

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MORİNA KARACİĞER YAĞINDAN ENZİMATİK
HİDROLİZ İLE DHA’NIN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ
ÜZERİNDE pH VE SICAKLIĞIN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Özlem ŞİRİN**

Anabilim Dalı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

ARALIK 2003

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MORİNA KARACİĞER YAĞINDAN ENZİMATİK
HİDROLİZ İLE DHA’NIN ZENGİNLESTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kim. Müh. Özlem ŞİRİN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 19 Aralık 2003

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR

Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Selma TÜRKEY (İ.T.Ü.)

Doç.Dr. Nezih HEKİM (Pakize Tarzi Lab.)

ARALIK 2003

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, morina balığı karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile enzimatik hidrolizi ve hidroliz sonucu dokosahekzaenoik asidin zenginleştirilmesi üzerinde pH ve sıcaklığın etkisi incelenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam sayın Doç. Dr. Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR'e ve tez çalışmalarından önemli ölçüde faydalandığım bana ışık tutan sayın Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Hem çalışıp hem de yüksek lisansımı tamamlamama izin veren; ayrıca çalışmalarım sırasında laboratuvarlarını kullanmama olanak sağlayan ve beni destekleyen Biofarma İlaç San. Ve Tic. A.Ş.'ye, yüksek lisansımı yoğun çalışma tempomuza rağmen devam ettirmeme izin veren Kalite Güvence Müdürümüz Sn. Dr. Burak DÜRÜS'e ve çalışmalarımızı birlikte yürüttüğümüz arkadaşım Tuba YAŞAR'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden manevi desteğini esirgemeyen Cem S. Kırbaşer'e, hayatım boyunca beni her zaman destekleyen ve daima yanımda olan aileme de sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2003

Özlem ŞİRİN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
KISALTMALAR	V
TABLO LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
ÖZET	IX
SUMMARY	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. TEORİK ÇALIŞMALAR	2
2.1 Dokosahekzaenoik Asit Hakkında Genel Bilgi	2
2.1.1 Dokosahekzaenoik Asidin Besin Değeri ve Sağlık Açısından Önemi	2
2.1.2 Balık ve Balık Yağları Hakkında Bilgi	3
2.1.2.1 Morina Balığı Karaciğer Yağı Hakkında Bilgi	5
2.1.3 DHA İçeren Yağlardan DHA'nın Zenginleştirilmesi Üzerine Yapılmış Çalışmalar	5
2.1.3.1 Üre İle Fraksiyonlama Yöntemi İle DHA'nın Zenginleştirilmesi	6
2.1.3.2 Kromatografik yöntemler ile DHA'nın Zenginleştirilmesi	6
2.1.3.3 Kristalizasyon Ve Distilasyon Yöntemleri İle DHA'nın Zenginleştirilmesi	6
2.1.3.4 Süperkritik CO ₂ Ekstraksiyon Yöntemi ile DHA'nın Zenginleştirilmesi	6
2.1.3.5 Enzimatik Hidroliz ve Esterleştirme yöntemleri İle DHA'nın Zenginleştirilmesi	7
2.2. Lipazlar Hakkında Bilgi	10
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	11
3.1 Kullanılan Hammaddeler ve Cihazlar	11
3.1.1 Morina Balığı Karaciğer Yağının Karakteristik Özellikleri ve Yağ Asitleri Bileşiminin Belirlenmesi	11
3.1.2 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	13
3.1.3 Deneylerde Kullanılan Cihazlar	13

3.2 Çalışma Yöntemi	14
3.2.1 Kullanılan Enzim Aktivitesinin Saptanması	14
3.2.2 Morina Balığı Karaciğer yağının Enzimatik Hidrolizi	14
3.2.2.1 % Hidroliz Değerlerinin Bulunması	15
3.2.3 Hidroliz Ürünü Bileşimlerinin HPLC Cihazı İle Belirlenmesi	15
3.2.4 Hidroliz Ürününün Kolon Kromatografisi İle Fraksiyonlanması ve Her Fraksiyonun Yağ Asitleri Bileşiminin Saptanması	16
3.2.5 Metil Ester Hazırlama	17
3.3 Morina Balığı Karaciğer Yağının <i>Candida rugosa</i> ile Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne Enzim Miktarı ve Sürenin Etkisi	18
3.4 Morina Balığı Karaciğer Yağının <i>Candida rugosa</i> ile Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne pH Etkisi	24
3.5 Morina Balığı Karaciğer Yağının <i>Candida rugosa</i> ile Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne Sıcaklık Etkisi	24
3.6 Morina Balığı Karaciğer Yağının <i>Candida rugosa</i> ile Optimum Koşullarda Enzimatik Olarak Üretilen Hidroliz Ürününün Fraksiyonlarına Ayrılması ve Her Fraksiyonun Yağ Asitleri Bileşiminin Saptanması	34
3.7 Morina Balığı Karaciğer Yağının <i>Candida rugosa</i> ile Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne Çözücü Türü ve Çözücü Oran Etkisi	39
4. SONUÇ VE YORUMLAR	44
KAYNAKLAR	46
EKLER	48
ÖZGEÇMİŞ	85

KISALTMALAR

DHA	: Dokosahekzaenoik Asid
EPA	: Eikosapentaenoik Asid
PUFA	: Çokludoymamış Yağ Asidi
TG	: Trigliserid
DG	: Digliserid
MG	: Monogliserid
YA	: Serbest Yağ Asidi
BF₃	: Bor Tri Florür Metanol Kompleksi
GC	: Gas Chromatography
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
FID	: Flame Ionization Detector
TLC	: Thin Layer Chromatography

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Dünya balık yağı üretimini ülkelere göre dağılımı	3
Tablo 2.2. Bazı balık türlerinin yağ asitleri yüzde bileşimi	4
Tablo 2.3. Bazı önemli çoklu doymamış yağ asitlerinin Formülleri	4
Tablo 2.4. Lipazların endüstriyel kullanım alanları	10
Tablo 3.1. Morina balığı karaciğer yağının bazı karakteristik özellikleri	11
Tablo 3.2. Gaz kromatografisi analiz koşulları	12
Tablo 3.3. Morina balığı karaciğer yağı yağ asitlerinin bileşimi	12
Tablo 3.4. Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanma Prosedürü	13
Tablo 3.5. Metil esteri hazırlanacak madde miktarına karşılık gelen BF ₃ -Metanol kompleksi miktarı.	18
Tablo 3.6. Morina balığı karaciğer yağının E= 400 U/ g _{yağ} , enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	19
Tablo 3.7. Morina balığı karaciğer yağının E= 1000 U/ g _{yağ} , enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	20
Tablo 3.8. Morina balığı karaciğer yağının E= 2000 U/ g _{yağ} , enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	21
Tablo 3.9. Morina balığı karaciğer yağının E= 5000 U/ g _{yağ} , enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	22
Tablo 3.10 % DHA bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	23
Tablo 3.11 Hidroliz reaksiyonlarında % hidroliz değerleri	23
Tablo 3.12 Morina balığı karaciğer yağının pH 3 enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g _{yağ} , 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	25
Tablo 3.13 Morina balığı karaciğer yağının pH 5 enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g _{yağ} , 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	26

Tablo 3.14	Morina balığı karaciğer yağının pH 8 enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g _{yağ} , 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	27
Tablo 3.15	15 Morina balığı karaciğer yağının pH 9 enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g _{yağ} , 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	28
Tablo 3.16	Morina balığı karaciğer yağının 25°C ‘de enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g _{yağ} , pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	30
Tablo 3.17	Morina balığı karaciğer yağının 40°C ‘de enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g _{yağ} , pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	31
Tablo 3.18	Morina balığı karaciğer yağının 50°C ‘de enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g _{yağ} , pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	32
Tablo 3.19	Morina balığı karaciğer yağının 70°C ‘de enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g _{yağ} , pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	33
Tablo 3.20	Hidroliz ürününün bileşenlerinin zamanla değişimi (2000 U/g _{yağ} , pH 5, 35°C, yağ:tampon çözelti 12 g:18 mL)	34
Tablo 3.21	Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 1. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g _{yağ} , 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	35
Tablo 3.22	Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 6. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g _{yağ} , 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	36
Tablo 3.23	Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 12. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g _{yağ} , 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	37
Tablo 3.24	Optimum koşullarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonunun % hidroliz değerleri	38
Tablo 3.25	Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 12. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g _{yağ} , 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:24 mL)	40
Tablo 3.26	Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 12. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g _{yağ} , 35°C, pH 5, su kullanımı)	41
Tablo 3.27	Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 12. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g _{yağ} , 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz:çözücü, 12g:12 mL:24 mL)	42

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 : Bazı yağ asitlerinin yapıları	8
Şekil 3.1 : % DHA bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	23
Şekil 3.2 : % DHA bileşiminin zamanla değişimi üzerinde pH'ın etkisi. (2000 U/g _{yağ} enzim miktarı, 35°C, 12 saat, yağ:tampon çöz. 12 g:18 mL)	29
Şekil 3.3 : % DHA bileşiminin zamanla değişimi üzerinde sıcaklığın etkisi (2000 U/g _{yağ} enzim miktarı, pH 5, 12 saat, yağ:tampon çöz. 12 g:18 mL)	33
Şekil 3.4 :Hidroliz ürün bileşiminin zamanla değişimi (2000 U/g _{yağ} , 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)	38
Şekil 3.5 :Optimum koşullarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonunun % hidrolizi	39
Şekil 3.6 :% DHA bileşiminin zamanla değişimi üzerinde çözücü türü ve çözücü oran etkisi. (2000 U/g _{yağ} enzim miktarı, 35°C)	43

MORİNA BALIĞI KARACİĞER YAĞINDAN ENZİMATİK HİDROLİZ İLE DHA'NIN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ ÜZERİNDE pH VE SICAKLIĞIN ETKİSİ

ÖZET

Dokosaheksaenoik Asit (DHA) uzun zincirli omega-3 çokludoymamış yağ asitlerinden biri olup gıda ve farmasötik alanda kullanımı açısından önemi günden güne artmaktadır. Omega-3 yağ asitlerinin en iyi kaynakları balık çeşitleri ve deniz ürünleridir.

Bu yağ asidi tıpta özellikle kalp hastalıkları, damar sertliği, iltihaplanma, ağrılı romatizmal hastalıkların tedavisinde, bazı böbrek hastalıklarında ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca bebeklerin (zihinsel ve görsel) gelişiminde önemli rol oynar. Bu gibi yararlarından dolayı omega-3 çokludoymamış yağ asitleri bakımından iyi bir kaynak olan balık yağlarının DHA'ca konsantre fraksiyonlarının üretilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, balık yağından enzimatik hidroliz ile DHA asidinin zenginleştirilmesi üzerinde pH ve sıcaklığın etkisinin incelenmesidir. Bu amaçla, morina balığı karaciğer yağının spesifik olmayan *Candida rugosa* lipazı ile enzimatik hidroliz reaksiyonunda proses parametrelerinin etkilerinin incelenmesi ile, optimum koşullar belirlenmiştir.

Morina balığı karaciğer yağının *Candida rugosa* enzimi ile hidrolizinde optimum koşullar pH 5, 35°C, 12 saat, enzim miktarı 2000 U/g_{yağ} olarak saptanmıştır. Bu koşullarda elde edilen trigliserid ve digliserid fraksiyonlarında DHA'ca orijinal balık yağına göre zenginleşme olduğu, DHA 'nın bu fraksiyonlarda sırasıyla 1,64 ve 1,41 kat konsantre olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, DHA'nın yağ:tampon oranı ve çözücü ortamında da elde edilen reaksiyon ürünüde zenginleştiği tespit edilmiştir.

THE EFFECT OF pH AND TEMPERATURE ON THE ENRICHMENT OF DHA BY ENZYMATIC HYDROLYSIS FROM COD LIVER OIL

SUMMARY

Docosahexaenoic Acid which is called DHA is n-3 polyunsaturated fatty acid and its importance increases day by day for food and pharmaceutical uses. The best sources of n-3 polyunsaturated fatty acids are some fishes and sea foods.

DHA plays an important role in the prevention of a number of diseases in humans, including cardiovascular diseases, atherosclerosis, inflammation, rheumatoid arthritis, some kidney diseases and cancer. Also, it is important for brain and visual development of infants. For these reasons, several studies have been performed with the aim of preparing n-3 fatty acid- enriched products from natural fish oils which are the best sources.

The subject of this project is the effect of pH and temperature on the enrichment of Docosahexaenoic acid by enzymatic hydrolysis of fish oil. For this purpose, the enzymatic hydrolysis reaction of cod liver oil was investigated by using non-specific *Candida rugosa* lipase enzyme. The effect of reaction parameters were determined and they were optimized.

The optimal conditions of hydrolysis of cod liver oil by *Candida rugosa* were established as pH 5, 35°C, 12 h, and enzyme concentration of 2000 U/g_{oil}. At this conditions, it was determined that DHA was enriched in triglyceride and diglyceride fractions of reaction mixture that in the original cod liver oil, DHA was concentrated in the same fractions 1,64 and 1,41 times more than that in the original cod liver oil. In addition, it was determined that DHA could be enriched in the reaction products both in different solvent type and different oil:buffer rate.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yağlar, yaşamımızın temel gıda maddelerinden birdir. Yağlar yağ asitlerinden oluşur. Yağların bileşiminde bulunan yağ asitlerinden biri de omega-3 yağ asitleridir. Dokosahekzaenoik asit kısa adıyla DHA, uzun zincirli doymamış omega-3 yağ asitlerinden biridir. En iyi DHA kaynakları balık çeşitleri ve deniz ürünleridir. Balık yağlarında bulunan DHA, tıpta özellikle kalp hastalıkları, damar sertliği, iltihaplanma, ağrılı romatizmal hastalıkların tedavisinde, bazı böbrek hastalıklarında ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca beyin fonksiyonlarında da önemli rol oynar. Retina ve beyin fosfolipidlerinde ana yağ asidi komponenti olarak bulunmaktadır. İlaç Sanayiinde ve gıda sektöründe balık yağlarının kullanılması gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Buna sebep olarak balık yağlarını oluşturan çokludoymamış yağ asitlerinin insan sağlığına olan yararları gösterilebilir.

