledikçe inkorporasyon oranı artmıştır. Yine aynı çalışmada her iki enzim için de 10. ve 16. saatler arasında inkorporasyonda hızlı bir artış olduğu; ancak optimum inkorporasyonun 40 saat civarında sağlandığı bildirilmiştir.

Benzer şekilde, Akoh ve diğ. (1996)'nin, *Candida antarctica* orijinli SP 435 lipazı katalizörlüğünde çuhaçiçeği yağının yapısına EPA inkorpore ettikleri çalışmada, 24 saate kadar olan süre zarfında EPA inkorporasyonunun arttığı, 24 saatten sonra ise herhangi bir artışın gözlenmediği bildirilmiştir.

Shimada ve diğ. (1996) ise, *Rhizopus delemar* orijinli *sn*-1,3 spesifik lipaz varlığında aspir ve keten tohumu yağlarına kaprilik asit inkorpore ettikleri çalışmada, en yüksek verimin sağlandığı 50 saatlik süreyi, optimum reaksiyon süresi olarak belirlemişlerdir.

2.4.4.3. Substat-Molar Oranı

Yağların enzimatik yöntemlerle modifiye edilerek triaçilgliserol yapılarına esansiyel yağ asitlerinin ilave edildikleri reaksiyonlarda, son üründe istenen esansiyel yağ asidi miktarına göre substratların; yani orijinal yağ ve inkorpore edilecek esansiyel yağ asidinin molar oranı ayarlanması mümkün olmaktadır.

Enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarında substrat-molar oranının seçimi genellikle, proses maliyetine ve serbest yağ asitlerinin veya açıl donörlerinin evaporasyon ve/veya distilasyon ile uzaklaştırılmasındaki güçlüklerle bağlı olarak yapılmaktadır (Hoy ve Xu, 2001).

Senanayake ve Shahidi (1999), substrat olarak boraj yağı ve DHA, Akoh ve Moussata (1998), boraj yağı ve EPA, yine Akoh ve diğ. (1996), çuhaçiçeği ve EPA kullandıkları çalışmada benzer bir sonuca ulaşarak; *n*-3 çoklu doymamış yağ asidi mol sayısı arttıkça inkorporasyon oranının arttığını bildirmişlerdir.

Mu ve diğ. (1998), yağ ve yağ asidi arasındaki molar oranın inkorporasyon ve açıl migrasyonuna etkisini inceledikleri çalışmada, yağ asidinin mol miktarının arttıkça inkorporasyonun da arttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, yüksek bir molar oran seçilerek reaksiyon hızının artırılacağı ve süre kısıllacağı için açıl migrasyonunun da azaltılabileceği önerilmiştir.

Ancak Jennings ve Akoh (2000), inkorpore edilecek olan yağ asidinin aşırı miktarda kullanılmasının maliyeti artırmanın yanısıra, lipaz inhibisyonuna neden olabileceğini ve modifikasyon reaksiyonu büyük ölçekte gerçekleştirildiğinde ortamdaki fazla yağ asidinin uzaklaştırılırken ürün veriminin de düşebileceğini öne sürmüşlerdir.

2.4.4.4. Su Miktarı

Lipazla katalizlenen reaksiyonlar tersinir reaksiyonlardır; yani hem hidroliz hem de esterifikasyon gerçekleşmektedir. Hidrolizde su tepkimeye girerken, esterifikasyonda bir ürün olmaktadır. Bu yüzden karşıdaki su miktarı reaksiyonun hangi yönde gelişeceğini (reaksiyonun dengesini) etkilemektedir. Ayrıca enzimatik reaksiyonlarda enzimin üç boyutlu yapısının korunması için suyun ortamda mevcut olması

gerekmektedir; ancak fazla miktarda suyun sentez yerine hidrolize yol açarak ürün verimini düşüreceği de göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktördür.

Candida antarctica lipazı kullanılarak bitkisel yağlara ve tohum yağlarına *n*-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin inkorpore edildikleri çalışmalarda fazla miktarda suyun inkorporasyon oranını düşürdüğü bildirilmiştir. Enzimatik reaksiyonun başlangıç aşamalarında eklenen suyun reaksiyon hızını artırdığı ve süreyi kısalttığı; ancak daha ilerleyen aşamalarda diaçilgliserol oluşumundaki artışının, triaçilgliserollerin oluşumuna izin vermediği de belirtilmiştir (Akoh ve Moussata, 1998; Huang ve Akoh, 1994). Ayrıca Xu ve diğ. (1998), yaptıkları bir çalışmada fazla miktarda suyun enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerinde olumsuz etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Enzimatik reaksiyonda kullanılan çözgenin polaritesinin enzimle ilişkili suyun tutulmasında oldukça etkili olduğu ve katalizi etkilediği bilinmektedir. Bu yüzden çalışmalarda genel olarak apolar organik çözgenler kullanılmaktadır (Huang ve Akoh, 1994).

Lipazla katalizlenen esterifikasyon reaksiyonlarında genellikle diaçilgliserollerin oluştuğu yan reaksiyonlar da gerçekleşmektedir. Diaçilgliseroller esas reaksiyonun ara ürünleri olmakla beraber, açil migrasyonuna neden olarak triaçilgliserol-yan ürünlerinin oluşmasına yol açmaktadırlar. Reaksiyon süresince açil migrasyonunu ve yan-ürün oluşumunu etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Sıcaklık artışı, reaksiyon süresinin uzaması ve su miktarındaki artış açil migrasyonunu ve yan-ürün oluşumunu artırmaktadır (Hoy ve Xu, 2001).

2.5. Tepki-Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology)

Tepki-Yüzey Metodolojisi, matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı, ve bağımlı değişkenin (tepkinin) çok sayıda bağımsız değişkenden etkilendiği problemlerin analizinde, modellenmesinde ve tepkinin optimizasyonunda uygulanan bir yöntemdir. En çok kullanılan deney tasarımları “Central composite” (Merkezi-bileşik), “Box-Benken”, tam faktöryel, kısmi faktöryel ve rastgele bloklama. Bunları Latin kareler, Taguchi ve “Plaket Burman” tasarımları izlemektedir (Montgomery, 1997).

Merkezi-bileşik deney tasarımlarında, iki veya daha fazla faktörün cevap üzerindeki etkileri aynı anda araştırılabilmekte ve en az sayıdaki deneyden en düşük maliyetle çok sayıda anlamlı veri elde edilebilmekte; ayrıca kritik olduğu düşünülen herhangi bir değişken üzerinde yapılan değişikliklerin etkilerini önceden tahmin etmeye olanak sağlamaktadır (Dziezak, 1990; Montgomery, 1997).

Merkezi-bileşik deney desenleri küp noktalar (cube points), yıldız noktalar (star points) ve merkez noktaları (center points) olmak üzere üç tip deneysel noktayı kapsamaktadır. Küp noktalar, n_c olarak ifade edilen hiperkübün üstündeki noktalarda yerleşmişlerdir. Bu noktalar için kodlanan bağımsız değişken seviyesi ± 1 'dir. Merkezi-bileşik deney tasarımı ikinci noktalar grubu olan yıldız noktalarının $(\pm \alpha, 0, \dots, 0)$, $(0, \pm \alpha, 0, \dots, 0)$, ..., $(0, \dots, 0, \pm \alpha)$ koordinatları vardır. Üçüncü grup noktalar, koordinatları daima $(0, \dots, 0)$ olan ve dizaynın merkezinde yerleşen noktalarıdır. Merkez noktalarının sayısı, Tablo 2.3'te de gösterildiği gibi, gereksinim duyulan ortogonal dizaynla belirlenmektedir (Thomson, 1982).

Tablo 2.3. Çevrilebilir Merkezli Bileşik Deneş Tasarımları (Thompson, 1982)

Bağımsız Değişken Sayısı k	2.Dereceden Modelde parametrelerin Sayısı p	Küp Noktalarının Sayısı 2^{k-m-n_c}	Yıldız Noktaları Sayı n_0	Değer α	Ortogonal Tasarım			Uniform Bilgi Tasarımı		
					Merkez Noktalarının Sayısı n_0	Toplam Nokta Sayısı	Merkez Noktalarının Sayısı n_0	Toplam Nokta Sayısı	Merkez Noktalarının Sayısı n_0	Toplam Nokta Sayısı
2	6	4	4	1.414	8	16	5	13		
3	10	8	6	1.682	9	23	6	20		
4	15	16	8	2.0	12	36	7	31		
5	21	32	10	2.378	17	59	10	52		
5.5 tekrar	21	16	10	2.0	10	36	6	32		
6	28	64	12*	2.828	24	100	15	91		
6.5 tekrar	28	32	12	2.378	15	59	9	53		
7	36	128	14	3.364	35	177	21	163		
7.5 tekrar	36	64	14	2.828	22	100	14	92		
8	45	256	16	4.0	52	324	28	300		
8.5 tekrar	45	128	16	3.364	33	177	20	164		
8.25 tekrar	45	64	16	2.828	20	100	13	93		

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan fındık yağı yerel marketlerden, menhaden yağı ise Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) firmasından temin edilmiştir. Reaksiyonlarda kullanılan *Candida antarctica* orijinli Novozyme 435 ve *Rhizomucor miehei* orijinli Lipozym TL IM ve Lipozym RM IM enzimleri Novozymes (Danbury, CT) firmasından tarafımıza hediye edilmiştir. Menhaden yağı orijinli PUFA standardı ise Supelco (Bellefonte, PA) firmasından temin edilmiştir. Reaksiyon ürünlerinin analizi için uygulanan ince tabaka kromatografisinde (TLC) kullanılan 20x20 cm boyutunda, silikajel 60 ile kaplı alüminyum tabakalar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasının ürünüdür. Analizlerde kullanılan çözügen ve kimyasal maddeler Merck (Darmstadt, Germany) ve Riedel (Seelze, Almanya) firmalarının ürünleridir.