Balık yağlarının kompleks yapısından dolayı, çokludoymamış yağ asitlerini ve türevlerini yüksek saflıkta konvansiyonel tekniklerle elde etmek zordur. Bu yüzden enzimatik reaksiyonlarla saflaştırmak daha iyidir. Bundan dolayı da enzimatik hidroliz ve seçimli esterleştirme yöntemleri üzerinde birçok çalışmalar yapılmaktadır. Diğer yöntemler ise kromatografik yöntemler, süperkritik karbondioksit ile ekstraksiyon ve üre ile fraksiyonlama olarak sıralanabilir.

Bu çalışmanın amacı, morina balık yağının spesifik olmayan olan *Candida rugosa* lipazı katalizörlüğünde hidroliz edilmesi ve böylece DHA'ca zengin hidroliz ürünü elde edilerek ve bu hidroliz ürünlerine sıcaklık ve pH etkilerinin incelenmesidir. Yüksek oranda DHA içeren ürün eldesi için tüm proses parametreleri de belirlenmiştir.

Bu çalışma ile elde edilen balık yağı , gıda ve ilaç sanayisinde kullanım açısından daha değerli hale gelerek üreticiler için fayda sağlanacaktır.

2. TEORİK ÇALIŞMALAR

2.1 Dokosahekzaenoik Asit Hakkında Genel Bilgi

2.1.1 Dokosahekzaenoik Asidin Besin Değeri ve Sağlık Açısından Önemi

Dokosahekzaenoik Asit (22:6 n-3, cis-4,7,10,13,16,19- Dokosahekzaenoik Asit) kısa adıyla DHA insan sağlığı açısından çok önemli bir uzun zincirli doymamış omega-3 yağ asididir. Doymuş yağ asitleri ile tekli doymamış yağ asitleri insan vücudunda sentez edilebilir. Bu nedenle dışarıdan alınması zorunlu değildir. Fakat DHA vücutta sentez edilemediğinden dışarıdan besinlerle alınması zorunludur.[1-4] Yağ asitleri insan hücre zarlarında bulunur. Fakat önemli yağ asitleri özellikle beyin hücre zarlarında, kalp hücrelerinde, retina ve bağışıklık sistemi hücrelerinde bulunmaktadır. DHA'ya beyin gelişimi için ihtiyaç vardır. Bu yağ asidi hamileliğin son üç ayında ve bebek doğduktan sonraki üç ay boyunca büyük önem taşır.[2,5] Yapılan bir çalışmada sekiz yaşındaki çocuklar incelendiğinde anne sütü ile beslenen çocukların IQ'su diğerlerinden 8,3 kat daha yüksektir. [2]

DHA, kırmızı kan hücrelerinin akıcılığını artırır. Böylece kan hücreleri rahatlıkla taşınarak düşük kan viskozitesi ve kan basıncı oluşur. Ayrıca damar içinde kanın pıhtılaşmasına, damar içi iltihaplanmaya, karşı etki gösterir, damarları genişletir. Bu olumlu etkilerinden dolayı kronik kalp, hipertansiyon, bazı böbrek hastalıkları, romatoid artrit, ülseratif kolit, spastik kolon, Crohn hastalığı, migren, depresyon ve kronik obstrüktif akciğer hastalıklarının önlenmesinde olumlu etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. [1-6]

DHA'nın beyin omurilik sıvısında yer alan serotoninin öncü maddesi olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Serotonin kendini iyi hissetmeye yarayan başlıca sinirsel uyarı taşıyıcısıdır. Günümüzde sıkça kullanılan antidepresan ilaçlar da, serotonin miktarını artırarak depresyonu önler.[6]

1980-1994 yılları arasında, 80 bin hemşire arasında yapılan bir araştırmada DHA içeren besinlerden biri olan balıklardan haftada en az 1 kez yiyenlerin ayda 1 kez

yiyeenlere oranla % 22,0 daha az felce yakalandıkları tespit edilmiş ve haftada 5 kez balık yiyeenlerde bu felç riskini yarı yarıya ortadan kaldırdığı ortaya çıkmıştır. [6]

DHA'nın kanser tümörlerinin oluşumunu önleyici etkisi bulunduğı da iddia edilmektedir.[7]

2.1.2 Balık ve Balık Yağları Hakkında Bilgi

En iyi DHA kaynakları; balık çeşitleri, deniz ürünleri ve balık yağlarıdır. Balık yağı üretimi DHA ve eikosapentaenoik ait (EPA) gibi yağ asitlerinin besin ve tıbbi açıdan önem kazanması nedeniyle artmaya başlamıştır. Fakat deniz sularının ısınması ve kirlilik gibi nedenler balık ve balık yağı üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. Tablo 2.1'de balık yağı üretiminin ülkelere göre dağılımı gösterilmektedir.[8]

Tablo 2.1 Dünya balık yağı üretiminin ülkelere göre dağılımı (1000 ton)

Ülke	1997
Danimarka	136.1
Peru	122.7
Şili	106.9
A.B.D	101.0
Norveç	94.3
İzlanda	90.2
Japonya	58.4
İspanya	20.1
Fas	15.0
G. Afrika Cumhuriyeti	7.5

Balık yağları trigliserid yapısında olduğu halde trigliserid yapısında olan bitkisel yağlardan çok farklıdır [9]. Bitkisel yağlarda bulunan yağ asitlerinin sayısı 10'u geçmez ve esas olarak 1 ile 3 çift bağ içeren 18 karbonlu yağ asitleri temel yağ asitleridir. Balık yağlarında ise sayısı 30 ile 45 arasında değişen farklı zincir uzunluklarında ve 1 ile 6 çift bağ içeren $C_8 - C_{26}$ yağ asitlerinin çeşitli izomerleri yapıyı oluşturmaktadır [10-11]. Balık yağlarının esas yapısını oluşturan yağ asitleri 14:0, 16:0, 16:1 n-9, 18:1 n-9, 20:1 n-9, 22:1 n-9, 20:4 n-6, 20:5 n-3, 22:5 n3/6 ve 22:6 n-3 dür. Bu asitlerin dağılımı balık çeşitlerine göre değişir. Bazı balık türlerine ait yağ bileşimleri Tablo 2.2'de verilmektedir. Ayrıca bazı önemli çokludoymamış yağ asitlerinin (PUFA)formülleri Tablo 2.3'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2 Bazı balık türlerinin yağ asitleri yüzde bileşimi [3,12]

Yağ Asidi	Uskumru	Ringa	Sardalya	G. Afrika Hamsisi	Balina	Somon	Morina
14:0	5.8	8.6	6.7	10.6	5.1	5.3	8.0
15:0	0.1	0.6	-	0.5	0.3	-	0.5
16:0	15.3	21.2	19.0	16.1	12.1	13.6	16.8
16:1	7.6	10.6	8.8	11.4	7.1	7.6	7.2
16:2	-	1.4	0.7	1.1	-	-	-
16:3	-	1.5	1.0	1.1	-	-	-
16:4	0.1	0.9	2.1	2.5	-	-	-
17:0	0.3	-	-	-	-	-	0.3
17:1	2.2	-	-	-	-	-	1.5
18:0	-	3.3	3.4	2.8	3.0	2.4	-
18:1	17.3	13.2	17.1	10.2	27.9	23.0	22.0
18:2	1.3	1.4	1.1	1.0	1.6	3.8	4.9
18:3	0.9	1.3	-	0.4	0.4	-	2.4
18:4	0.7	4.1	2.6	1.5	0.7	1.3	2.4
20:0	0.2	0.4	-	0.4	-	-	0.1
20:1	3.3	1.2	2.5	0.5	14.9	11.4	4.2
20:4	2.7	1.9	1.6	1.7	0.8	1.2	1.1
20:5	11.7	13.4	19.0	24.6	4.1	3.8	10.4
22:1	4.3	-	1.0	1.0	11.0	7.3	3.2
21:5	-	0.6	0.6	0.8	-	-	-
22:5	3.5	2.0	1.9	1.5	2.5	1.4	1.1
22:6	13.3	12.4	11.0	9.8	5.2	5.1	6.0

Tablo 2.3 Bazı önemli çoklu doymamış yağ asitlerinin formülleri

<u>Araşidonik asit (20:4 n-6)</u>
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$
<u>Eikosapentaenoik asit (20:5 n-3 veya n-3 EPA)</u>
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$
<u>n-3 Dokosapentaenoik asit (22:5 n-3 veya n-3 DPA)</u>
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$
<u>n-6 Dokosapentaenoik asit (22:5 n-6 veya n-6 DPA)</u>
$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$
<u>Dokosahekzaenoik asit (22:6 n-3 veya DHA)</u>
$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$

2.1.2.1 Morina Balığı Karaciğer Yağı Hakkında Bilgi

Morina Balığı Karaciğer Yağı birkaç yüzyıl önce İskoçya, Avusturalya, Norveç, Grönland gibi balıkçılığın önde olduğu ülkelerde bulunmuştur. Morina balığı karaciğer yağını çok soğuk geçen kışların getirdiği kas ve eklem hastalıklarının tedavisinde kullanıyorlardı. 1950’li yıllarda pek çok araştırmacı bu yağın diğer yağlı balıkların da içerdiği temel yağ asitlerinden EPA ve DHA’yı keşfetmişler ve araştırmalarını bu yöne doğru kaydırmışlardır. Bu araştırmalar sonucu morina balığı karaciğer yağının ve diğer yağlı balıkların tüketiminin yalnızca romatizmal hastalıklara değil kalp, sinir sistemi, beyin gibi önemli organların işlemlerini en iyi şekilde yerine getirmesini sağladığı görülmüştür. [9,13]

Morina Balığı kışın veya bahar başında yakalandığı zaman karaciğer yağı çıkarılır. Çünkü bu balığın en yağlı olduğu dönem yılın bu aylarıdır. Karaciğer yağı herhangi kimyasal kullanılmadan balığın karaciğerinin karaciğer yağında kaynatılması ile elde edilir ve tazeliğini koruması için doldurulduğu şişelerin içindeki hava alınarak azot gazı doldurulur. [14,15]

Morina balığı karaciğer yağının en eski adı “lysi” dir. Bu kelime ışık anlamına gelmektedir. Bu yağ o zamanlar tüm Avrupa’da lambalarda kullanılmıştır. Ayrıca cildin parlaklığını sağlamakta, boya ve sabun endüstrisinde de kullanılmaktadır.[15] 1854’ten bu yana bu yağ ilaç olarak da kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılacak yağın kalitesini arttırmak için metotlar geliştirilmiştir. Karaciğer önce içi su ile kaplı kazanlarda kaynatılarak yüksek kaliteye ulaştırılır. Daha sonra ciğer konik meşe fiçilerde buharla pişirilir. Değerli olan bu yağın geri kalan kısmını da elde etmek için karaciğer preslenir. [15]

Morina balığı yağ asitleri harici doğal bir A ve D₃ vitamin kaynağıdır.[16] Morina balığı karaciğer yağının en büyük dezavantajı kötü kokmasıdır.[17]

2.1.3 DHA İçeren Yağlardan DHA’nın Zenginleştirilmesi Üzerine Yapılmış

Çalışmalar

DHA’nın besin ve tıbbi açıdan birçok yararının olması nedeniyle sıvı formda yada yumuşak kapsül şeklinde kullanılmak amacıyla EPA ve DHA bakımından zengin ürünler hazırlamak için bu asitlerin balık yağından üretimi üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

Balık yağından konsantre EPA ve DHA elde etmek için pek çok yöntem mevcuttur. Bu yöntemler, üre ile fraksiyonlama yöntemi, kromatografik yöntemler, süperkritik

CO₂ ekstraksiyon yöntemi ve esterleştirme, hidroliz ve transesterleştirme reaksiyonlarını içeren enzimatik yöntemler olarak sayılabilir.

2.1.3.1 Üre İle Fraksiyonlama Yöntemi İle DHA'nın Zenginleştirilmesi

Bu yöntem ürenin yağ asitleri veya metil esterleri ile doymamışlık derecesine göre katı bileşikler oluşturmaya dayanmaktadır.

Wille ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmalarda, sardalya yağı yağ asitlerinde (%30 DHA, EPA) üre ile doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri uzaklaştırılarak, geriye kalan fraksiyonda EPA ve DHA yüzdesi 90'a ulaşmıştır. EPA ve DHA'ca zengin bu fraksiyondan HPLC cihazıyla preparatif olarak EPA ve DHA'nın %80 saflıkta ayrılabilirdiğinden bahsedilmektedir. [18]

2.1.3.2 Kromatografik Yöntemler ile DHA'nın Zenginleştirilmesi

Balık yağından trigliseridlerin gümüş iyonu kullanılarak HPLC ya da silikajel kolon kromatografisinde yağ asitlerinin doymamışlık derecesine göre fraksiyonlanmıştır. Balık yağları önce hidroliz edilerek yağ asitlerine dönüştürüldükten sonra dolgu kolonlarda çokli doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmiştir.

Abe ve Tanaka ise moleküler elek dolgu kolonu kullanarak sardalya yağı yağ asitleri etil esterlerinden % 84.5 oranında etil EPA içeren fraksiyon elde etmiştir.[19]

Kromatografik yöntemler maliyeti ve uygulanabilirliği açısından dezavantajlı olması nedeniyle yüksek oranda EPA ve DHA içeren ürünler elde edilebilse de analitik amaçlı uygulamalar için daha elverişli olduğu söylenebilir.

2.1.3.3 Kristalizasyon ve Distilasyon Yöntemleri İle DHA'nın Zenginleştirilmesi

Stout ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda balık yağı yağ asitlerinden DHA 'nın zenginleştirilmesi için düşük sıcaklık kristalizasyonunun olumlu sonuçlar verdiği görülmektedir. [20] Balık yağının asetonlu çözeltisinin -25 °C 'ye soğutulması ile çöken kristallerin ayrılması sonucu ele geçen filtratta EPA' nın konsantre olduğu yine asetonlu çözeltinin - 40 °C'ye soğutulması halinde EPA ve DHA 'nın birbirinden ayrılabilirdiği gösterilmiştir.[21]

2.1.3.4 Süperkritik CO₂ Ekstraksiyon Yöntemi ile DHA'nın Zenginleştirilmesi

Bu yöntemle yapılan çalışmalarda trigliseridlerin CO₂ 'de çözünürlüğünün az olması yağ verimini düşük olmasına sebep olduğu ve trigliserid halinde EPA ve DHA bakımından zenginleşmenin yapılamayacağı ortaya konmuştur. Eisenbach, süper kritik CO₂ ekstraksiyonunda, yağ asitlerinin sadece karbon sayısına göre fraksiyonlanabileceği bulmuştur. [22] Bundan sonra çalışmalar başlangıç maddesi

olarak üre ile ön zenginleştirme yapılmış yağ asitleri esterleri kullanılmaya başlanmıştır.

Süperkritik akışkanlar CO₂, yüksek difüzyon hızı, düşük viskozite ve düşük yüzey geriliminin kütle iletimi sınırlı enzimatik reaksiyonları hızlandırmasından dolayı enzimatik reaksiyonlar için mümkün bir ortam olarak genel bir ilgi çekmektedir. Enzimatik olarak sentezlenmiş ürünler, farklı sıcaklık ve basınçlarda süperkritik CO₂ 'de çözünürlüklerindeki farklılıklar kullanılarak yan ürünlerden ve dönüşmemiş substratlardan fraksiyonlanabilmektedir.

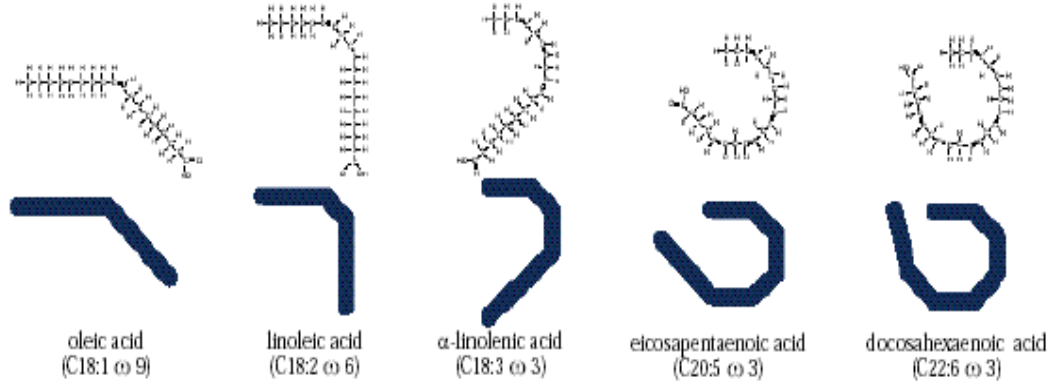
Candida antarctica lipaz enzimi ile süperkritik CO₂ 'de morina balık yağının alkolizi 40 °C'de ve 9-24 Mpa 'da incelenmiştir. 9Mpa' da dönüşüm %25'tir. Düşük basınçlarda, tercihi olarak etil esterlerin ekstrakte edilmesinin mümkün olduğu görülmektedir. 9 Mpa'da toplanan 100 g ekstraktın 64 g'ı etil ester 19 g'ı belirlenen diğer lipidlerin toplam miktarıdır. Basınç arttırıldıkça trigliseridlerin relatif miktarı ekstrattaki bazı lipidler için EPA/Palmitik Asit (g/g) ve DHA/Palmitik asit (g/g) miktarı artmıştır. [23]

Süperkritik CO₂ Ekstraksiyon yönteminin balık yağı yağ esterlerinden konsantre çokludoymamış yağ asitleri fraksiyonunun eldesi üzerine çalışmalara devam edilmektedir. Bu yöntemin dezavantajı pahalı bir yöntem olmasıdır.

2.1.3.5 Enzimatik Hidroliz ve Esterleştirme Yöntemleri İle DHA'nın

Zenginleştirilmesi

Çokludoymamış yağ asitleri sıcaklık ve oksidasyona karşı büyük kararsızlık gösterdiklerinden dolayı enzimatik yöntemlerle zenginleştirilmesi daha avantajlıdır. [28] Son yıllarda yapılan çalışmalar, balık yağlarının hidrolizi ile gliserid formunda konsantre n-3 yağ asitleri üretebilmek için mikrobiyal lipazlara daha önem vermiştir. Balık yağından uzun zincirli omega-3 PUFA'lara karşı lipazların direnç mekanizması açıklanmıştır. Yağ asitlerinde karbon-karbon cis çift bağlarının varlığı zincirlerin bükülmesine sebep olmaktadır. Bu durumu daha iyi anlayabilmek için bazı yağ asitlerinin yapıları Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Bu yüzden, lipazlara sterik engel etkisine yol açan, yağ asidinin uçta bulunan metil grubu ester bağlarına yakın durmaktadır. Bu nedenle, lipazlar da bu yağ asitlerinin ve gliseridlerin ester bağlarına ulaşamamaktadır. Bununla birlikte, doymuş ve doymamış yağ asitleri lipazlara herhangi bir engel göstermezler ve kolaylıkla hidrolizlenebilirler. Bundan dolayı EPA ve DHA için bir lipazın yağ asidi seçiciliği, yağ asitlerinin ayrılmasına imkan vermektedir.



Şekil 2.1 Bazı yağ asitlerinin yapıları

Wanasundara ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, menhaden balık yağı ve balina yağından gliserid formunda konsantre omega-3 çokludoymamış yağ asitleri hazırlamak amacıyla *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor mihei*, *Pseudomonas sp.*, *Rhizopus oryzae* ve *Rhizopus niveus* lipazları ile hidroliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bütün lipazlar her iki yağda farklı hızlarda yağ asitlerini hidrolizleyebilmişlerdir. Bu lipazlardan non-spesifik *Candida cylindracea* lipazı her iki yağdaki hidrolizlenmemiş fraksiyonda toplam omega-3 çokludoymamış yağ asitlerinin EPA ve DHA'nın miktarının artırılmasında en aktif olan enzimdir. *Candida cylindracea* lipazı ile balina yağında en yüksek omega-3 çokludoymamış yağ asidi konsantrasyonu 40 saatlik hidrolizden sonra %43.5'a, menhaden balık yağında ise 44.1'e ulaşmıştır. 1,3-spesifik *Rhizopus oryzae* lipazı ise her iki yağda DHA'nın zenginleşmesinde etkili olmuştur. [24]

Shimizu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, morina balığı karaciğer yağı ve rafine sardalya yağının altı farklı lipazla hidrolizi sonucu n-3 çokludoymamış yağ asitlerinin zenginleştirilmesini incelemişlerdir. *Candida cylindracea* ve *Aspergillus niger* lipazları n-3 çokludoymamış yağ asitleri içeriğini iki kat arttırmıştır. 15-40°C arasında yapılan çalışmalar sonucunda düşük sıcaklıklarda kötü koku önlenmiş fakat zenginleştirme azalmıştır. [25]

Shimada ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada, ton balığı yağı *Geotrichum candidum* lipazı ile 30°C, 16 saatlik hidrolize tabi tutulmuş ve gliserid karışımının % 48,7'sinin EPA ve DHA içerdiği gözlenmiştir. İlk hidroliz reaksiyonu sonucunda yağ asidi içeriğinde fazla bir artış olmadığı görülmüş ve hidroliz tekrarında hidroliz ürününde %57,5 DHA ve % 54,5 EPA içerdiği gözlenmiştir. [26]

Tanaka ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, ton balığı yağı *Candida cylindracea* enzimi ile hidrolize edildiğinde gliserid karışımındaki DHA içeriğinin orijinal yağa göre üç kat arttırıldığı gözlenmiştir. Hidroliz %70 verimle gerçekleşmiştir. [27]

Sun ve arkadaşları somon balığının altı farklı lipaz ile hidroliz gerçekleştirilmiştir. Bu lipazlardan yağ asitlerinin zenginleştirilmesinde *Candida rugosa* ve *Pseudomonas cepacia* nın en etkili enzimler olduğu belirlenmiştir. 35°C ve 20 saatlik bir hidroliz sonucunda *Candida rugosa* ile hidroliz ürünündeki DHA içeriğinin orijinal yağa göre 2,2 kat arttırıldığı gözlenmiştir.[28]

Shimada ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, DHA saflaştırılması ton balığı yağının hidrolizi ve oluşan serbest yağ asidinin seçimli esterleştirilmesi ile yapılmıştır. *Pseudomonas sp.* lipazı, DHA ester bağı üzerinde daha kuvvetli bir aktivite göstermiş ve hidroliz miktarı oldukça yüksek olmuştur. %79 hidrolizde ton balığındaki DHA'nın %83'ü serbest asit fraksiyonunda geri kazanılmıştır. Daha sonra bu fraksiyon esterleştirilmiştir. Böylelikle DHA miktarı %24'ten %72'ye yükseltilmiştir. Esterleşmemiş yağ asitleri reaksiyon karışımında hekzanla ekstrakte edilip aynı koşullarda tekrar esterleştirilerek DHA miktarı %91'e çıkarılmıştır.[29]

Üstün ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda Türk hamsi yağının hidrolizi 1,3-spesifik *Rhizomucor miehei* lipazı ile gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullarda gliserid karışımındaki yağ asidi miktarı %40'a ulaşmıştır. TG ve DG fraksiyonları sırasıyla %45 ve %30 kadar çokludoymamış yağ asidi içermektedir.[30]

Üstün ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada menhaden balık yağının hidrolizi 1,3-spesifik *Aspergillus niger* lipazı ile gerçekleştirilmiştir. Optimum koşullarda yürütülen hidroliz sonucunda elde edilen TG ve DG fraksiyonlarında DHA'nın sırasıyla 1,35 ve 1,82 kat konsantre hale geçtiği belirlenmiştir. [31]

2.2 Lipazlar Hakkında Bilgi

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen protein yapısında olan biyolojik aktiviteye sahip katalizörlerdir.

Lipazlar trigliseridlerin gliserol ve yağ asitlerine parçalanmasını sağlayan ve pankreasta üretilen enzimlerdir. Ayrıca lipazlar bitki ve hayvanların çeşitli dokularından elde edilebilirler. Mantar ve bakteri kullanılarak fermentasyon yolu ile de üretilirler.

Lipazlar “serin hidrolaz” grubuna ait enzimlerdir. Trigliseridler lipazların başlıca substratlarıdır. Amidler, bazı düşük ve yüksek moleküllü esterler de bu enzim grubu tarafından substrat olarak kabul edilir. Lipazlar seçicilik gösterdikleri substratların hidroliz reaksiyonlarının tersi olan esterleşme, iç esterleşme ve transesterleşme reaksiyonlarını da katalizlerler.

Lipazlar genel olarak 20,000-200,000 arası değişen molekül ağırlığına sahiptirler. Aktif oldukları pH aralığı 4-9 aralığında değişirken, sıcaklık olarak 70°C’ye kadar aktivitelerini koruyabilirler. Lipaz aktivitesi ve seçiciliği lipazın tanımlanması için gerekli özelliklerdir. Lipazın aktivitesi kolorimetrik ya da titrimetrik yöntemler ile ölçülebilir. Fluorimetre ve radiometre seçicilik araştırmalarında kullanılan yöntemlerdir. [32]

Lipazların endüstriyel kullanım alanları Tablo 2.4’te gösterilmektedir.

Tablo 2.4 Lipazların endüstriyel kullanım alanları [32]

Endüstriyel Alan	Kullanım Yeri	Çıkan Ürün
Kimya		
Yağ Üretimi	Doğal yağların transesterifikasyonu	Hayvansal ve bitkisel yağlar
Deterjan	Yağ lekelerinin çıkarılması	Ev temizlik ürünleri ve deterjanlar
Gıda		
Et ve balık kurumları	Lezzetin artırılması, ürünün kalitesinin artırılması	Et ve süt ürünleri
Süthane	Süt yağının hidrolizi	Lezzet katkı maddesi
Mandıracılık	Lipid hidrolizi ile yumurtaların kalitesinin artırılması	Mayonez
Maya	Aromaların geliştirilmesi ve fermentasyonun hızlandırılması	Alkollü içecekler
Diğer		
Sağlık	Kan trigliseridi belirlenmesi	Diagnostik
Eczacılık	Besinlerdeki sıvı ve katı yağların sindirimi	Hazmettirici
Deri	Hayvan derisinden yağların uzaklaştırılması,	Deri ürünleri
Çevre	Yağlı maddelerin uzaklaştırılması	Atık su arıtma

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Hammaddeler ve Cihazlar

3.1.1 Morina Balığı Karaciğer Yağının Karakteristik Özellikleri ve Yağ Asitleri Bileşiminin Belirlenmesi

Bu çalışmada kullanılan morina balığı karaciğer yağı Sanofi-Synthelabo İlaç tarafından SIRH, S.A. (Fransa)'dan temin edilmiştir. Morina balığı karaciğer yağının standart yöntemlere göre belirlenmiş bazı karakteristik özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Morina balığı karaciğer yağının bazı karakteristik özellikleri [33]

Özellik	Ortalama değer
Sabunlaşma indisi	161.38
İyot indisi	117.68
Yoğunluk, 20°C	0.924 g/ml
Refraktif indeks	1.48
Asit değeri	0.48

Morina balığı karaciğer yağının yağ asitleri bileşimi kapiler gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. Bu amaçla BF₃ metanol kompleksi ile morina balığı karaciğer yağının metil esterleri hazırlanmış ve Hewlett-Packard 6890 serisi gaz kromatografisi cihazına beslenmiştir. Uygulanan kromatografik analiz koşulları Tablo 3.2'de verilmiştir.