3.2. Metot

3.2.1. Yağ Asitlerinin Analizlenmesinde Kullanılan Gaz Kromatografisi Metodu

Çalışmada substrat olarak kullanılan fındık ve menhaden yağlarının ve reaksiyon ürünlerinin yağ asidi kompozisyonları gaz kromatografisi (GC) ile tespit edilmiştir. Thermo Quest marka Trace-GC 2000 model gaz kromatografi cihazı ve Zebron DB-Wax model 30 m uzunluğunda ve 0,25 µm film kalınlığında kolon kullanılmıştır. AOAC 963.33 no'lu metoda uygun olarak örneğin metil esterleri hazırlanmıştır (AOAC, 1990). Sıcaklık 180°C'de 1 dk, 200°C'de 35 dk ve 225°C'de 5 dk olacak şekilde kademeli olarak arttırılmıştır. Sıcaklık artışı 5°C/dk, inlet sıcaklığı 250 °C, split flow 75, split ratio 50 ve taşıyıcı gazın hızı ise 1.5 ml/dk olarak sabit hıza ayarlanmıştır. Dedektör sıcaklığı 270 °C'dir.

3.2.2. Menhaden Yağından Serbest Yağ Asitlerinin Eldesi

Menhaden yağından serbest yağ asitlerinin eldesinde Wanasundara ve Shahidi (1999)'nin uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde göre 25 g menhaden yağı, 5.75 g KOH, 11 ml su ve 66 ml %95'lik sulu etanol karışımı 1 saat boyunca 60°C'de geri soğutucu altında sabunlaştırılmıştır. Süre sonunda karışıma 50 ml distile su eklenmiş ortamdan sabunlaşmayan maddelerin uzaklaştırılması için, karışım ayırma hunisinde iki kez 100 ml heksan ile çalkalanmıştır. Sabunlaşan kısmı içeren sulu fraksiyon 3 N HCl ile asitlendirilmiştir (pH=1). Daha sonra karışım ayırma hunisine alınmış ve açığa çıkan yağ asitleri 50 ml heksan ile ekstrakte edilmiştir. Heksan fazı susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra döner buharlaştırıcıda heksanın uçurulması sağlanmıştır. Bu şekilde elde edilen yağ asitleri kullanıma dek buzdolabında 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Menhaden Yağından “Üre Fraksiyonlama” Yöntemi ile Doymamış Yağ Asitlerinin Konsantre Edilmesi

Menhaden yağından n-3 yağ asidi konsantresi, Wanasundara ve Shahidi (1999)'nin uyguladığı yöntemde göre elde edilmiştir. Bu yöntemde göre, menhaden yağından elde edilen serbest yağ asidi (10 g), üre ve metanol ile yağ asidi: üre:metanol oranı 1:5:20 olacak şekilde karıştırılmış, ve karışım homojen bir hal alana kadar (1 saat boyunca) 60°C'de geri soğutucu altında karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım -4°C'de 6 saat boyunca tutularak kristallendirilmiştir. Kristalizasyon sonrasında derhal süzölmüş ve üre kristalleri 25 ml metanol ile yıkanmıştır. Filtrata eşit hacimden su eklenerek 6 N HCl ile pH 4-5'e dek asitlendirilmiştir. Karışıma eşit hacimde heksan eklenerek 1 saat boyunca karıştırılmış ve ayırma hunisine aktarılmıştır. Açığa çıkan yağ asitlerini içeren heksan fazı, üre içeren su fazından ayrılmıştır. Heksan fazı, içinde kalabilecek üreyi ayırmak için distile suyla yıkanmış, susuz sodyum sülfat geçirilerek kurutulmuştur. Döner buharlaştırıcıda çözgenin uzaklaştırılmasının ardından örnek kullanıma dek buzdolabında 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4. Asidoliz Reaksiyonu

Reaksiyonlar, 50 ml'lik cam balonda gerçekleştirilmiştir. Menhaden yağı konsantresi ve fındık yağı substrat-molar oranı (menhaden yağı konsantresi/fındık yağı, mol/mol) 1:3 olacak şekilde karıştırılmış, 30 ml heksan ve tepkimeye giren reaktanların ağırlıkça %10'u kadar Novozyme 435 enzimi ve %3'ü kadar su eklenerek balon

47.5°C'deki su banyosuna alınmıştır. 36 saat boyunca 400 rpm sabit hızda karıştırılarak inkübe edilmiştir.

Reaksiyon sonunda örnekler alınarak 90°C'deki su banyosunda 15 dakika bekletilmiş ve enzimin inaktive olması sağlanmıştır. Örnek analizlenene dek buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.5. Ürünlerin Analizi

Reaksiyon ürünlerine, kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi yöntemleri uygulanarak triaçilgliserol fraksiyonları ayrılmıştır.

3.2.5.1. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisinde 45 cm uzunluğunda ve 3 cm çapında cam kolon ve sabit faz olarak 0,5-1,0 mm partikül boyutunda silikajel 60 kullanılmıştır. 25 gr silikajel 110°C'deki etüvde 3-4 saat boyunca kurutulduktan sonra desikatöre alınarak oda sıcaklığına getirilmiş ve heksanla hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde karıştırılarak kolona doldurulmuştur. Reaksiyon ürünün 5 ml'si heksan ile 50 ml'le seyreltilmiş ve kolona verilmiştir. Kolona sırasıyla 200 ml heksan:dietil eter (95:5, hacimce) ve 200 ml heksan:dietil eter (90:10, hacimce) çözümleri verilmiş ve akış hızı dakikada 3 ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.5.2. İnce Tabaka Kromatografisi

Kolondan toplanan fraksiyonlara ince tabaka kromatografisi uygulanarak triaçilgliseroller toplanmıştır. İnce tabaka kromatografisinde 20x20 cm boyutunda, silikajel 60 ile kaplı alüminyum tabakalar kullanılmıştır. Örnekler ince tabakaya spotlandıktan sonra petrol eteri:dietil eter:asetik asit (90:10:1, hacimce) çözümleriyle yürütülmüştür. Daha sonra tabaka iyot tankına alınarak bantlar gözlemlenmiştir.

Triaçilgliserolleri içeren fraksiyonlar, döner buharlaştırıcıda çözümleri uçurulduktan sonra AOAC 963.33 no'lu metoda uygun olarak metil esterleri hazırlanmış ve gaz kromatografisi ile yağ asidi kompozisyonları belirlenmiştir.

3.2.6. Deneysel Tasarım

Lipaz enzimi kullanılarak fındık yağının uzun zincirli çoklu doymamış n-3 yağ asitlerince zenginleştirilmesi reaksiyonu üzerinde sıcaklık, süre, substrat-molar oranı

ve su miktarı gibi farklı faktörlerin etkisinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla deneysel tasarımdan yararlanılmış, Tepki Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology) kullanılmıştır. Bu amaçla hem ön deneme sonuçlarından yararlanılarak hem de literatür taraması sonucunda bağımsız değişkenler için Tablo 3.5'te verilen değer aralığı seçilmiştir (Namal Senanayake ve Shahidi, 1999; Akoh ve Moussata, 1998; Jennings ve Akoh; 1999; 2000, Akoh ve diğ., 1996; Cerdán ve diğ., 1998; Xu ve diğ., 1998).

Merkezi Bileşik Deney Tasarımı (Central Composite Design)'nda 4 faktör (sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat-molar oranı, su miktarı) ve 5 seviyeyle ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$) çalışılmıştır (Montgomery, 1997). Belirlenen noktalardaki kodlara karşı gelen değerler Tablo 3.1'de gösterilmektedir.

Tablo 3.1. Merkezi Bileşik Deney Tasarımında belirlenen noktalardaki kodlara karşı gelen değerler

Parametre	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Sıcaklık (°C)	32.5	40	47.5	55	62.5
Süre (saat)	0	18	36	54	72
Substrat-molar oranı (findık yağı/menhaden yağı konsantrisi, mol/mol)	1	2	3	4	5
Su miktarı (ağırlıkça %)	0	1.5	3	4.5	6

Merkezi Bileşik Deney Tasarımıyla belirlenen 4 değişkenli ve 5 kademeli deney deseninin noktaları (kodları ve değerleri ile) Tablo 3.2'de gösterilmektedir. Merkez noktasında üç tekrar yapılmıştır (Montgomery, 1997).

3.2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizlerde STATISTICA 6.0 (StatSoft® Inc.) bilgisayar paket programı kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Merkezil Bileşik Deney Tasarımında belirlenen 35 deneyin koşulları ve kod değerleri

Deney no	Sıcaklık		Süre		Substrat-molar oranı		Su miktarı	
	Kod	Değer	Kod	Değer	Kod	Değer	Kod	Değer
1	-1	40	-1	18	-1	2	-1	1,5
2	+1	55	-1	18	-1	2	-1	1,5
3	-1	40	+1	54	-1	2	-1	1,5
4	+1	55	+1	54	-1	2	-1	1,5
5	-1	40	-1	18	+1	4	-1	1,5
6	+1	55	-1	18	+1	4	-1	1,5
7	-1	40	+1	54	+1	4	-1	1,5
8	+1	55	+1	54	+1	4	-1	1,5
9	-1	40	-1	18	-1	2	+1	4,5
10	+1	55	-1	18	-1	2	+1	4,5
11	-1	40	+1	54	-1	2	+1	4,5
12	+1	55	+1	54	-1	2	+1	4,5
13	-1	40	-1	18	+1	4	+1	4,5
14	+1	55	-1	18	+1	4	+1	4,5
15	-1	40	+1	54	+1	4	+1	4,5
16	+1	55	+1	54	+1	4	+1	4,5
17	-1	40	0	36	0	3	0	3
18	+1	55	0	36	0	3	0	3
19	0	47,5	-1	18	0	3	0	3
20	0	47,5	+1	54	0	3	0	3
21	0	47,5	0	36	-1	2	0	3
22	0	47,5	0	36	+1	4	0	3
23	0	47,5	0	36	0	3	-1	1,5
24	0	47,5	0	36	0	3	+1	4,5
25	+2	62,5	0	36	0	3	0	3
26	-2	32,5 ^a	0	36	0	3	0	3
27	0	47,5	+2	72	0	3	0	3
28	0	47,5	-2	0	0	3	0	3
29	0	47,5	0	36	+2	5	0	3
30	0	47,5	0	36	-2	1	0	3
31	0	47,5	0	36	0	3	+2	6
32	0	47,5	0	36	0	3	-2	0
33	0	47,5	0	36	0	3	0	3
34	0	47,5	0	36	0	3	0	3
35	0	47,5	0	36	0	3	0	3

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Hammaddelerin Yağ Asidi Kompozisyonu Açısından Karakterizasyonu

4.1.1. Fındık Yağı

Öncelikle fındık yağının gaz kromatografisi kullanılarak yağ asidi kompozisyonu belirlenmiştir. Fındık yağının yağ asidi bileşimi Tablo 4.1’de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Fındık yağının yağ asidi kompozisyonu

Yağ Asidi	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:1
% miktarı	5.22	0.19	2.08	82.86	9.48	0.07	0.10

4.1.2. Menhaden Yağı ve Menhaden Yağının “Üre Fraksiyonlama” Yöntemi ile Konsantrasyonu

Fındık yağının zenginleştirilmesi amacıyla kullanılan uzun zincirli n-3 çoklu doymamış yağ asitleri (EPA ve DHA) konsantrasyonu, menhaden yağından üre fraksiyonlama yöntemiyle elde edilmiştir. Üre fraksiyonlama yöntemi, doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin elimine edilmesi için sıkça uygulanan bir yöntemdir (Wanasundara ve Shahidi, 1999). Orijinal menhaden yağının ve konsantre edilmiş menhaden yağının yağ asidi kompozisyonları Tablo 4.2’te görülmektedir. Üre fraksiyonlama yöntemiyle menhaden yağındaki doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri elimine edilirken, EPA içeriği %12.26’dan %23.63’e, DHA içeriği ise %13.51’den %42.11’e yükseltilmiştir.

Tablo 4.2. Menhaden yağının ve “Üre Fraksiyonlama” yöntemi ile elde edilen konsantrenin yağ asidi kompozisyonu

Yağ Asidi	Menhaden yağındaki % miktarı	Konsantredeki % miktarı
C14:0	8.99	0.49
C16:0	16.68	0.26
C16:1n7	11.55	1.62
C16:2n4	2.19	2.6
C16:3n4	1.46	3.80
C18:0	3.12	3.93
C18:1n9	6.79	0.19
C18:1n7	3.17	-
C18:2n6	1.27	0.43
C18:3n4	0.43	1.08
C18:3n3	1.24	0.68
C18:4n3	3.40	10.84
C20:1n9	1.10	-
C20:4n6	0.78	0.85
C20:4n3	1.68	2.80
C20:5n3	12.26	23.63
C22:5n3	2.04	2.16
C22:6n3	13.51	42.11

4.2. Ön Denemeler

Literatürde enzimatik esterifikasyonlarda kullanıldığı belirtilen enzimlerden Novozyme 435, Lipozym TL IM ve Lipozym RM IM enzimleri ile ön denemeler yapılarak bunlardan en yüksek verime sahip olan enzim belirlenmiştir.

Ön denemeler 45°C sıcaklık, 9 saat inkübasyon süresi, 400 rpm karıştırma hızı, ağırlıkça %3 su miktarı ve yine ağırlıkça %10 enzim miktarı ile gerçekleştirilmiştir. Ön deneme sonucunda EPA ve DHA'nın fındık yağının yapısına inkorporasyon oranları Tablo 4.3'te gösterilmektedir.

Tablo 4.3. EPA ve DHA'nın farklı lipaz enzimleriyle ön denemeler yapılarak elde edilen fındık yağına inkorporasyon oranları

Kullanılan Enzim	% EPA	% DHA
Novozyme 435	6.26	13.39
Lipozym RM IM	3.11	7.38
Lipozym TL IM	4.97	5.74

Denemeler sonucunda en yüksek verim elde edilen Novozyme 435 enziminin çalışmada kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürdeki çeşitli çalışmalarda *Candida antarctica* orijinli spesifik olmayan bu enzimin genellikle bitkisel yağların ve tohum yağlarının uzun zincirli *n*-3 çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmesinde kullanılıyor olması da bu bulguyu desteklemektedir (Namal Senanayake ve Shahidi, 1999; Akoh ve Moussata 1998; Akoh ve diğ., 1996).

4.3. Reaksiyon Ürünlerinin Yağ Asidi Kompozisyonları

Kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi teknikleri kullanılarak triaçilgliserol fraksiyonları ayrılan reaksiyon ürünlerinin, AOAC 963.33 no'lu metoda uygun olarak metil esterleri hazırlanmış, ve gaz kromatografisi ile analizlenmiştir. Tablo 3.6'da verilmiş olan Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak geliştirilen deney tasarımına göre elde edilen reaksiyon ürünlerinin yağ asidi kompozisyonları Tablo 4.4'te gösterilmektedir.

Substrat olarak fındık yağı ve menhaden yağı konsantresinin kullanıldığı ve Novozyme 435 enzimi ile katalizlenen asidoliz reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin yağ asidi kompozisyonunun orijinal fındık yağının yağ asidi kompozisyonundan farklı olduğu görülmüştür. Ancak bu farklılık üzerinde dört farklı faktörün (sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat-molar oranı ve su miktarı) etkili olduğu düşünüldüğünden; yorumlanabilmesi için Tepki Yüzey Metodolojisi ve grafikleri kullanılmıştır.

4.4. Farklı Reaksiyon Koşullarının Fındık Yağına PUFA İnkorporasyonuna Etkilerinin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmeleri

İstatistiksel analizlerde STATISTICA 6.0 paket programından yararlanılarak bağımsız değişkenlere karşılık GC'den elde edilen sonuçlar; yani bağımlı değişkenler veya tepkiler için "Varyans Analizi" yapılmıştır.

Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları alınmıştır. Bu değerler Tablo 4.5'te, varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.6'da görülmektedir.