Morina balığı karaciğer yağının kromatogramında yer alan piklerin tanımlanmasında 8:0, 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 ve 20:0 yağ asitlerini içeren standart yağ asitleri metil esterlerinin ile Avrupa farmakopesinde yer alan analiz koşulları altında elde edilmiş morina balığı karaciğer yağının kromatogramı ile %90 saflıktaki DHA metil ester (Sigma Chemical Company) standardı kullanılarak belirlenmiştir. Morina balığı karaciğer yağı yağ asitlerinin bileşimi Tablo 3.3 'de verilmiştir.

Tablo 3.2 Gaz kromatografisi analiz koşulları [33]

Dedektör	Tipi	FID
	Sıcaklığı (°C)	280
Enjektör	Tipi	Dağıtmalı
	Sıcaklığı (°C)	250
Gaz hızları (ml/dk)		
Taşıyıcı gaz (N ₂)		4.5
Hidrojen		30
Hava		400
Dağıtma oranı		200:1
Fırın sıcaklığı		170-255 °C (1°C/dk) 225°C (20 dk)
Kolon tipi		Kapiler kolon ZB-1 ⁽¹⁾
Enjeksiyon hacmi		2 µl

(1) 30m x 0.25 mm, 0.25 µm film kalınlığında %100 dimetil polisiloksan

Tablo 3.3 Morina balığı karaciğer yağı yağ asitlerinin bileşimi

Yağ Asitleri	% Bileşim
14:00	7,81
15:00	2,94
16:00	16,68
16:1 n-7	8,38
16:4 n-1	0,39
18:00	2,32
18:1 n-9	11,24
18:1 n-7	2,46
18:2 n-6	5,75
18:3 n-3	1,60
18:4 n-3	1,76
20:1 n-9	6,72
20:1 n-7	0,49
20:5 n-3	7,28
20:4 n-6	3,00
20:3 n-3	-
20:4 n-3	4,52
22:1 n-11	5,22
22:1 n-9	0,72
22:6 n-3	10,72
Doymuş yağ asitleri	29,75
Teklidoymamış yağ asitleri	35,23
Çiftidoymamış yağ asitleri	5,75
Çoklidoymamış yağ asitleri	29,27
DHA	10,72

3.1.2 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Morina balığı karaciğer yağının hidroliz deneylerinde enzim olarak spesifik olmayan *Candida rugosa* lipazı (EC 3.1.1.3) kullanılmış olup, bu enzim Sigma Chemical Company firmasından temin edilmiştir. Enzim aktivitesi 819 U/mg 'dir.

Hidroliz reaksiyonları sabit pH ortamında gerçekleştirilmiş olup, pH ayarlaması sitrik asit- sodyum hidrojen fosfat tampon çözeltileri ile yapılmıştır. Farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltiler hazırlamak için Tablo 3.4'de verilen miktarlarda sitrik asit ve sodyum hidrojen fosfat çözeltileri birbirine karıştırılmıştır. pH ayarlamaları seyreltik fosforik asit yada seyreltik sodyum hidroksit ile yapılmıştır.

Tablo 3.4 Fosfat Tampon Çözeltilerinin Hazırlanma Prosedürü [33]

pH	Sitrik asit çözeltisi (a) (ml)	Sodyum hidrojen fosfat çözeltisi (b) (ml)
3	80.3	19.7
5	50.0	50.0
7	19.7	80.3
8	4.6	95.4
9	-	100.0

(a) Sitrik asit çözeltisi, litrede 21.01 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ çözülerek hazırlanmıştır.

(b) Sodyum hidrojen fosfat çözeltisi, litrede 35.60 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ çözülerek hazırlanmıştır.

Hidroliz deneyleri sonucu elde edilen ürünlerin yüzde bileşimlerinin bulunması, fraksiyonlanması ve tanımlanmasında kullanılan tüm kimyasal maddeler ve çözücüler J.T. Baker (Deventer, Hollanda) firmasından temin edilmiş olup analitik saflıktadır.

3.1.3 Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- Hassas terazi
- Manyetik karıştırıcı
- Ayırma hunisi
- Vakum evaporatörü
- Geri soğutucu
- HP 6890 GC
- İyot tankı

- HPLC

3.2. Çalışma Yöntemi

3.2.1 Kullanılan Enzimin Aktivitesinin Saptanması

Hidroliz deneylerinde kullanılan lipaz enziminin spesifik aktivitesi, 1 g enzim tozu tarafından 1 dakika içerisinde trigliseridlerden açığa çıkarılan yağ asitlerinin μmol cinsinden miktarı olarak tarif edilmiştir.

Aktivite tayininde, trigliserid substratı olarak zeytinyağı (Riviera tipi) kullanılmıştır. 1 mL zeytinyağı, 0.5 mL 0.1 M CaCl_2 çözeltisi, 3 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7) ve 5 mL distile su önce çalkalayıcılı su banyosunda 10 dakika 37°C 'de karıştırılmıştır. Sonra bu karışıma 10-20 mg enzim tozu ilave edilmiş ve 20 dakika daha aynı sıcaklıkta karışım çalkalanmıştır. Süre sonunda, bu karışıma 20 mL aseton-etilalkol (1:1 hacim/hacim) karışımı ilave edilerek enzim inaktive edilmiştir. Hidroliz reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan yağ asitlerinin miktarı 0.02 N NaOH ile timolftalein indikatörlüğünde titre edilerek belirlenmiştir. Paralel olarak, aynı koşullarda şahit deneme de yapılmıştır [31].

Reaksiyon sonunda enzimin 1 dakikalık zaman içerisinde açığa çıkardığı yağ asitleri miktarı, μmol olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Spesifik aktivite (U/g}_{\text{enzim}})(\mu\text{mol/dak.g})=(V1-V2)1000.N / 20.E$$

Burada;

V1 = Numune için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

V2 = Şahit için sarfedilen NaOH hacmi (mL)

N = NaOH çözeltisinin normalitesi

E = Numunenin miktarı (g)'dır.

3.2.2 Morina Balığı Karaciğer Yağının Enzimatik Hidrolizi

Morina Balığı Karaciğer Yağının enzimatik hidroliz reaksiyonu 100 mL hacimli bir beherde magnetik karıştırıcılı ısıtıcı ile gerçekleştirilmiştir. Sıcaklık $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle sabit ve karıştırma hızı 600 devir/dak değerinde sabit tutulmuştur.

Behere yağ:tampon oranı 12 g:18 mL olacak şekilde morina balığı karaciğer yağı ve belirli pH'ta fosfat tampon konulmuştur. Ortama enzim ilave edilerek reaksiyon başlatılmış ve belirli zaman aralıklarında 2 mL numuneleme yapılmıştır. Bu numuneler üzerine 2 mL metanol ilave edilerek enzimin inaktive edilmesi sağlanmıştır. Hidroliz ürününün % hidrolizlenme değeri belirlenmiştir. Numuneler

hekzan ile ekstakte edilmiş yüzde bileşimin ve DHA'nın konsantre edilip edilmediğinin belirlenmesi için GC analizleri yapılmıştır.

3.2.2.1 % Hidroliz Değerlerinin Bulunması

Morina Balığı Karaciğer Yağının enzimatik hidroliz reaksiyonu sonucu % hidroliz değeri şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Hidroliz değeri} = [(A - B) / (C - B)] \cdot 100$$

Bu formülde;

A = Hidrolize olmuş yağın asit değeri

B = Hidrolize olmamış yağın asit değeri

C = Hidrolize olmamış yağın sabunlaşma değeri

Bu değerleri bulabilmek için ilk önce hidrolize olmuş yağın ve hidrolize olmamış yağın asit değerleri belirlenmelidir. Asit değeri için 10 g madde tartılır, 50 mL eşit hacimde etanol:eter (daha önce fenolftalein indikatörlüğünde 0.1 M KOH ile nötrale edilmiş) karışımında tamamen çözülür ve 0.1 M KOH ile titre edilir. [35]

Asit değeri aşağıdaki formülden hesaplanır:

$$A.D = 5.610 \cdot V / W$$

V = sarfiyat (mL)

W = Alınan numune ağırlığı (g)

Hidrolize edilmiş yağ için aynı koşullarda şahit denemede yapılmıştır.

Hidrolize olmamış yağın sabunlaşma değerini belirleyebilmek için 2 g numuneye 200 mL'lik balonda 25 mL alkolik KOH ilave edilir ve geri soğutucu altında 1 saat kaynatılır, solüsyon sıcakken alkali fazlası 0.5 M HCl ile fenolftalein indikatörlüğünde titre edilir. Aynı koşullarda şahit deneme de yapılır. Aşağıdaki formülden sabunlaşma değeri hesaplanır. [35]

$$\text{Sabunlaşma değeri: } 28.05 \cdot [(V1 - V2) / W]$$

V1= Şahit için sarfedilen HCl hacmi (mL)

V2 = Numune için sarfedilen HCl hacmi (mL)

W = Alınan numune ağırlığı (g)

3.2.3 Hidroliz Ürünü bileşiminin HPLC Cihazı ile Belirlenmesi

Bu yöntem seçilen koşullarda enzimatik olarak üretilen hidroliz ürünlerinin bileşimlerinin belirlenmesi için kullanılmıştır. Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizi esnasında belirli zaman aralıklarında alınan numuneler ekstrakte edildikten sonra döner vakum evaporatörde hekzanı uçurulmuştur. Kalıntı 5ml

tetrahidrofuranda (THF) çözülerek TG, DG ve MG bileşimini tespit etmek üzere HPLC’de aşağıda verilen koşullarda analiz edilmiştir;

Kolon: PL-Gel 50 A

Yöntem: İzokratik

Kolon ısısı: 35⁰C

Akış hızı: 0,5 ml/ dk

Hareketli faz: %100 THF

3.2.4 Hidroliz Ürününün Kolon Kromatografisi İle Fraksiyonlanması ve Her Fraksiyonun Yağ Asitleri Bileşiminin Saptanması

Bu yöntem seçilen koşullarda enzimatik olarak üretilen hidroliz ürünlerinin bileşimlerinin fraksiyonlanması için kullanılmıştır. Optimum koşullarda elde edilen hidroliz ürünü kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmış ve elde edilen her fraksiyonun (TG, DG, MG ve YA) kapiler gaz kromatografisi ile içerdiği yağ asitleri bileşimleri de saptanmıştır. Böylece her fraksiyonda hangi yağ asitlerinin zenginleştirildiği belirlenerek hidrolizin son değerlendirilmesi yapılmıştır.

Serbest yağ asitleri fraksiyonunu karışımdan ayırmak için karışım hekzanda çözüldükten sonra alkolik KOH çözeltisi ilave edilmiş ve serbest yağ asitlerinin potasyum tuzları elde edilmiştir. Daha sonra bu karışım içinde su bulunan ayırma hunisine aktarılmıştır. TG, DG, MG fraksiyonlarını içeren hekzan fazı ile yağ asitleri potasyum sabunlarını içeren sulu fazın ayrılması için bir süre beklenmiştir. Ayırma hunisinden alınan sulu faza daha sonra damla damla %3’lük H₂SO₄ çözeltisi, çözeltinin pH’ı 3 olana kadar ilave edilmiştir. Asit ilavesi ile tekrar serbest hale geçen yağ asitleri ortamdan hekzanla ekstrakte edilerek ayrılmıştır. Böylece hidroliz ürünündeki yağ asitleri fraksiyonu saf olarak elde edilmiştir. Ayırma hunisinde kalan ve içerisinde TG, DG, MG fraksiyonları bulunan hekzan fazı ise döner vakum evaporatörde çözücüsü tamamen uçana kadar tutulmuştur. Evaporasyon sonucu ele geçen gliseridler karışımına daha sonra kolon kromatografisi uygulanarak TG, DG ve MG fraksiyonlarının saf olarak birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Kolon kromatografisi ile gliserid karışımından Mono, di ve trigliserid fraksiyonlarının ayrılmasında, 18 mm iç çapında, 30 cm uzunluğunda ve içerisinde 25 g silikajel bulunan cam kolon kullanılmıştır. Silikajel dietileterle karıştırıldıktan sonra kolona

doldurulmuştur. Tartılan 1g numune 10 ml hekzanda çözülerek kolona beslenmiştir. TG fraksiyonunu ayırmak için 250 ml hekzan:dietileter (85:15 hacmen), DG fraksiyonunu ayırmak için 250 ml hekzan:dietileter (50:50 hacmen) ve MG fraksiyonunu ayırmak için ise 250 ml dietileter 2ml/dk hızla kolondan geçirilmiştir. Kolondan alınan elüatlar 50 ml'lik porsiyonlar halinde toplanmış ve içerikleri TLC ile kontrol edilmiştir. Silika jel G (Merck) kaplanmış tabakalara elüatlardan alınmış örnekler tatbik edildikten sonra, tabakalar hekzan:dietileter:asetikasit (70:30:2 v/v) çözücü sisteminde doyurulmuştur. Daha sonra bu tabaka, içerisinde iyot buharı bulunan cam küvete yerleştirilmiştir. Böylece tabaka üzerindeki TG, DG ve MG spotları görünür hale getirilmiştir. Kolondan alınan tüm elüatların TLC incelemesi yapıldıktan sonra sadece saf olarak TG, DG veya MG içeren fraksiyonlar bir araya toplanmıştır. Bunların çözücüleri uçurulmuş ve böylece gliserid bileşikleri saf olarak elde edilmiştir [31].

Elde edilen TG, DG, MG ve YA fraksiyonları daha sonra BF_3 ile metil esterlerine dönüştürülmüştür ve yağ asitleri bileşimi kapiler gaz kromatografisinde Bölüm 3.1'de açıklanan analiz koşullarında belirlenmiştir.