Tablo 4.4. Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak geliştirilen deney tasarımına göre çalışma sonucunda elde edilen 35 reaksiyon ürününün yağ asidi kompozisyonları

Örnek	Yağ asitleri (%)										
	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:0	18:4n3	20:4n3	20:5n3	22:6n3
1	5.13	4.88	1.69	73.42	7.38	-	-	1.00	-	3.37	-
2	4.61	5.02	1.27	61.74	7.42	0.23	0.57	2.00	-	7.05	5.91
3	4.94	2.32	1.81	71.56	7.69	0.21	-	1.19	-	3.53	4.36
4	5.85	3.72	1.78	72.55	6.89	-	-	1.74	-	3.57	-
5	5.03	1.95	1.86	77.10	8.56	-	0.20	0.47	-	1.97	1.31
6	4.86	2.47	1.91	75.20	7.84	-	0.26	0.81	-	2.93	1.82
7	5.10	2.25	1.79	76.57	8.30	-	0.22	0.56	-	2.24	1.38
8	4.91	1.94	1.79	71.69	7.92	0.02	0.29	1.11	0.30	3.77	4.16
9	4.25	0.85	1.76	67.03	7.46	0.14	0.25	1.90	0.56	5.46	8.17
10	5.14	0.71	2.03	69.47	7.34	0.18	-	2.24	-	3.21	7.56
11	5.62	1.30	2.13	82.94	6.03	-	-	-	-	-	-
12	4.57	2.82	1.57	63.43	7.06	0.20	0.44	1.80	0.68	6.10	7.49
13	5.26	0.49	1.94	76.00	8.64	0.08	-	1.06	-	1.67	3.74
14	5.07	0.89	1.98	71.35	8.13	0.15	0.15	1.62	-	2.84	6.25
15	5.03	1.37	1.89	77.75	8.47	0.04	0.19	0.48	-	1.87	1.72
16	4.86	2.02	1.75	68.83	8.30	0.15	0.35	1.45	0.43	4.45	5.18
17	5.05	0.54	1.84	75.27	7.73	0.09	0.09	1.30	-	2.60	4.16
18	4.71	0.70	1.75	66.94	7.86	0.21	0.15	2.37	-	4.48	8.44
19	4.76	0.37	1.94	71.58	8.01	-	-	1.74	-	3.46	6.29
20	4.86	2.15	1.71	69.51	8.00	0.12	0.31	1.32	0.37	4.42	4.81
21	4.44	0.79	1.74	63.27	7.34	0.26	0.18	2.74	0.49	5.49	11.35
22	4.76	0.41	1.93	73.65	8.19	0.13	0.11	1.41	-	2.78	5.55
23	5.07	2.95	1.85	68.74	8.02	0.10	0.39	1.31	0.37	4.49	4.43
24	4.88	3.11	1.60	66.06	7.73	0.15	0.46	1.45	0.58	5.21	5.60
25	4.91	0.61	1.94	73.77	7.15	0.14	0.20	1.83	-	3.30	4.87
26	4.90	0.46	1.87	76.17	8.47	-	-	0.99	-	2.44	3.55
27	4.90	0.49	1.74	73.00	8.16	0.13	0.14	1.40	0.27	3.35	5.03
28	5.29	0.26	2.10	82.43	9.78	-	-	0.15	-	-	-
29	4.81	0.42	1.77	73.28	8.81	0.12	0.13	1.38	0.22	3.07	4.85
30	4.55	6.00	1.36	52.10	6.45	0.32	0.74	2.96	1.16	9.88	11.65
31	5.02	2.39	1.86	72.52	8.28	0.10	0.33	1.01	0.28	3.35	3.98
32	4.88	3.13	1.72	68.33	7.82	0.14	0.41	1.45	0.48	4.96	5.36
33	4.77	0.48	1.89	70.50	8.42	0.16	0.14	1.84	-	3.99	6.70
34	5.03	0.75	1.86	68.11	8.61	0.19	0.08	2.14	-	4.88	7.19
35	4.65	0.43	1.83	75.20	8.18	0.09	0.12	1.23	-	2.97	4.38

Tablo 4.5. Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları

	Etki	Standart hata	t değeri	p değeri	-95,% güven limiti	+95,% güven limiti	Katsayı
Ortalama/Intersept	10,8413	1,3378	8,1041	0,0000	8,0508	13,6318	10,8413
Sıcaklık (L)	3,2323	1,4281	2,2633	0,0349 ^a	0,2532	6,2114	1,6162
Sıcaklık (Q)	-2,4331	1,3449	-1,8091	0,0855	-5,2386	0,3724	-1,2166
Süre (L)	0,2154	1,4282	0,1508	0,8816	-2,7637	3,1944	0,1077
Süre (Q)	-3,8343	1,3450	-2,8509	0,0099 ^b	-6,6398	-1,0288	-1,9171
Mol oranı (L)	-4,1700	1,4282	-2,9199	0,0085 ^b	-7,1491	-1,1909	-2,0850
Mol oranı (Q)	1,4885	1,3450	1,1060	0,2819	-1,3180	4,2930	0,7437
Su miktarı (L)	1,0962	1,4282	0,7675	0,4517	-1,8829	4,0752	0,5481
Su miktarı (Q)	-1,6089	1,3450	-1,1963	0,2456	-4,4145	1,1965	-0,8045
Sıcaklık*Süre	0,9675	1,8205	0,5314	0,6010	-2,8301	4,7651	0,4838
Sıcaklık*Mol oranı	-0,0625	1,8205	-0,0343	0,9730	-3,8601	3,7351	-0,0312
Sıcaklık*Su miktarı	1,1750	1,8205	0,6454	0,5260	-2,6226	4,9726	0,5875
Süre*Mol oranı	2,2400	1,8205	1,2304	0,2328	-1,5576	6,0376	1,1200
Süre*Su miktarı	-1,3425	1,8205	-0,7374	0,4694	-5,1401	2,4551	-0,6713
Mol oranı*Su miktarı	-0,2575	1,8205	-0,1414	0,8889	-4,0551	3,5401	-0,1288

^a : p<0.05 düzeyinde anlamlı

^b : p<0.01 düzeyinde anlamlı

L: Lineer

Q: Kuadratik

Oluşturulan modele en iyi uyan kuadratik denklem aşağıda verilmiştir. Bu denklemde “T” sıcaklığı, “t” reaksiyon süresini, “m” substrat-molar oranını, “s” ise su miktarını ifade etmektedir.

$$\begin{aligned} \%PUFA \text{ inkorporasyonu} = & 10,841 + 1,616*T - 1,217*T^2 + 0,108*t - 1,917*t^2 - \\ & 2,085*m + 0,744*m^2 + 0,548*s - 0,805*s^2 + 0,484*T*t - \\ & -0,031*T*m + 0,588*T*s + 1,120*t*m - 0,671*t*s - \\ & 0,129*m*s \end{aligned}$$

Varyans analizinin sonuçları incelendiğinde, sıcaklığın lineer etkisi p<0.05 düzeyinde, sürenin kuadratik etkisi ve mol oranının lineer etkisi p<0.01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Buna karşılık, sıcaklığın kuadratik etkisinin, sürenin lineer etkisinin, substrat-molar oranının kuadratik etkisinin, su miktarının lineer ve kuadratik etkisinin ve faktörlerin interaksiyonunun istatistiksel açıdan önemli olmadığı görülmüştür.

Tablo 4.6. Varyans analizi sonuçları

<i>Faktör</i>	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	p değeri
Sıcaklık (L)	67,9108	1	67,9108	5,1225	0,0349 ^a
Sıcaklık (Q)	43,3874	1	43,3874	3,2727	0,0855
Süre (L)	0,3015	1	0,3015	0,0227	0,8816
Süre (Q)	107,7483	1	107,7483	8,1274	0,0099 ^b
Mol oranı (L)	113,0279	1	113,0279	8,5256	0,0085 ^b
Mol oranı (Q)	16,2163	1	16,2163	1,2232	0,2819
Su miktarı (L)	7,8101	1	7,8101	0,5891	0,4517
Su miktarı (Q)	18,9734	1	18,9734	1,4312	0,2456
Sıcaklık*Süre	3,7442	1	3,7442	0,2824	0,6010
Sıcaklık*Mol oranı	0,0156	1	0,0156	0,0012	0,9730
Sıcaklık*Su miktarı	5,5225	1	5,5225	0,4166	0,5260
Süre*Mol oranı	20,0704	1	20,0704	1,5139	0,2328
Süre*Su miktarı	7,2092	1	7,2092	0,5438	0,4694
Mol oranı*Su miktarı	0,2652	1	0,2652	0,0200	0,8889
Hata	265,1481	20	13,2574		
Σ Kareler top.	673,3015	34			

^a: p<0.05 düzeyinde anlamlı

^b: p<0.01 düzeyinde anlamlı

L: Lineer

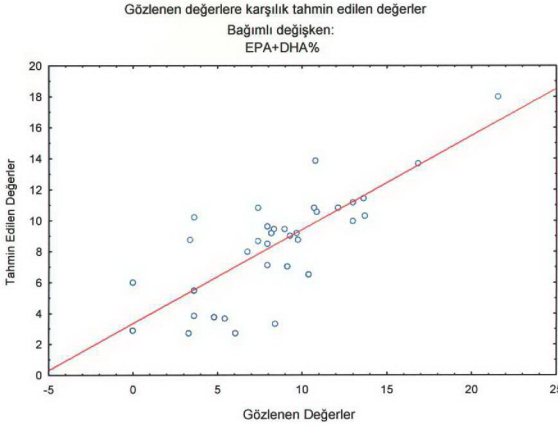
Q: Kuadratik

Oluşturulan tepki-yüzey modelinde, sıcaklık, süre, substrat-molar oranı ve su miktarı olmak üzere 4 farklı bağımsız değişken için gözlenen minimum ve maksimum değerler ile kritik değerler Tablo 4.7'de görülmektedir.

Tablo 4.7. Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri

	Gözlenen minimum değer	Kritik değer	Gözlenen maksimum değer
Sıcaklık	32,50	53,66	62,50
Süre	0,00	43,22	72,00
Substrat-Molar oranı	1,00	4,15	5,00
Su miktarı	0,00	3,57	6,00

Bağımlı değişken için elde edilen modelden yararlanılarak, gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişkiyi gösteren grafik ise Şekil 4.1'de verilmektedir.



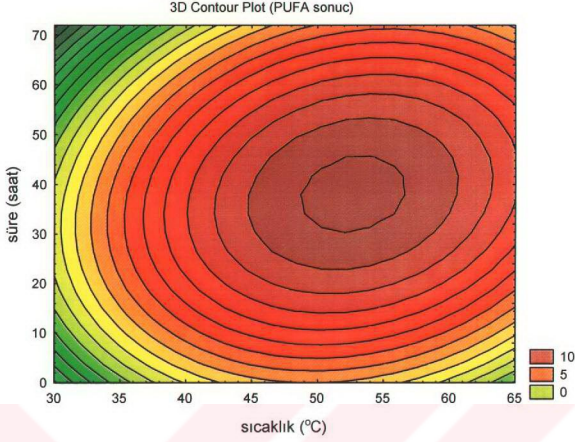
Şekil 4.1. Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişkiyi gösteren grafik

Faktörlerin Tepki Yüzey Metodolojisinde elde edilen model denkleminde yerine konmasıyla elde edilen yüzde inkorporasyon oranıyla (tahminlenen değer), deney sonucunda elde edilen veriler (gözlenen değerler) arasındaki ilişki büyük oranda lineerlik göstermektedir. Bu durum, oluşturulan modelin reaksiyon parametreleri arasındaki gerçek ilişkileri gösterdiğini ortaya koymaktadır.

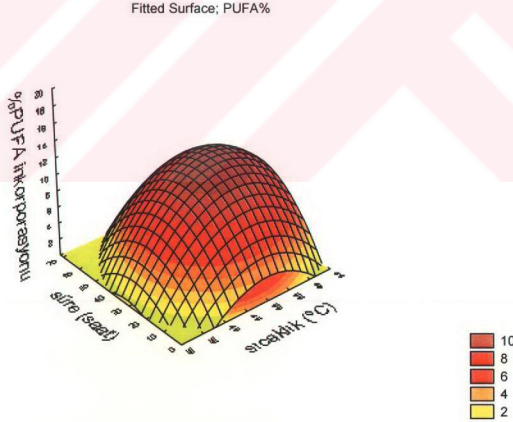
4.5. Sonuçların Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafikleri ile Yorumlanması

Fındık yağına inkorpore edilen toplam EPA ve DHA; yani PUFA yüzdesinin sıcaklık ve süreye göre değişimini gösteren izdüşüm (Contour Plot) ve tepki yüzey (Response Surface) grafikleri Şekil 4.2.a'da ve Şekil 4.2.b'dedir.

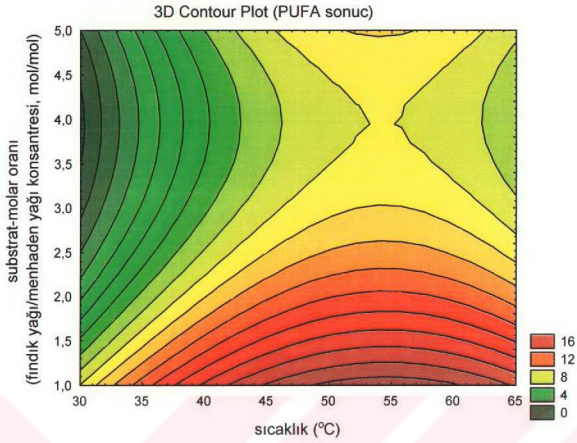
Sıcaklık ve sürenin %PUFA inkorporasyonu üzerine etkileşimlerinden "maksimum tepki (maximum response)" olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir (Montgomery, 1997). Sıcaklık ve reaksiyon süresi, orta noktadan uzaklaştıkça; PUFA inkorporasyonu düşmekte ve inkorporasyon oranındaki düşüş orta noktadan uzaklaştıkça hızlanmaktadır. Fındık yağına *n*-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin yüzde inkorporasyonunun 45-60°C sıcaklık aralığı ve 24-52 saat süre aralığında yüksek olduğu görülmüştür.



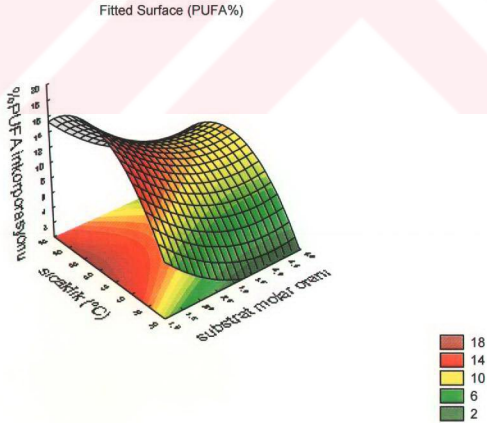
Şekil 4.2.a. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.2.b. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği



Şekil 4.3.a. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun substrat-molar oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.3.b. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun substrat-molar oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği

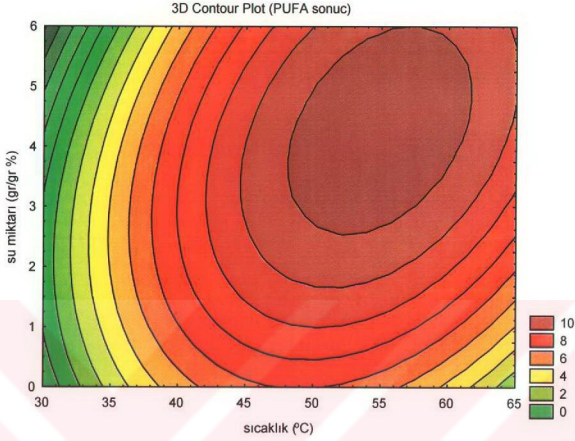
Fındık yağına % PUFA inkorporasyonunun substrat-molar oranı ve sıcaklığa göre değişimini gösteren izdüşüm ve tepki yüzey grafikleri Şekil 4.3.a' da ve Şekil 4.3.b' dendir. PUFA inkorporasyonuna sıcaklık ve substrat-molar oranının etkileşimleri sonucunda literatürde "sırt noktası (saddle point response)" olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir (Montgomery, 1997). Bu etkileşimler birlikte incelendiğinde; substrat-molar oranının 3-5 olduğu aralıkta gerçekleştirilen reaksiyonlarda, orta noktadan uzaklaştıkça inkorporasyon azalmaktadır. Özellikle düşük substrat-molar oranlarında (<1.5), inkorporasyon sıcaklıktan fazla etkilenmeksizin yüksek değerdedir ve değişim hızı yüksektir.

Fındık yağına % PUFA inkorporasyonunun su miktarı ve sıcaklığa göre değişimini gösteren izdüşüm ve tepki yüzey grafikleri Şekil 4.4.a' da ve Şekil 4.4.b' de verilmiştir. Su miktarı ve sıcaklığın %PUFA inkorporasyonu üzerine etkileşimlerinden "maksimum tepki" olarak nitelendirilen izdüşüm grafiği elde edilmiştir (Montgomery, 1997). Bu etkileşimler göz önünde bulundurulduğunda, hem sıcaklık hem de su miktarı orta noktadan uzaklaştıkça yüzde inkorporasyon oranı azalmaktadır. İnkorporasyon oranındaki azalma hızı orta noktadan uzaklaştıkça artmaktadır.

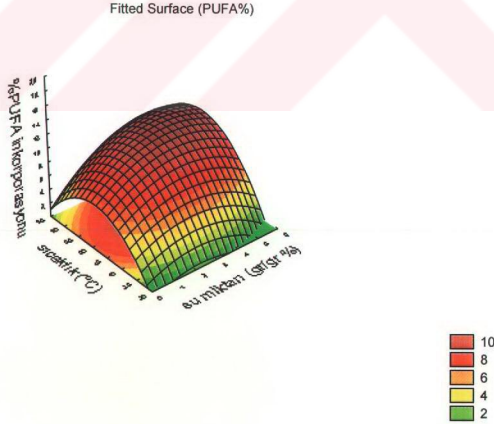
Fındık yağına % PUFA inkorporasyonunun süre ve substrat-molar oranına göre değişimini gösteren tepki yüzey ve izdüşüm grafikleri Şekil 4.5.a' da ve Şekil 4.5.b' de verilmiştir. Fındık yağına PUFA inkorporasyonuna süre ve substrat-molar oranının etkileşimleri sonucunda literatürde "sırt noktası" olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir (Montgomery, 1997). Çalışmada gözlenen değerler aralığında, düşük substrat-molar oranlarında (<2.5 mol/mol) süreden fazla etkilenmeksizin yüzde inkorporasyon oranının yüksek olduğu söylenebilir. Süre orta noktadan uzaklaştıkça inkorporasyon yüzdesi düşmektedir. Kısa reaksiyon sürelerinde ise, substrat-molar oranı arttıkça, inkorporasyon yüzdesi azalmaktadır.