3.2.5 Metil Ester Hazırlama

Gaz kromatografisinde yağ asitleri yerine yağ asitlerinin metil esterleri kullanılmaktadır. Bunun nedeni metil esteri hazırlanan yağ asitlerinin homolog sırasında ya da yapılarında hiçbir değişikliğin meydana gelmemesidir. Böylece gaz kromatografisinin uygulanmasında çok yüksek sıcaklıklarda çalışmasına gerek kalmayacaktır. Morina karaciğer yağının enzimatik hidroliz ürününün yağ asidi bileşenlerinin gaz kromatografisi ile tanımlanabilmesi için metil esterleri hazırlanmıştır. Ekstraksiyon sonrası elde edilen hekzan fazının döner vakum evaporatörde hekzanın uçurulmasından sonra geriye kalan kalıntı 2 mL hekzan ile çözülmüş ve buradan 600 mg alınarak bir erlene konmuştur. Bunun üzerine 9ml BF_3 -Metanol kompleksi ilave edilmiştir. Madde miktarına göre eklenmesi gereken BF_3 -Metanol kompleks değerleri Tablo 3.5' te verilmiştir. Erlene kaynama taşı atıp geri soğutucu altında su banyosunda 2 dakika kaynatılmış ve bu süre sonunda geri soğutucu üstünden 5 ml n-Heptan eklenerek reaksiyona 1 dakika daha devam edilmiştir. Bu süre sonunda erlen geri soğutucu ve su banyosundan çıkartılarak

reaksiyon durdurulmuştur. Erlendeki çözelti balon jojeye aktarılmış ve üzerine doygun tuz çözeltisi ilave edilip bir süre bekletilerek faz ayrımı sağlanmıştır. Bu çözelti içindeki suyu tutabilmek amacı ile bir flakona bir miktar susuz sodyum sülfat konarak üzerine 1 ml n-heptan ve balon jojedeki çözeltinin üst fazı eklenmiştir. Elde edilen örnek etiketlenerek gaz kromatografi cihazına enjekte edilebilecek hale getirilmiştir [34]. Örnek kromatogramlar “EKLER” bölümünde verilmiştir.

Tablo 3.5 Metil esteri hazırlanacak madde miktarına karşılık gelen BF₃-Metanol kompleksi miktarı.

Ekstrakt (mg)	Balonjoje (ml)	BF ₃ -Metanol kompleksi (ml)
100-250	50	5
250-500	50	7
500-750	125	9
750-1000	125	12

3.3 Morina Balığı Karaciğer Yağının *Candida rugosa* İle Hidroliz

Reaksiyonunun Yürüyüşüne Enzim Miktarı ve Sürenin Etkisi

Morina balığı karaciğer yağının hidroliz reaksiyonuna enzim miktarı ve sürenin etkisini incelemek üzere morina balığı karaciğer yağı:tampon çözelti oranı 12 g:18 mL olacak şekilde; pH 7 ve 35°C’de 400 U/ g_{yağ}, 1000 U/ g_{yağ}, 2000 U/ g_{yağ} ve 5000U/ g_{yağ} enzim ilavesi ile hidroliz deneylerine başlanmıştır. Reaksiyon 48 saat sonra durdurulmuştur. Reaksiyon karışımından 3., 6., 9., 12., 24., 30., ve 48. saat sonunda alınmış numunelerin yağ asitleri kompozisyonu Tablo 3.6- Tablo 3.9’da ve % DHA bileşiminin zamanla değişimi Tablo 3.10’da verilmiştir. Tablolar incelendiğinde her bir enzim miktarında, artış gözlenmektedir. Fakat enzim miktarının arttırılması ile % DHA artışı aynı oranda değildir. Hidroliz yürüyüşünü daha iyi görebilmek için % DHA bileşiminin zamanla değişimi grafiği Şekil 3.1’ de gösterilmiştir.

Tablo 3.6 Morina balığı karaciğer yağının E= 400 U/ g_{yağ} , enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	3	6	9	12	24	30	48
	%Bileşim						
14:00	7,28	7,06	6,90	6,77	6,68	6,32	7,24
15:00	0,29	0,30	0,39	0,28	0,70	1,28	0,60
16:00	17,39	16,61	15,47	15,19	15,06	13,84	15,82
16:1 n-7	0,20	0,18	0,83	1,42	2,01	3,56	2,50
16:4 n-1	0,51	0,48	0,48	0,45	0,48	0,47	0,49
18:00	4,23	4,21	4,28	4,03	3,97	3,91	4,21
18:1 n-9	11,35	10,76	10,52	9,58	9,50	8,60	9,85
18:1 n-7	2,89	2,95	2,85	2,69	2,74	2,36	2,68
18:2 n-6	0,18	-	0,40	1,16	1,24	2,27	1,17
18:3 n-3	-	-	0,48	0,36	0,37	0,75	0,38
18:4 n-3	0,16	-	0,84	0,49	0,45	0,86	0,53
20:1 n-9	16,03	16,08	15,68	14,86	14,32	13,90	15,21
20:1 n-7	1,03	1,05	1,08	1,00	0,99	0,95	0,98
20:5 n-3	9,41	10,08	9,47	9,13	9,31	7,74	6,85
20:4 n-6	0,15	0,21	0,35	1,95	2,85	3,34	1,45
20:3 n-3	0,65	0,66	0,62	0,62	0,62	0,61	0,60
20:4 n-3	0,28	0,16	0,52	1,28	1,30	2,01	1,48
22:1 n-11	15,38	15,18	15,02	13,78	13,09	12,97	13,19
22:1 n-9	1,87	1,94	1,80	2,47	1,70	1,57	1,70
22:6 n-3	10,71	12,11	12,04	12,60	12,65	12,70	13,00

Tablo 3.6 ‘nın incelenmesi ile 400 U/ g_{yağ} enzim kullanılarak gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu incelendiğinde ilk 3 saat içerisinde orijinal yağa göre DHA miktarında değişim olmadığı ancak 6. saatten sonra artış gözlemlendiği ve 48 saat sonunda orijinal yağa göre 1,21 kat artış elde edildiği belirlenmiştir.

Tablo 3.7 Morina balığı karaciğer yağının E= 1000 U/ g_{yağ}, enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	3	6	9	12	24	30	48
	%Bileşim						
14:00	6,98	6,56	6,29	6,33	5,80	4,62	5,01
15:00	0,30	0,30	0,59	0,72	0,85	2,31	2,50
16:00	15,64	14,60	13,36	12,90	12,44	9,48	10,27
16:1 n-7	0,70	0,76	1,73	1,93	2,19	5,19	4,78
16:4 n-1	0,47	0,58	0,47	0,55	0,47	0,40	0,41
18:00	4,44	4,57	4,40	4,41	4,30	3,48	3,46
18:1 n-9	8,92	8,43	7,56	7,40	7,36	5,71	5,78
18:1 n-7	2,81	2,71	2,61	2,85	2,64	1,91	1,95
18:2 n-6	0,48	0,50	1,04	1,25	1,23	3,05	2,91
18:3 n-3	-	-	0,36	0,43	0,40	1,12	0,98
18:4 n-3	0,26	0,26	0,47	0,53	0,51	1,26	1,19
20:1 n-9	16,65	16,96	16,20	15,83	15,61	12,15	12,10
20:1 n-7	1,08	1,10	1,09	1,29	1,09	0,85	0,86
20:5 n-3	9,40	9,47	9,66	9,49	9,24	7,23	7,80
20:4 n-6	0,78	0,93	1,80	1,88	2,81	7,37	6,79
20:3 n-3	0,68	0,71	0,72	0,86	0,69	0,55	0,52
20:4 n-3	0,66	0,76	1,62	1,37	1,76	4,66	4,47
22:1 n-11	16,35	16,75	14,98	14,18	14,50	11,39	10,96
22:1 n-9	1,95	2,00	1,95	1,90	1,91	1,41	1,43
22:6 n-3	11,51	11,99	13,09	13,87	14,45	15,86	15,83

Tablo 3.7 ‘nin incelenmesi ile 1000 U/ g_{yağ} enzim kullanılarak gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu incelendiğinde reaksiyonun ilk saatlerinden itibaren DHA miktarında artış gözlenmiş ve 48 saat sonunda orijinal yağa göre 1,48 kat artış elde edildiği belirlenmiştir.

Tablo 3.8 Morina balığı karaciğer yağının E= 2000 U/ g_{yağ}, enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	3	6	9	12	24	30	48
	%Bileşim						
14:0	7,30	7,34	6,47	6,26	5,61	5,43	5,66
15:0	0,08	0,09	0,26	0,47	0,97	1,18	0,88
16:0	17,26	16,69	14,25	13,15	11,67	11,11	11,57
16:1 n-7	0,37	0,37	0,85	1,35	2,55	2,89	2,63
16:4 n-1	0,45	0,45	0,41	0,39	0,42	0,40	0,44
18:0	3,81	3,93	4,10	4,00	4,00	3,83	3,66
18:1 n-9	10,17	9,47	7,85	7,15	6,50	6,14	6,21
18:1 n-7	3,06	3,05	2,78	2,75	2,31	2,25	2,03
18:2 n-6	0,26	0,28	0,50	0,69	1,41	1,53	1,58
18:3 n-3	0,08	0,10	0,19	0,21	0,49	0,53	0,57
18:4 n-3	0,09	0,11	0,27	0,36	0,72	0,67	0,61
20:1 n-9	15,41	15,64	16,45	16,07	15,21	14,65	15,46
20:1 n-7	0,92	0,92	0,82	0,96	0,89	0,81	0,77
20:5 n-3	10,56	10,76	10,54	11,08	9,13	9,20	7,99
20:4 n-6	0,22	0,37	0,68	1,32	3,30	3,81	3,32
20:3 n-3	0,55	0,56	0,54	0,58	0,55	0,54	0,48
20:4 n-3	0,32	0,46	1,19	1,28	2,85	3,12	3,26
22:1 n-11	14,52	14,61	16,49	15,46	15,08	14,68	14,84
22:1 n-9	1,73	1,78	1,80	1,89	1,70	1,53	1,40
22:6 n-3	13,02	13,51	13,94	14,58	14,64	15,71	16,61

Tablo 3.8 ‘in incelenmesi ile 2000 U/ g_{yağ} enzim kullanılarak gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu incelendiğinde DHA miktarındaki artışın 1000 U/ g_{yağ}’ye göre daha hızlı olduğu ve 48 saat sonunda orijinal yağa göre 1,55 kat artış elde edildiği belirlenmiştir.

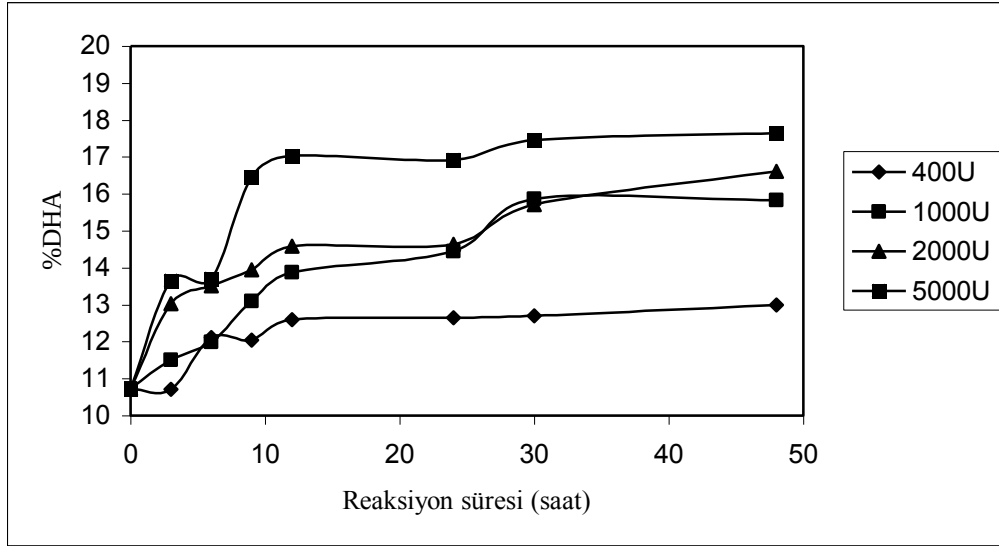
Tablo 3.9 Morina balığı karaciğer yağının E= 5000 U/ g_{yağ}, enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	3	6	9	12	24	30	48
	%Bileşim						
14:00	6,59	6,11	5,07	4,61	4,99	4,75	4,99
15:00	-	0,32	1,02	1,61	0,22	0,38	0,31
16:00	14,37	12,11	9,36	8,82	9,96	8,88	8,57
16:1 n-7	0,52	0,69	2,26	3,39	0,24	1,02	0,52
16:4 n-1	0,42	0,27	1,36	-	0,29	-	0,21
18:00	4,49	4,24	4,36	4,34	5,33	5,19	5,11
18:1 n-9	8,42	7,10	5,64	5,36	6,27	5,45	5,76
18:1 n-7	2,93	2,49	2,16	1,78	2,30	1,94	2,18
18:2 n-6	-	0,48	1,36	2,08	0,27	0,66	0,54
18:3 n-3	-	-	0,41	0,67	-	0,27	-
18:4 n-3	-	0,36	0,61	0,92	-	0,32	0,33
20:1 n-9	17,03	18,10	15,54	14,56	18,52	17,97	17,96
20:1 n-7	1,13	1,18	1,07	0,98	1,22	1,15	1,22
20:5 n-3	11,05	10,11	9,56	7,82	11,31	9,43	11,29
20:4 n-6	-	1,03	3,89	4,80	0,61	1,67	1,26
20:3 n-3	0,75	0,79	0,73	0,65	0,85	0,82	0,89
20:4 n-3	-	0,96	2,34	3,89	0,32	1,45	0,74
22:1 n-11	16,88	17,72	15,01	14,86	18,00	18,95	18,00
22:1 n-9	2,17	2,21	1,98	1,75	2,36	2,24	2,40
22:6 n-3	13,65	13,71	16,46	17,02	16,92	17,45	17,65

Tablo 3.9 ‘un incelenmesi ile 5000 U/ g_{yağ} enzim kullanılarak gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu incelendiğinde 12 saat sonunda DHA miktarında orijinal yağa göre 1,59 kat artış gözlenmiş ve 48 saat sonunda orijinal yağa göre ancak 1,65 kat artış elde edilebildiği belirlenmiştir.

Tablo 3.10 % DHA bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Süre (saat)	Enzim Miktarı			
	400U	1000U	2000U	5000U
	% DHA Bileşimi			
3	10,71	11,51	13,02	13,65
6	12,11	11,99	13,51	13,71
9	12,04	13,09	13,94	16,46
12	12,60	13,87	14,58	17,02
24	12,65	14,45	14,64	16,92
30	12,70	15,86	15,71	17,45
48	13,00	15,83	16,61	17,65



Şekil 3.1 % DHA bileşiminin zamanla değişimi (pH 7, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Hidroliz reaksiyonlarında % hidroliz değerleri de Tablo 3.11’ de görülmektedir.

Tablo 3.11 Hidroliz reaksiyonlarında % hidroliz değerleri

Süre (saat)	Enzim Miktarı			
	400U/g _{yağ}	1000U/ g _{yağ}	2000U/ g _{yağ}	5000U/ g _{yağ}
	% Hidroliz			
3	28,12	35,18	42,30	55,35
6	55,74	65,09	70,15	77,68
9	65,36	72,04	76,32	83,33
12	72,14	74,30	82,64	84,47
24	73,18	79,97	83,17	84,98
30	74,02	80,06	83,42	85,52
48	76,04	80,56	84,05	86,41

Tablolar ve Şekil 3.1’de verilen grafik birlikte incelendiğinde 400 U/ g_{yağ}’ da orijinal balık yağına göre istenildiği kadar yüksek DHA artışı gözlenmediği görülmektedir. Tablo 3.11’deki verilere göre 24. saatten sonra % hidroliz değerlerinde fazla bir artış olmadığı görülmektedir. Hatta 2000 U/g_{yağ} ve 5000 U/ g_{yağ} enzim miktarları ile çalışılan deneylerde 12. saatten sonra önemli bir artış olmadığı görülmüştür. Buna göre % DHA bileşimi 400 U/g_{yağ} ,24 saat sonunda 1,18 kat, 1000 U/g_{yağ} ,24 saat sonunda 1,35 kat, 2000 U/g_{yağ} ,12 saat sonunda 1,36 kat, 5000 U/g_{yağ} ,12 saat sonunda 1,59 kat artmıştır. Amacın daha kısa zamanda reaksiyon yürütmek ve düşük enzim miktarında yüksek DHA miktarı elde etmek olduğu göz önünde tutulursa 12 saat ve 2000 U/g_{yağ} enzim miktarı ile hidroliz deneylerinin sürdürülmesinin doğru olacağı sonucuna varılmıştır.

3.4 Morina Balığı Karaciğer Yağının *Candida rugosa* İle Hidroliz

Reaksiyonunun Yürüyüşüne pH Etkisi

Enzimler pH değişimlerine karşı çok duyarlıdır. Bundan dolayı bu bölümde DHA ‘ca zengin ürünler elde etmek için hangi pH’da çalışılması gerektiğinin belirlenmesi için 2. seri hidroliz deneyleri yürütülmüştür. Bu deneylerde yağ:tampon çözelti oranı 12 g:18 mL olacak şekilde; 2000 U/ g_{yağ} enzim miktarında 35°C’de pH 3, pH 5, pH 8 ve pH 9’da 12 saat hidroliz deneyleri yapılmıştır. Bu seri deneylere ait hidroliz ürünü kompozisyonu zamanla değişim değerleri Tablo 3.12, Tablo 3.13, Tablo 3.14, Tablo 3.15’ te verilmiştir. Bu tablolardaki verilere pH 7’de aynı koşullarda çalışıldığında elde edilmiş veriler eklenerek % DHA bileşiminin zamanla değişimi grafiği Şekil 3.2’ de gösterilmiştir.

Tablo 3.12 Morina balığı karaciğer yağının pH 3enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g_{yağ}, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
% Bileşim							
14:0	7,20	7,30	6,41	6,03	5,82	6,42	5,18
15:0	0,32	0,28	0,33	0,34	0,40	0,25	0,47
16:0	16,83	15,89	13,50	12,61	11,54	13,59	10,45
16:1 n-7	0,79	0,54	0,70	1,18	1,16	0,75	1,40
16:4 n-1	0,46	0,47	0,48	0,42	0,37	0,24	0,39
18:0	3,90	4,51	4,97	4,69	4,78	3,76	4,64
18:1 n-9	10,04	8,17	7,05	7,00	6,34	7,04	6,04
18:1 n-7	2,92	2,49	2,72	2,30	2,35	2,25	1,99
18:2 n-6	0,49	0,30	0,47	0,58	0,57	0,26	0,77
18:3 n-3	0,14	-	0,13	0,17	0,17	-	0,23
18:4 n-3	0,10	-	0,12	0,33	0,29	-	0,30
20:1 n-9	15,21	17,54	17,70	17,76	17,85	18,01	17,75
20:1 n-7	0,92	0,81	1,02	0,95	0,98	0,55	0,83
20:5 n-3	10,02	8,77	10,44	8,77	9,71	10,25	8,78
20:4 n-6	0,84	0,57	1,02	1,12	1,32	0,62	1,91
20:3 n-3	0,55	0,56	0,66	0,64	0,66	0,33	0,66
20:4 n-3	0,46	0,57	0,50	1,43	1,18	0,58	1,66
22:1 n-11	14,29	17,59	17,15	19,10	19,15	20,02	20,92
22:1 n-9	1,72	1,65	1,92	1,93	2,08	1,65	2,05
22:6 n-3	12,79	11,98	12,70	12,65	13,30	13,43	13,59

Tablo 3.12 ‘in incelenmesi ile pH 3 ortamında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu incelendiğinde DHA miktarında 12 saat sonunda orijinal yağa göre 1,27 kat artış gözleendiği belirlenmiştir.

Tablo 3.13 Morina balığı karaciğer yağının pH 5enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g_{yağ}, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
	%Bileşim						
14:00	5,18	4,96	4,80	4,18	4,77	3,90	4,72
15:00	2,51	2,47	2,56	2,58	2,43	4,51	3,19
16:00	11,94	10,74	9,60	8,10	8,85	6,88	8,35
16:1 n-7	6,06	5,48	5,70	6,04	5,88	8,08	7,15
16:4 n-1	0,27	0,25	-	-	-	-	-
18:00	3,08	3,29	3,36	3,27	3,24	2,53	3,08
18:1 n-9	6,70	5,70	4,91	4,35	4,84	4,06	4,48
18:1 n-7	2,10	2,05	1,84	1,54	1,94	1,50	1,77
18:2 n-6	3,69	3,22	3,99	3,08	3,63	5,97	4,00
18:3 n-3	1,24	1,26	1,11	1,14	1,14	1,96	1,36
18:4 n-3	1,40	1,30	1,35	1,39	1,61	2,97	1,86
20:1 n-9	10,96	11,58	11,68	11,15	11,24	7,89	9,12
20:1 n-7	0,77	0,80	0,77	0,64	0,82	-	0,71
20:5 n-3	7,07	7,19	6,94	5,50	8,27	6,06	7,54
20:4 n-6	6,28	6,88	7,53	8,42	7,19	9,98	8,51
20:3 n-3	0,56	0,53	0,60	0,65	0,55	-	0,42
20:4 n-3	4,40	4,41	4,79	8,73	6,86	8,93	7,31
22:1 n-11	9,87	10,69	10,84	11,46	8,81	6,04	7,98
22:1 n-9	1,33	1,21	1,36	1,25	1,46	1,13	1,10
22:6 n-3	14,57	15,76	16,26	16,87	16,59	17,58	17,35

Tablo 3.13 ‘ün incelenmesi ile pH 5 ortamında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu incelendiğinde DHA miktarında 12 saat sonunda orijinal yağa göre 1,62 kat artış gözlemlendiği belirlenmiştir.

Tablo 3.14 Morina balığı karaciğer yağının pH 8 enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g_{yağ}, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

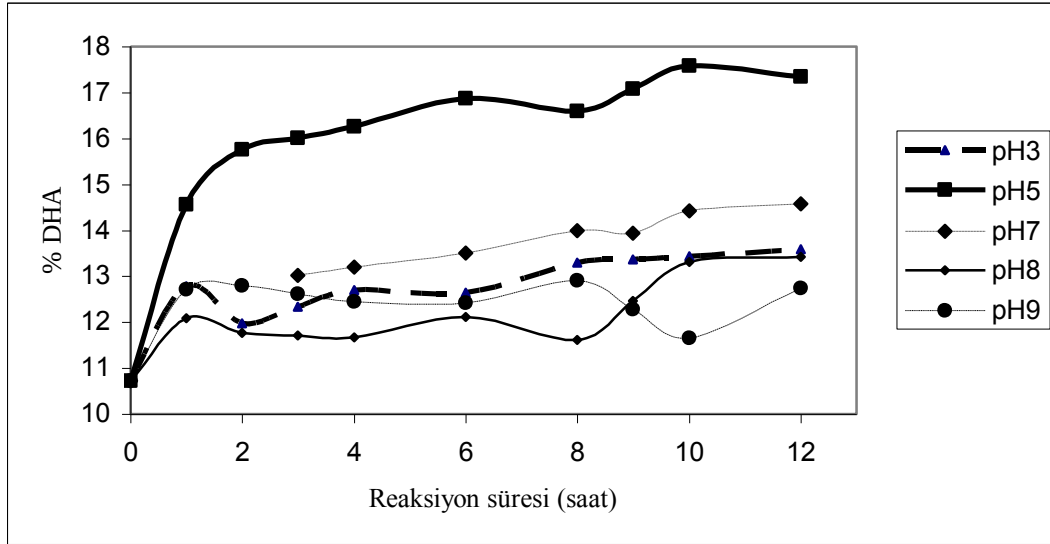
Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
	%Bileşim						
14:0	5,42	6,71	6,99	6,38	7,60	6,10	6,53
15:0	4,73	3,15	2,49	2,87	2,17	2,19	3,54
16:0	14,08	15,31	15,52	14,04	16,69	16,53	14,11
16:1 n-7	12,24	8,01	6,98	7,84	5,61	7,66	9,13
16:4 n-1	0,19	0,24	0,26	0,26	0,26	-	-
18:0	1,31	2,20	2,57	2,54	2,83	1,49	1,99
18:1 n-9	8,86	9,75	9,63	8,61	9,85	9,45	7,93
18:1 n-7	1,68	1,90	1,98	1,85	2,20	1,73	1,63
18:2 n-6	8,14	5,34	4,54	5,20	3,57	4,46	5,29
18:3 n-3	2,24	1,46	1,27	1,47	1,01	1,37	1,69
18:4 n-3	1,59	1,09	1,08	1,27	0,87	1,03	1,30
20:1 n-9	6,03	9,82	11,04	10,53	11,82	10,61	9,46
20:1 n-7	0,18	0,30	0,35	0,39	0,45	0,23	0,25
20:5 n-3	5,21	5,81	5,80	5,68	6,79	5,49	4,60
20:4 n-6	6,48	5,28	4,45	5,34	3,83	5,28	6,57
20:3 n-3	-	0,16	0,19	0,20	0,21	-	-
20:4 n-3	5,10	3,57	3,53	4,31	2,90	3,52	4,09
22:1 n-11	4,09	7,55	8,98	8,37	9,16	8,94	7,97
22:1 n-9	0,32	0,59	0,69	0,72	0,78	0,56	0,48
22:6 n-3	12,09	11,76	11,67	12,12	11,61	13,31	13,43

Tablo 3.14 ‘ün incelenmesi ile pH 8 ortamında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu incelendiğinde DHA miktarında 12 saat sonunda orijinal yağa göre ancak 1,25 kat artış gözlemlendiği belirlenmiştir. pH değeri 7’nin üzerine çıktığında enzim aktivitesinin azalmaya başladığı gözlenmiştir.

Tablo 3.15 Morina balığı karaciğer yağının pH 9 enzimatik hidrolizinde , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g_{yağ}, 35°C, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

YAĞ ASİTLERİ	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
	%Bileşim						
14:0	5,45	4,95	5,31	5,91	5,42	7,21	5,91
15:0	2,97	3,55	3,15	2,31	2,30	1,19	2,47
16:0	12,33	11,17	11,69	13,71	13,50	17,60	13,45
16:1 n-7	8,05	9,51	8,51	6,45	7,20	3,38	6,96
16:4 n-1	0,26	0,24	0,25	0,30	0,23	0,32	0,28
18:0	2,62	2,44	2,70	2,93	2,58	3,21	2,65
18:1 n-9	8,48	7,64	8,04	9,33	8,86	10,84	8,89
18:1 n-7	1,81	1,62	1,74	2,05	1,44	2,42	1,98
18:2 n-6	5,76	7,02	6,18	4,71	5,12	2,11	4,86
18:3 n-3	1,62	1,94	1,73	1,29	1,44	0,61	1,54
18:4 n-3	1,38	1,64	1,52	1,22	1,20	0,58	1,39
20:1 n-9	9,94	8,85	9,87	10,76	10,94	13,10	10,52
20:1 n-7	0,46	0,46	0,47	0,62	0,46	0,64	0,48
20:5 n-3	5,35	5,05	5,38	6,53	5,24	7,17	5,72
20:4 n-6	6,05	6,98	6,23	4,83	5,35	2,30	5,31
20:3 n-3	0,31	0,29	0,33	0,37	0,29	0,36	0,30
20:4 n-3	4,35	5,55	4,99	3,93	4,00	1,68	3,56
22:1 n-11	9,21	7,46	8,52	9,19	10,56	12,26	10,07
22:1 n-9	0,89	0,85	0,92	1,14	0,96	1,36	0,92
22:6 n-3	12,71	12,79	12,45	12,42	12,91	11,66	12,74

Tablo 3.15 ‘in incelenmesi ile pH 9 ortamında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu incelendiğinde DHA miktarında 12 saat sonunda orijinal yağa göre ancak 1,19 kat artış gözlemlendiği belirlenmiştir. pH 9 ortamında enzimin aktivitesini kaybettiği daha belirgindir.