Fındık yağına % PUFA inkorporasyonunun süre ve su miktarına göre değişimini gösteren tepki yüzey ve izdüşüm grafikleri Şekil 4.6.a' da ve Şekil 4.6.b' dendir. Reaksiyon süresi ve su miktarının %PUFA inkorporasyonu üzerine etkileşimlerinden "maksimum tepki" olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir (Montgomery, 1997). Süre ve su miktarının etkisi beraber incelendiğinde, orta noktadan uzaklaştıkça PUFA' nin inkorporasyon yüzdesi azalmaktadır.

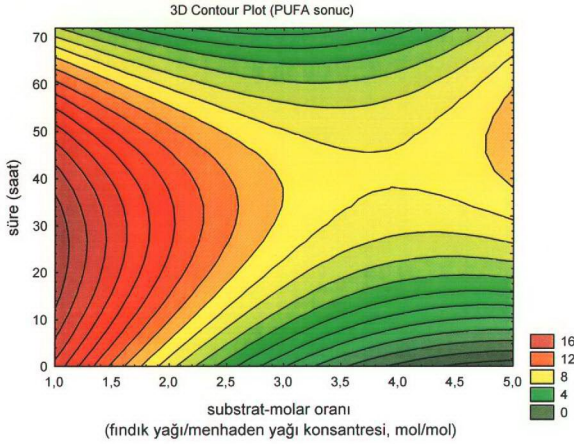
İnkorporasyon oranındaki azalma, orta noktadan uzaklaştıkça hızlanmaktadır. Süre ve su miktarı arasındaki ilişkiyi gösteren grafikte, oldukça geniş bir aralıkta yüksek inkorporasyon yüzdelerine ulaşıldığı görülmüştür.



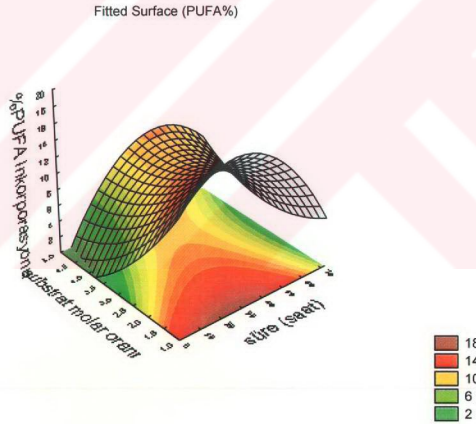
Şekil 4.4.a. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun su miktarı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.4.b. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun su miktarı ve sıcaklık ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği



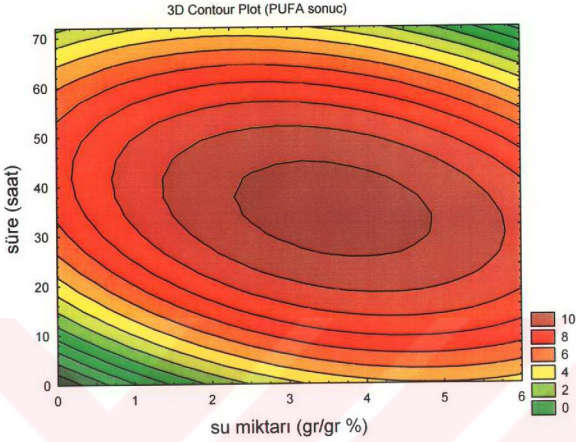
Şekil 4.5.a. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun süre ve substrat molar oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



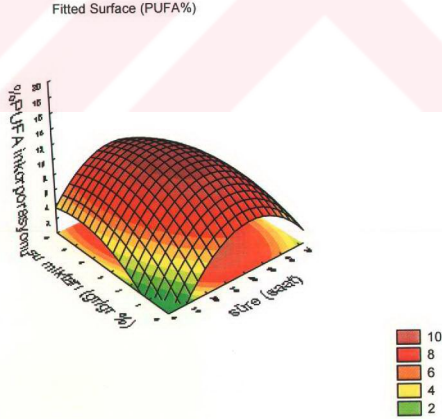
Şekil 4.5.b. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun süre ve substrat-molar oranı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği

Fındık yağına inkorpore edilen PUFA miktarının su miktarı ve substrat-molar oranına göre değişimini gösteren tepki yüzey ve izdüşüm grafikleri Şekil 4.7.a' da ve Şekil 4.7.b' dedir. PUFA inkorporasyonuna su miktarı ve substrat-molar oranının etkileşimleri sonucunda literatürde "sırt noktası" olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir (Montgomery, 1997). İnkorporasyonun su miktarı ve substrat-molar

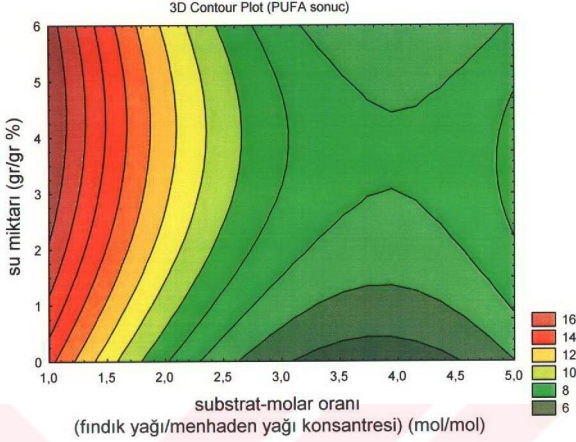
oranına göre değişiminin incelendiği grafikte, substrat-molar oranı 1,5 mol/mol'un altında iken, inkorporasyon yüzdesi su miktarından fazla etkilenmeksizin yüksek değerlere ulaşmıştır.



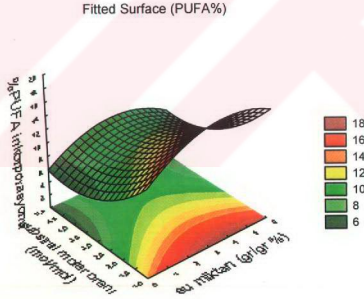
Şekil 4.6.a. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun süre ve su miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.6.b. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun süre ve su miktarı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği



Şekil 4.7.a. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun su miktarı ve substrat-molar oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.7.b. Fındık yağına %PUFA inkorporasyonunun su miktarı ve substrat-molar oranı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği

Sonuçların genel olarak yorumlanmasında, substrat-molar oranının düşük olduğu koşullarda sıcaklıktan, süreden ve su miktarından fazla etkilenmeksizin yüzde inkorporasyon oranının yüksek olduğu söylenilebilir. Gözlenen değer aralığı söz konusu olmak kaydıyla, sıcaklığın süre ve su miktarı ile olan ilişkisinde orta nokta yakınında inkorporasyon oranı görece olarak yüksek değerlerdedir.

Bu çalışmada, literatür verilerine dayanarak reaksiyon verimini etkileyen faktörler, sıcaklık süre, substrat-molar oranı ve su miktarı olarak seçilmiştir. Tablo 4.6'daki sonuçlar da göz önünde bulundurulduğunda, özellikle sıcaklık ve sürenin PUFA inkorporasyonu üzerinde istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmüştür, bununla birlikte her enzim için çalışma ortamındaki optimum sıcaklık değişebileceğinden, deneysel olarak belirlenmelidir.

Çalışmada, genel olarak sıcaklığın artması PUFA inkorporasyonunu arttırmış, ancak ulaşılan optimum noktadan daha yüksek sıcaklıklarda inkorporasyon yüzdesi azalmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve enzimatik reaksiyonlarda, optimum bir hıza ulaşına kadar, ortam ısındıkça enzim aktivitesinin arttığı ve sıcaklıktaki artışın açıl migrasyonunu hızlandırdığını belirtilmiştir (Mu ve diğ.,1998; Xu ve diğ. 1998). Enzim aktivitesinin sıcaklıkla değişim nedenine ilişkin literatürde farklı yorumlar bulunmaktadır. Wanasundara ve Shahidi (1999), bu durumu enzimi üç boyutlu şekilde tutan hidrojen bağlarının ve diğer zayıf çekim kuvvetlerinin, çevredeki sıcaklık değişimlerine hassas olmalarıyla açıklar. Sıcaklığın artmasıyla inkorporasyon yüzdesindeki artışın nedeni olarak, sıcaklıkla ilişkili olarak substratın viskozitesinin düşmesiyle beraber substrat ve enzim arasındaki temasın gelişmesi gösterilmektedir (Mu ve diğ.,1998; Xu ve diğ., 1998). Ancak, 60°C' gibi ulaşılan optimum noktadan yüksek sıcaklıklarda, reaksiyon hızının artmayıp, hatta bir miktar azalması da, çoklu doymamış yağ asitlerinin ısı bozunmaya uğraması ve ayrıca, çok yüksek sıcaklıklarda lipaz enzimin geri dönüşsüz olarak denature olacağı şeklinde açıklanabilir.