Şekil 3.2 % DHA bileşiminin zamanla değişimi üzerinde pH'nın etkisi. (2000 U/g_{yağ} enzim miktarı, 35°C, 12 saat, yağ:tampon çöz. 12 g:18 mL)

Tablolar ve Şekil 3.2 birlikte incelendiği zaman 2000 u/g_{yağ} enzim miktarı, 35°C, 12 saat sürdürülen hidrolizler sonucunda pH 5' de gerçekleştirilen hidroliz sırasında % DHA miktarındaki artışın diğer pH çalışmalarına göre daha fazla olduğu görülmektedir. pH 3, pH 5, pH 7, pH 8 ve pH 9 ortamlarında gerçekleştirilen 12 saatlik hidrolizler sonucunda % DHA bileşimi sırasıyla % 13.59, %17.35, %14.58, %13.43, %12.74 olarak belirlenmiştir. Ortam asitliğinin fazla arttırılması ya da alkali ortamlarda % DHA bileşimi çok fazla artmamaktadır. Bu durum enzimin aktivite kaybetmesi ile açıklanabilir. pH 5 'de gerçekleştirilen hidroliz sonucunda % DHA bileşimi orijinal yağa göre 1.62 kat zenginleşme olduğu görülmektedir. yapılan ikinci seri deneylerden sonra hidroliz reaksiyonlarına pH 5, 2000 U/g_{yağ} enzim miktarı, 35°C, 12 saat koşullarında devam edilmesinin doğru olacağına karar verilmiştir.

3.5 Morina Balığı Karaciğer Yağının *Candida rugosa* İle Hidroliz

Reaksiyonunun Yürüyüşüne Sıcaklık Etkisi

Birçok kimyasal reaksiyonda olduğu gibi enzimle katalize edilen reaksiyonlarda da hız, sıcaklık arttıkça daha da artar. Ancak sıcaklığın fazla yükseltilmesi enzimin aktivitesinin kaybında önemli rol oynar. Lipaz enzimlerinin genel olarak 30-55 °C'ler arasında aktivite gösterdikleri ifade edilse de maksimum aktivite sıcaklığı lipaz türüne göre farklılık gösterir. Bu bölümde , *Candida rugosa* enzimi ile yapılan hidroliz deneylerinin sıcaklık ile ne şekilde etkileneceği ve enzimin en yüksek aktivite göstereceği sıcaklık saptanacaktır.

Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizi ile yürütülen 3. Seri deneylerde 12 saat süreyle pH 5, 2000 U/g_{yağ} enzim miktarı ve yağ:tampon çözelti oranı 12 g:18 mL olacak şekilde sabit tutulmuştur. Sıcaklık çalışmaları 25°C, 40 °C, 50°C ve 70°C ‘de gerçekleştirilmiştir. Bu seri deneylere ait hidroliz ürünü kompozisyonu zamanla değişim değerleri Tablo 3.16, Tablo 3.17, Tablo 3.18, Tablo 3.19’ da verilmiştir. Bu tablolardaki verilere 35°C’de aynı koşullarda çalışıldığında elde edilmiş veriler de eklenerek % DHA bileşiminin zamanla değişimi üzerinde sıcaklığın etkisi grafiği Şekil 3.3’ de gösterilmiştir.

Tablo 3.16 Morina balığı karaciğer yağının 25°C ‘de enzimatik hidrolizinde ,
hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g_{yağ}, pH 5,
yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

YAĞ ASİTLERİ	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
	% Bileşim						
14:0	5,29	4,50	4,49	4,98	4,01	5,41	3,85
15:0	2,50	3,78	3,82	2,92	3,59	2,35	3,68
16:0	12,76	10,23	9,51	10,00	8,15	10,89	7,24
16:1 n-7	7,34	9,20	8,68	7,07	8,17	5,56	7,91
16:4 n-1	0,32	0,21	0,20	0,22	0,17	0,22	0,16
18:0	2,80	2,28	2,40	2,99	2,48	3,25	2,64
18:1 n-9	8,03	6,09	5,22	5,25	4,26	5,65	3,78
18:1 n-7	1,82	1,58	1,56	1,63	1,40	1,78	1,33
18:2 n-6	4,86	5,62	4,76	3,77	4,35	2,71	4,13
18:3 n-3	1,42	1,79	1,63	1,30	1,60	0,96	1,47
18:4 n-3	1,33	1,64	1,61	1,45	1,61	1,13	1,70
20:1 n-9	10,69	8,71	9,30	11,34	9,59	12,33	9,82
20:1 n-7	0,52	0,42	0,46	0,54	0,38	0,56	0,43
20:5 n-3	5,98	5,18	5,06	5,52	4,86	6,00	4,89
20:4 n-6	6,08	8,89	8,86	7,70	10,22	6,71	10,51
20:- n-3	0,32	0,30	0,29	0,37	0,30	0,38	0,14
20:4 n-3	4,38	5,51	5,79	5,27	6,33	4,57	6,72
22:1 n-11	10,17	8,26	9,07	11,07	9,75	12,53	10,17
22:1 n-9	1,00	0,81	0,84	1,06	0,88	1,14	1,00
22:6 n-3	12,36	15,02	15,42	15,55	15,89	15,85	17,00

Tablo 3.17 Morina balığı karaciğer yağının 40°C ‘de enzimatik hidrolizinde ,
hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g_{yağ}, pH 5,
yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
	% Bileşim						
14:0	6,54	5,18	5,10	4,92	4,86	5,32	4,63
15:0	0,91	3,72	2,80	2,29	1,99	1,38	2,10
16:0	14,37	9,76	9,62	9,18	8,86	9,98	8,57
16:1 n-7	2,33	9,19	5,86	5,27	4,51	3,43	4,79
16:4 n-1	0,28	0,20	0,20	0,19	0,18	0,18	0,15
18:0	3,76	2,44	3,11	3,41	3,72	3,92	3,39
18:1 n-9	7,27	5,36	4,82	4,66	4,68	5,34	4,37
18:1 n-7	2,54	1,57	1,80	1,74	1,70	1,85	1,59
18:2 n-6	1,34	5,28	3,17	2,84	2,35	1,81	2,64
18:3 n-3	0,43	1,80	1,09	0,98	0,79	0,59	0,88
18:4 n-3	0,54	1,69	1,27	1,18	1,08	0,76	0,97
20:1 n-9	14,83	9,05	11,84	12,91	13,65	14,67	13,06
20:1 n-7	0,88	0,65	0,61	0,71	0,73	0,71	1,59
20:5 n-3	9,29	5,15	6,77	6,87	6,86	7,48	6,41
20:4 n-6	2,59	8,59	7,75	7,05	6,73	4,72	7,22
20:3 n-3	0,52	0,32	0,42	0,45	0,50	0,52	0,43
20:4 n-3	1,87	6,16	5,25	5,03	4,75	3,70	4,88
22:1 n-11	13,94	7,78	11,22	12,61	14,13	15,76	13,75
22:1 n-9	1,68	0,92	1,28	1,36	1,47	1,47	1,34
22:6 n-3	14,09	15,19	16,03	16,36	16,46	16,41	17,26

Tablo 3.17 ‘nin incelenmesi ile 40 °C’de gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu incelendiğinde DHA miktarında 12 saat sonunda orijinal yağa göre 1,61 kat artış gözlemlendiği belirlenmiştir.

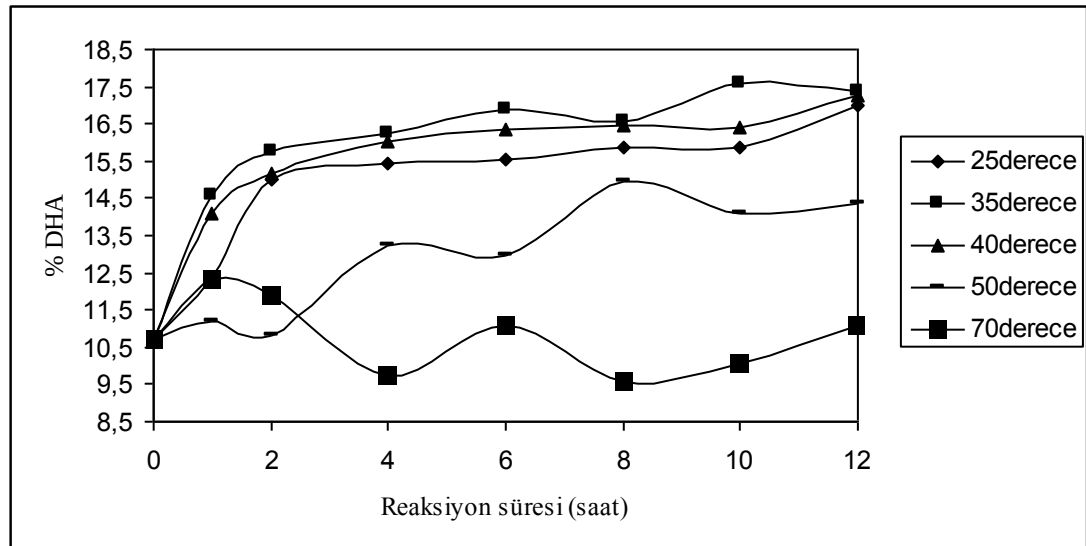
Tablo 3.18 Morina balığı karaciğer yağının 50°C ‘de enzimatik hidrolizinde ,
hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g_{yağ}, pH 5,
yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ Asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
	% Bileşim						
14:0	6,13	6,76	6,77	6,62	6,49	6,12	6,17
15:0	0,43	0,58	0,57	0,77	0,57	1,33	1,09
16:0	16,75	15,98	14,44	13,09	13,30	12,15	12,44
16:1 n-7	1,91	2,55	1,89	2,60	1,60	3,32	2,93
16:4 n-1	0,44	0,50	0,43	0,38	0,39	0,56	0,46
18:0	3,47	3,65	3,83	3,98	3,87	3,73	3,69
18:1 n-9	9,36	8,12	7,64	6,92	7,06	6,31	6,75
18:1 n-7	2,53	2,56	2,63	2,34	2,72	2,13	2,37
18:2 n-6	1,09	1,50	1,14	1,56	0,90	1,62	1,57
18:3 n-3	0,38	0,54	0,44	0,53	0,29	0,66	0,59
18:4 n-3	0,44	0,61	0,51	0,81	0,29	0,69	0,66
20:1 n-9	15,80	16,19	15,71	15,63	15,67	14,82	14,58
20:1 n-7	0,79	0,68	0,84	0,85	0,89	0,60	0,76
20:5 n-3	8,43	7,53	10,05	9,28	10,79	7,94	9,26
20:4 n-6	1,48	1,74	1,71	2,43	1,90	4,11	3,43
20:3 n-3	0,45	0,46	0,50	0,51	0,55	0,50	0,46
20:4 n-3	1,76	2,48	2,23	3,26	1,52	2,93	2,86
22:1 n-11	15,65	15,39	13,81	13,82	14,44	14,96	14,00
22:1 n-9	1,49	1,38	1,63	1,66	1,78	1,40	1,54
22:6 n-3	11,20	10,79	13,23	12,97	14,97	14,11	14,38

Tablo 3.18 ‘in incelenmesi ile 50 °C’de gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu incelendiğinde DHA miktarında 12 saat sonunda orijinal yağa göre 1,34 kat artış gözlemlendiği belirlenmiştir.

Tablo 3.19 Morina balığı karaciğer yağının 70°C 'de enzimatik hidrolizinde ,
hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (E= 2000 U/ g_{yağ}, pH 5,
yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
	% Bileşim						
14:0	7,29	7,13	8,32	7,21	7,71	7,77	7,58
15:0	0,59	0,82	0,43	0,73	0,80	0,50	0,90
16:0	18,16	17,56	19,22	17,35	18,06	18,68	18,03
16:1 n-7	1,78	2,62	1,72	2,69	3,61	2,09	3,04
16:4 n-1	0,46	0,47	0,58	0,46	0,56	0,54	0,53
18:0	3,30	3,22	3,55	3,48	3,41	3,41	3,17
18:1 n-9	12,28	11,93	12,22	11,61	11,13	11,94	11,65
18:1 n-7	2,77	2,75	2,64	2,63	2,40	2,72	2,62
18:2 n-6	1,17	1,85	1,14	1,75	2,31	1,52	1,96
18:3 n-3	0,32	0,51	0,33	0,50	0,64	0,44	0,58
18:4 n-3	0,27	0,47	0,29	0,57	0,73	0,43	0,65
20:1 n-9	13,15	12,66	14,62	13,30	13,36	13,62	12,62
20:1 n-7	0,79	0,72	0,58	0,80	0,71	0,82	0,72
20:5 n-3	9,27	8,88	8,10	8,32	7,07	8,15	8,09
20:4 n-6	1,26	1,85	0,81	1,70	1,70	1,01	1,66
20:3 n-3	0,44	0,43	0,45	0,45	0,41	0,44	0,41
20:4 n-3	1,01	1,64	0,82	1,82	2,20	1,38	1,77
22:1 n-11	11,95	11,25	13,14	12,16	12,36	13,15	11,68
22:1 n-9	1,41	1,35	1,32	1,38	1,26	1,36	1,23
22:6 n-3	12,32	11,87	9,74	11,08	9,58	10,05	11,09



Şekil 3.3 % DHA bileşiminin zamanla değişimi üzerinde sıcaklığın etkisi (2000 U/g_{yağ} enzim miktarı, pH 5, 12 saat, yağ:tampon çöz. 12 g:18 mL)

Tablolar ve Şekil 3.3 birlikte incelendiği zaman 2000 U/g_{yağ} enzim miktarı, pH 5, 12 saat sürdürülen hidrolizler sonucunda 70°C’de gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu haricinde % DHA bileşiminde zenginleşme görülmektedir. Pratikte 25, 35, 40 °C’larda % DHA miktarındaki artışın birbirine yakın olduğu söylenebilir. 50°C’de yavaş yavaş enzim aktivitesini kaybetmeye başlamış ve daha düşük sıcaklıklara nazaran daha az % DHA artışı gözlenmiştir. Enzim aktivitesinin kaybı 70°C’de tamamen ortaya çıkmıştır. 25°C, 35°C, 40 °C, 50°C ve 70°C gerçekleştirilen 12 saatlik hidrolizler sonucunda % DHA bileşimi sırasıyla % 17.00, %17.35, %17.26, %14.38, %11.09 olarak belirlenmiştir. Buna göre en yüksek DHA artışı 35°C’de gözlenmiş ve 1.62 kat zenginleştirme söz konusu olduğu belirlenmiştir.