Yağların enzimatik modifikasyon reaksiyonlarında sürenin etkisinin bilinmesi, hem reaksiyonun gelişiminin incelenmesi, hem de yüksek verim elde edilen en kısa sürenin belirlenerek proses için üretim maliyetinin düşürülmesi açısından önemlidir. (Senanayake ve Shahidi 1999; Akoh ve Moussata 1998).

Bu çalışmada 30-40 saatlik reaksiyon sürelerinin yeterli olduğu görülmüştür. Bununla birlikte, literatürde optimum reaksiyon süresinin kullanılan enzim ve substrat miktarı ve cinsi gibi pek çok faktörden etkilenerek, farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Boraj yağının yapısına DHA'nın *Candida antarctica* lipazı varlığında inkorpore edildiği çalışmada, 24 saatten sonra bir değişim gözlenmezken, yine *Candida antarctica* lipazı varlığında boraj yağına EPA ve kaprik asitin inkorpore edildiği çalışmada 40 saat optimum reaksiyon süresi olarak gösterilmiştir (Namal Senanayake ve Shahidi, 1999; Akoh ve Moussata 1998).

Yağların enzimatik yöntemlerle modifiye edilerek triaçilgliserol yapılarına esansiyel yağ asitlerinin ilave edildikleri reaksiyonlarda, son üründe istenen esansiyel yağ asidi miktarına göre substratların; yani orijinal yağ ve inkorpore edilecek esansiyel yağ asidinin molar oranının ayarlanması mümkün olmaktadır.

Bu çalışmada genel olarak, substrat-molar oranının (findık yağı/menhaden yağı konsantrisi) düşük olduğu koşullarda, yani *n-3* çoklu doymamış yağ asitlerinin mol miktarlarının yüksek olduğu durumlarda diğer faktörlerden fazla etkileneksizin yüzde inkorporasyon oranının yüksek olduğu söylenebilmektedir.

Çalışma sonuçlarımıza benzer olarak Namal Senanayake ve Shahidi (1999), substrat olarak boraj yağı ve DHA, Akoh ve Moussata (1998), boraj yağı ve EPA, yine Akoh ve diğ. (1996), çuhaçiçeği yağı ve EPA kullandıkları çalışmada benzer bir sonuca ulaşarak; *n-3* çoklu doymamış yağ asidi mol sayısı arttıkça inkorporasyon oranının arttığını bildirmişlerdir.

Mu ve diğ. (1998), yağ ve yağ asidi arasındaki molar oranın inkorporasyon ve açıl migrasyonuna etkisini inceledikleri çalışmada, yağ asidinin mol miktarının arttıkça inkorporasyonun da arttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, yüksek bir molar oran seçilerek reaksiyon hızının artırılacağı ve süre kılacağı için açıl migrasyonunun da azaltılabileceği önerilmiştir.

Ancak Jennings ve Akoh (2000), inkorpore edilecek olan yağ asidinin aşırı miktarda kullanılmasının maliyeti artırmanın yanısıra, lipaz inhibisyonuna neden olabileceğini ve modifikasyon reaksiyonu endüstriyel ölçekte gerçekleştirildiğinde ortamdaki fazla yağ asidinin uzaklaştırılması işleminin ürün veriminin de azalmasına neden olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Lipazla katalizlenen reaksiyonlar tersinir reaksiyonlardır; yani hem hidroliz hem de esterifikasyon gerçekleşmektedir. Hidrolizde su tepkimeye girerken, esterifikasyonda bir ürün olmaktadır. Bu yüzden karışımdaki su miktarı reaksiyonun hangi yönde gelişeceğini (reaksiyonun dengesini) etkilemektedir. Ayrıca enzimatik reaksiyonlarda enzimin üç boyutlu yapısının korunması için suyun ortamda mevcut olması gerekmektedir; ancak fazla miktarda suyun sentez yerine hidrolize yol açarak ürün verimini düşüreceği de göz önünde bulundurulması gereken önemli bir faktördür.

Candida antarctica lipazı kullanılarak bitkisel yağlara ve tohum yağlarına *n*-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin inkorpore edildikleri çalışmalarda fazla miktarda suyun inkorporasyon oranını düşürdüğü bildirilmiştir. Enzimatik reaksiyonun başlangıç aşamalarında eklenen suyun reaksiyon hızını artırdığı ve süreyi kısalttığı; ancak daha ilerleyen aşamalarda diasilgliserol oluşumundaki artışının, triasilgliserollerin oluşumuna izin vermediği de belirtilmiştir (Akoh ve Moussata, 1998; Huang ve Akoh, 1994). Ayrıca Xu ve diğ. (1998), yaptıkları bir çalışmada fazla miktarda suyun enzim aktivitesi ve stabilitesi üzerinde olumsuz etkilerinin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, fındık yağına uzun zincirli *n*-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin yüzde inkorporasyonun oranına sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat-molar oranı ve su miktarı gibi faktörlerin etkileri incelenmiştir. Tüm deney setlerinden elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda, %21.53 ile en yüksek inkorporasyon oranının elde edildiği koşulların, 47.5°C sıcaklık, 36 saat reaksiyon süresi, 1:1 substrat-molar oranı ve ağırlıkça %3 (gr/gr) su miktarı olduğu görülmüştür.

Faktörlerin etkileşimleri gösteren tepki yüzey grafikleri değerlendirildiğinde, optimum sıcaklık aralığının 45-60°C, reaksiyon süresi aralığının 30-40 saat, substrat-molar oranı aralığının (fındık yağı/menhaden yağı konsantresi, mol/mol) 1:1-2:1, su miktarı aralığının ise %3-5 (gr/gr) olduğu söylenebilir.

5. SONUÇ

Ülkemiz, fındık üretiminde dünya ülkeleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Ulusal ekonomimize büyük katkısı bulunan fındık ve fındık yağı, aynı zamanda esansiyel yağ asitleri ve fitosteroller, mineraller, vitaminler, vb. gibi bazı bileşenler açısından zengin olması bakımından sağlık açısından faydalı bir üründür.

Son yıllarda yapılan klinik çalışmalarda uzun zincirli omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin diyetle alındığında kardiyovasküler hastalıklar, kanser, yüksek tansiyon, şeker hastalığı ve depresyon üzerinde etkili olduğu ispatlanmış bulunmaktadır.

Bu çalışmada, geleneksel bir ürünümüz olan fındık yağının lipaz enzimi kullanılarak n-3 çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmesi ve sağlık açısından daha faydalı fonksiyonel bir ürün haline getirilmesi ve zenginleştirmede çeşitli reaksiyon parametrelerinin etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada substrat olarak yerel marketlerden temin edilen fındık yağı ve üre fraksiyonlama metodu ile elde olunan menhaden yağı konsantresi kullanılmış ve asidoliz reaksiyonu Novozyme 435 enzimi varlığında gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen reaksiyon ürünlerine kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi uygulanarak triaçilgliserol fraksiyonları ayrılmış ve bu fraksiyonlar yağ asidi metil esterlerine dönüştürülerek yağ asidi kompozisyonları gaz kromatografisi ile analizlenmiştir. Sonuç olarak ürünlerin yağ asidi kompozisyonunun orijinal fındık yağının yağ asidi kompozisyonundan farklı olduğu görülmüştür.

Fındık yağı ve menhaden yağı konsantresinin lipaz enzimi ile katalizlenmiş asidoliz reaksiyonunda, genel olarak, substrat-molar oranının düşük olduğu koşullarda sıcaklık, reaksiyon süresi ve su miktarından bağımsız olarak yüzde inkorporasyon oranının yüksek olduğu söylenebilmektedir. Gözlenen değer aralığı söz konusu olmak kaydıyla, sıcaklığın süre ve su miktarı ile olan ilişkisinde orta nokta yakınında inkorporasyon oranının göreceli olarak yüksek değerlerde olduğu görülmüştür.

Tüm deney setlerinden elde edilen veriler göz önünde bulundurulduğunda, %21.53 ile en yüksek inkorporasyon oranının elde edildiği koşulların, 47.5oC sıcaklık, 36

saat reaksiyon süresi, 1:1 substrat-molar oranı ve ağırlıkça %3 (gr/gr) su miktarı olduğu görülmüştür.

Fındık yağına uzun zincirli n-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin yüzde inkorporasyonun oranına sıcaklık, reaksiyon süresi, substrat-molar oranı ve su miktarı gibi faktörlerin etkilerini gösteren tepki yüzey grafikleri değerlendirildiğinde, optimum sıcaklık aralığının 45-60°C, reaksiyon süresi aralığının 30-40 saat, substrat-molar oranı aralığının (fındık yağı/menhaden yağı konsantresi, mol/mol) 1:1-2:1, su miktarı aralığının ise %3-5 (gr/gr) olduğu söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Akoh, C.C.**, 2002. Structured Lipids, in *Food Lipids*, pp. 877-908, Eds. Akoh, C.C.
- Akoh, C.C. and Moussata, C.O.**, 2001. Characterization and oxidative stability of enzymatically produced fish and canola oil-based structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 (1), 25-30.
- Akoh, C.C. and Moussata, C.O.**, 1998. Lipase-catalysed modification of borage oil: incorporation of capric acid and eicosapentaenoic acids to form structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (6), 697-701.
- Akoh, C.C., Jennings, B.H. and Lillard, D.A.**, 1996. Enzymatic modification of evening primrose oil: incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73 (8), 1059-1062.
- AOAC**, 1990. Fatty Acids in Oils and Fats, Preparation of Methyl Esters in Boron Trifluoride Method: Method 969.33, Ch. 40, in *Official Methods of Analysis*, pp. 963-964, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA.
- Cerdán, L.E., Medina, A.R., Gimenez, A.G., Gonzalez, M.J.I., and Grima, E.M.**, 1998. Synthesis of polyunsaturated fatty acid-enriched triglycerides by lipase-catalyzed esterification, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (10), 1329-1337.
- Bell, S.J., Dondeena, B., Forse, R.A., and Bistrrian, B.R.**, 1997. The new dietary fats in health and disease, *Journal of the American Dietetic Association*, 97 (3), 280-286.
- Diks, R.M.M., and Bosley, J.A.**, 2000. The Exploitation of Lipase Selectivities for the Production of Acylglycerols, in *Enzymes in Lipid Modification*, pp. 3-22, Ed. Bornscheuer, U.T. Wiley-VCH, Weinheim.
- Dziezak, J.D.** 1990. Taking the Gamble out of Product Development. *Food Technology*. 44(6) 109-110, 112-117.
- García, H.S., Arcos, J.A., Ward, D.J. and Hill, C.G. Jr**, 2000. Synthesis of lipids containing n-3 fatty acids and conjugated linoleic acid by solvent-free acidolysis of fish oil, *Biotechnology and Bioengineering*, 70 (5), 587-591.
- Gunstone, F.D.**, 2002. Food Applications of Lipids, in *Food Lipids*, pp. 729-750, Eds. Akoh, C.C. and Min, D.B. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Gunstone, F.D.**, 2001a. Why Are Structured Lipids and New Lipid Sources Required, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 1-9, Ed. Gunstone, F.D. Marcel Dekker, Inc., New York.

- Gunstone, F.D.**, 2001b. Procedures Used for Lipid Modification, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 11-36, Ed. Gunstone, F.D. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Hills, M.J., Kiewitt, I. and Mukherjee, K.D.**, 1990. Enzymatic fractionation of fatty acids: Enrichment of γ -linolenic acid and docosahexaenoic acid by selective esterification catalysed by lipases, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67 (9), 561-563.
- Høy, C.E., and Xu, X.**, 2001. Structured Triacylglycerols, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 209-239, Ed. Gunstone, F.D. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Huang, K., and Akoh C.C.**, 1994. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71 (11), 1277-1280.
- Jennings, B.H. and Akoh, C.C.**, 2001. Lipase catalyzed modification of fish oil to incorporate capric acid, *Food Chemistry*, 72 (2001), 273-278.
- Jennings, B.H., and Akoh, C.C.**, 2000. Lipase-catalysed modification of rice bran oil to incorporate capric acid, *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 48 (9), 4439-4443.
- Jennings, B.H., and Akoh, C.C.**, 2000. Lipase-catalysed modification of sesame oil to incorporate capric acid, *Journal of Food Lipids*, 7 (1), 21-30.
- Jennings, B.H., and Akoh, C.C.**, 1999. Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (10), 1133-1137.
- Kuan-Hsiang-Huang, and Akoh, C.C.**, 1994. Lipase-catalyzed incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into vegetable oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71 (11), 1277-1280.
- Kuan-Hsiang-Huang, Akoh, C.C., and Erickson, M.C.**, 1994. Enzymatic modification of melon seed oil: incorporation of eicosapentaenoic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (11), 2646-2648.
- Lipp, M. and Anklam, E.**, 1998. Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate – Part A. Compositional data, *Food Chemistry*, 62 (1), 73-97.
- Maehr, H., Gladys, Z. and Coffen, D.L.**, 1994. Enzymic enrichment of n-3 fatty acid content in fish oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71 (5), 463-467.
- McNeill, G.P., Ackman, R. and Moore, S.R.**, 1996. Lipase-catalyzed enrichment of long-chain polyunsaturated fatty acids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73 (11), 1403-1407.
- Montgomery, D.C.**, 1997. Design and Analysis of Experiments. 4th Edition. John Wiley & Sons, New York.

- Mukherjee, K.D. and Kiewitt, I.**, 1996. Enrichment of very-long-chain mono-unsaturated fatty acids by lipase-catalysed hydrolysis and transesterification, *Applied Microbiological Biotechnology*, (1996) 44: 557-562.
- Mu, H., Xu, X.,^{*} and Høy, C.E.**, 1998. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor, *Applied Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (9): 1187-1193.
- Namal Senanayake, S.P.J. and Shahidi, F.**, 2002. Positional distribution of fatty acids in triacylglycerols of enzymatically modified borage and evening primrose oils, *Lipids*, 37 (8), 803-810.
- Namal Senanayake, S.P.J. and Shahidi, F.**, 1999. Enzymatic incorporation of docosahexaenoic acid into borage oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (9), 1009-1015.
- Osborn, H.T., and Akoh, C.C.** 2002. Structured lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol 3, 2002, 93-103.
- Osório, N.M., Ferreira-Dias, S., Gusmão, J.H. and da Fonseca, N.M.R.**, 2001. Response surface modelling of the production of ω -3 polyunsaturated fatty acids-enriched fats by a commercial immobilized lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11 (2001), 677-686.
- Özocak, A.**, 2003. Çikolatalarda Kakao Yağı İkamelerinin Tesbiti. *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Özcelik, B., ve Karaali, A.** 2002. Omega-3 yağ asitleri ve sağlığımız, *Gıda* 2000, 2002 (1), 34-38.
- Paez, B.C., Medina, A.R., Rubio, F.C., Moreno, P.G. and Grima, E.M.**, 2002. Production of structured triglycerides rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a packed-bed reactor: equilibrium and kinetics, *Chemical Engineering Science*, 57 (2002), 1237-1249.
- Puiggros, C., Chacon, P., Armadans, L.I., Clapes, J., and Planas, M.**, 2002. Effects of oleic-rich and omega-3-rich diets on serum lipid pattern and lipid oxidation in mildly hypercholesterolemic patients, *Clinical Nutrition*, 21 (1), 79-87.
- Rakshit, S.K., Vasuhi, R. and Kosugi, Y.**, 2000. Enrichment of polyunsaturated fatty acids from tuna oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens* lipase, *Bioprocess Engineering*, 23 (2000), 251-255.
- Shimada, Y., Suenaga, M., Sugihara, A., Nakai, S. and Tominaga, Y.**, 1999. Continuous production of structured lipid containing γ -linolenic and caprylic acids by immobilized *Rhizopus delemar* lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76 (2), 189-193.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Yokota, T., Nagao, T., Komemushi, S. and Tominaga, Y.**, 1996. Production of structured lipids containing essential fatty acids by immobilized *Rhizopus delemar* lipase, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73 (11), 1415-1420.

- Thompson, D.**, 1982. Response Surface Experimentation. *Journal of Food Processing and Preservation*, (6), 155-188.
- Wanasundara, U.N., and Shahidi, F.**, 1999. Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions, *Food Chemistry*, 65 (1999), 41-49.
- Willis, W.M., and Marangoni, A.G.**, 2002. Enzymatic Interesterification, in *Food Lipids*, pp. 839-875, Eds. Akoh, C.C. ve Min, D.B. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Willis, W. M., Lencki, K.W., and Marangoni, A.G.**, 1998. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (8), 639-674.
- Xu, X., Skands, A.R.H., Hoy, C.E., Mu, H., Balchen, S., and Nissen, J.A.**, 1998. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: elucidation of acyl migration by response surface design, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (9), 1179-1186.
- Xu, X., Fumoso, L.B. and Akoh, C.C.**, 2000. Modification of menhaden oil by enzymatic acidolysis to produce structured lipids: optimization by response surface design in a packed bed reactor, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77 (2), 171-176.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Malkara’da doğdu. 1998 yılında Ümraniye Anadolu Lisesi’nden mezun oldu. 1998-2002 yılları arasında İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümünde lisans eğitimini tamamlayarak 2002 yılında aynı bölümde yüksek lisans eğitimine başladı. 2002 yılından itibaren aynı bölümde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