3.6 Morina Balığı Karaciğer Yağının *Candida rugosa* İle Seçilen Koşullarda

Enzimatik Olarak Üretilen Hidroliz Ürünün Fraksiyonlarına Ayrılması ve Her Fraksiyonun Yağ Asitleri Bileşiminin Saptanması

Morina karaciğer yağı *Candida rugosa* enzimi ile 12 saat süre ile pH 5 ortamında 35°C’ de ve yağ:tampon çözelti (12 g:18 mL) oranında hidroliz edilmiş ve ele geçen hidroliz ürününün bileşenleri Bölüm 3.2.3’te anlatıldığı gibi belirlenmiş, TG, DG, ve MG fraksiyonlarına ayrılması Bölüm 3.2.4 ‘de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. TG, DG ve MG fraksiyonlarının içerdiği yağ asitleri; yağ asitleri metil esterlerine Bölüm 3.2.5 ‘te belirtildiği şekilde dönüştürülmüş ve gaz kromatografisi ile saptama yapılmıştır. Hidroliz ürününün bileşenlerinin zamanla değişimi Tablo 3.20’de, bu bileşenlerin içerdiği yağ asitleri bileşimi Tablo 3.21, Tablo 3.22, Tablo 3.23’te verilmiştir.

Tablo 3.20 Hidroliz ürününün bileşenlerinin zamanla değişimi (2000 U/g_{yağ}, pH 5, 35°C, yağ:tampon çözelti 12 g:18 mL)

Reaksiyon Süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
1	66.70	22.26	0.60	10.44
2	57.12	25.68	1.10	16.10
4	41.50	23.52	4.56	30.42
6	35.35	23.19	3.12	38.34
8	28.73	25.02	4.01	42.24
10	24.65	20.73	6.18	48.44
12	23.03	19.10	8.37	49.50

Tablo 3.21 Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 1. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g_{yağ}, 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ Asitleri	% Bileşim			
	TG	DG	MG	YA
14:00	7,80	8,81	16,50	17,20
15:00	2,34	2,76	-	1,01
16:00	18,56	20,57	27,00	27,30
16:1 n-7	5,86	5,92	6,64	6,47
16:4 n-1	0,46	0,58	-	1,15
18:00	2,98	2,60	3,56	4,02
18:1 n-9	9,00	7,40	13,48	11,73
18:1 n-7	2,89	2,50	2,32	2,68
18:2 n-6	2,72	5,89	3,02	2,96
18:3 n-3	1,18	1,02	0,65	3,07
18:4 n-3	1,40	0,99	-	-
20:1 n-9	7,73	7,56	-	-
20:1 n-7	0,32	0,30	0,50	0,52
20:5 n-3	7,24	6,89	6,62	4,60
20:4 n-6	3,51	3,20	2,01	1,60
20:3- n-3	0,09	0,11	-	0,29
20:4 n-3	3,51	3,27	3,02	1,60
22:1 n-11	8,04	6,89	5,68	7,90
22:1 n-9	0,62	0,52	-	-
22:6 n-3	13,75	12,22	9,00	5,90
Doymuş yağ asitleri	31,68	34,74	47,06	49,53
Teklidoymamış yağ asitleri	34,46	31,09	28,62	29,3
Çiftlidoymamış yağ asitleri	2,72	5,89	3,02	2,96
Çoklidoymamış yağ asitleri	31,14	28,28	21,3	18,21
DHA	13,75	12,22	9,0	5,9

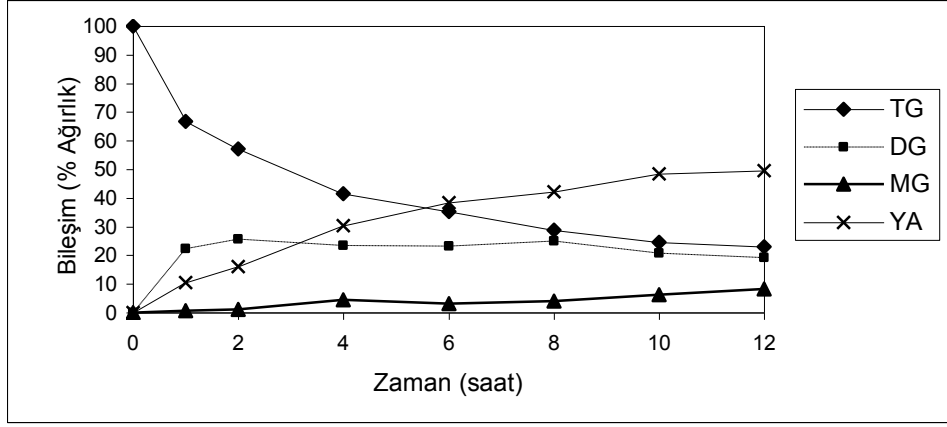
Tablo 3.22 Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 6. saat sonunda ,
hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g_{yağ}, 35°C, pH 5,
yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ Asidi	% Bileşim			
	TG	DG	MG	YA
14:00	7,68	8,12	15,14	15,89
15:00	1,34	1,48	0,05	1,19
16:00	16,14	18,47	24,56	29,32
16:1 n-7	4,96	5,11	6,56	6,23
16:4 n-1	0,40	0,48	0,50	1,24
18:00	2,34	2,20	3,40	3,62
18:1 n-9	8,79	7,51	11,90	10,56
18:1 n-7	1,85	1,62	2,08	2,18
18:2 n-6	2,74	6,24	2,89	2,45
18:3 n-3	0,92	0,98	0,84	2,56
18:4 n-3	1,65	0,81	0,69	0,88
20:1 n-9	8,94	8,24	4,01	3,80
20:1 n-7	0,20	0,24	0,48	0,52
20:5 n-3	8,90	8,70	6,89	4,04
20:4 n-6	3,69	3,11	1,90	1,42
20:3- n-3	-	0,05	0,20	0,22
20:4 n-3	3,44	3,20	3,61	1,74
22:1 n-11	7,40	7,24	5,90	5,50
22:1 n-9	1,72	1,50	0,18	0,32
22:6 n-3	16,90	14,70	8,22	6,32
Doymuş yağ asitleri	27,5	30,27	43,15	50,02
Teklidoymamış yağ asitleri	33,86	31,46	31,11	29,11
Çiftlidoymamış yağ asitleri	2,74	6,24	2,89	2,45
Çoklidoymamış yağ asitleri	35,9	32,03	22,85	18,42
DHA	16,9	14,7	8,22	6,32

Tablo 3.23 Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 12. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g_{yağ}, 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Yağ Asidi	% Bileşim			
	TG	DG	MG	YA
14:00	7,56	7,69	14,14	15,20
15:00	1,20	1,34	0,16	0,90
16:00	16,90	19,84	26,00	30,49
16:1 n-7	4,11	4,28	6,79	5,90
16:4 n-1	1,21	1,02	0,68	1,18
18:00	1,90	1,72	3,17	3,39
18:1 n-9	8,40	7,20	12,05	11,19
18:1 n-7	1,58	1,42	2,12	2,30
18:2 n-6	3,46	5,90	2,75	2,37
18:3 n-3	0,99	1,01	1,00	2,27
18:4 n-3	1,94	1,32	1,46	1,75
20:1 n-9	9,02	8,84	4,97	4,01
20:1 n-7	0,18	0,20	0,68	0,77
20:5 n-3	10,19	9,20	6,44	3,65
20:4 n-6	2,65	2,60	2,02	0,48
20:3- n-3	-	0,08	0,12	0,22
20:4 n-3	3,30	3,10	3,66	2,06
22:1 n-11	6,05	6,60	4,27	5,57
22:1 n-9	1,76	1,54	0,24	0,46
22:6 n-3	17,60	15,10	7,28	5,84
Doymuş yağ asitleri	27,56	30,59	43,47	49,98
Teklidoymamış yağ asitleri	31,1	30,08	31,12	30,2
Çiftlidoymamış yağ asitleri	3,46	5,9	2,75	2,37
Çoklidoymamış yağ asitleri	37,88	33,43	22,66	17,45
DHA	17,6	15,1	7,28	5,84

Hidroliz reaksiyonunun yürüyüşünü daha iyi görebilmek için, hidroliz ürün bileşiminin zamanla değişimi grafiği Şekil 3.4’ te gösterilmiştir.

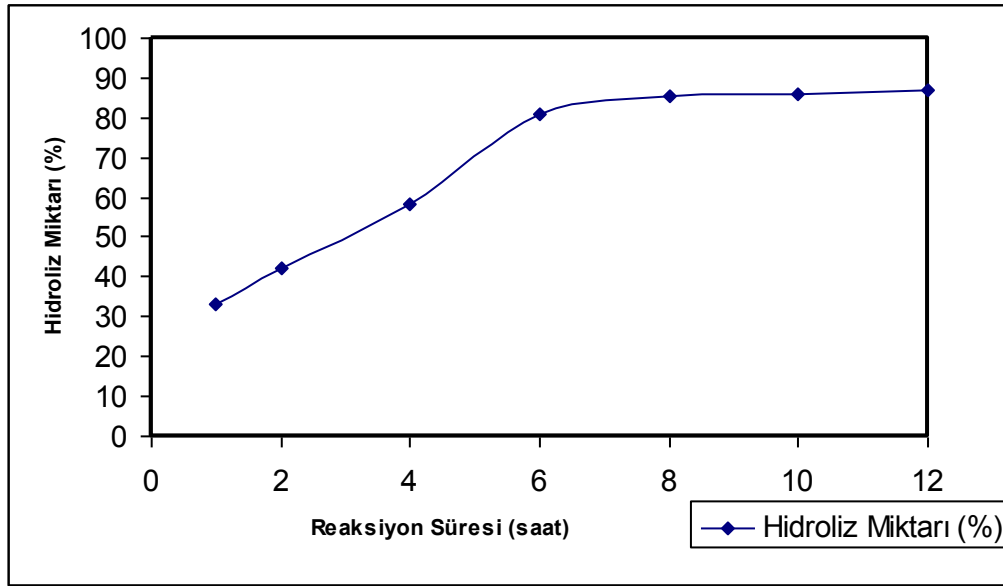


Şekil 3.4 hidroliz ürün bileşiminin zamanla değişimi (2000U/g_{yağ}, 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:18 mL)

Ayrıca optimum koşullarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonunun % hidroliz değerleri Tablo 3.24 ve grafiği Şekil 3.5 ‘te gösterilmiştir.

Tablo 3.24 Optimum koşullarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonunun % hidroliz değerleri

Reaksiyon Süresi (saat)	Hidroliz Miktarı (%)
1	33,3
2	42,4
4	58,2
6	80,9
8	85,4
10	85,8
12	86,7



Şekil 3.5 Optimum koşullarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonunun % hidrolizi

Bu bölümdeki tüm şekil ve tablolar birlikte incelendiğinde hidroliz reaksiyonu boyunca trigliseridlerin azaldığı ve yağ asitlerinin arttığı gözlenmektedir. Çokludoymamış yağ asitlerince en yüksek derecede zenginleşme, hidrolize olmayan trigliserid fraksiyonundadır. Orijinal balık yağına göre % 29,27 civarında olan PUFA yüzdesi %37,9 'a yükselmiştir. Aynı fraksiyonda DHA % 17,6'dır. Orijinal yağa göre DHA 1,64 kat daha konsantre hale gelmiştir.

Digliserid fraksiyonunda da PUFA'ca zenginleşme görülmektedir. PUFA yüzdesi %33,43 'e yükselmiştir. Bu fraksiyonda DHA % 15,1'dir. DHA orijinal yağa göre 1,41 kat daha konsantre hale gelmiştir. Literatürde bizim deneylerimizde kullandığımız non-spesifik olan *Candida rugosa* lipazı gibi non-spesifik olan *Candida cylindracea* lipazı ile tuna yağının hidrolizi sonucu DHA trigliserid fraksiyonunda daha fazla zenginleşme göstermiştir. [35]

3.7 Morina Balığı Karaciğer Yağının *Candida rugosa* İle Hidroliz

Reaksiyonunun Yürüyüşüne Çözücü türü ve Çözücü Oran Etkisi

Yapılan çalışmalar sonucunda morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizi ile DHA'ca zengin ürünler elde edileceği belirlenmiştir. Çalışmanın bu bölümünde ise, yağ:tampon çözelti oranının 12g:24 mL olarak değiştirilmesi, tampon çözelti yerine su kullanılarak hidrolizin gerçekleştirilmesi, ve çözücü olarak hekzanın kullanılması ile hidroliz ürünü bileşimlerinde değişim olup olmadığı , DHA'ca konsantre ürün elde

edilip edilemeyeceği incelenecektir. Deneylerde daha önce belirlenmiş olan optimum sıcaklık olan 35 °C ve optimum enzim miktarı olarak 2000U/g_{yağ} kullanılmıştır. Çözücü olarak hekzan kullanıldığında çözücü ve tampon çözelti miktarları 24 mL ve 12 mL olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda gerçekleştirilen hidroliz deneylerinin sonucunda hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi Tablo 3.25, Tablo 3.26 ve Tablo 3.27’de verilmiştir.

Tablo 3.25 Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 12. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000 U/g_{yağ}, 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz., 12 g:24 mL)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
	%Bileşim						
14:00	5,30	5,91	6,09	4,61	7,09	4,74	4,85
15:00	3,43	2,51	1,93	3,33	1,38	4,21	4,72
16:00	11,88	12,39	12,25	8,72	13,97	8,91	8,63
16:1 n-7	8,22	6,27	4,73	7,28	2,83	8,38	9,14
16:4 n-1	0,26	0,27	-	-	-	-	-
18:00	2,61	3,19	3,40	2,91	3,72	2,17	2,30
18:1 n-9	7,22	6,98	5,94	4,32	6,28	4,32	4,26
18:1 n-7	1,78	1,95	1,82	1,57	2,25	1,58	1,53
18:2 n-6	5,02	3,65	2,34	3,69	1,33	4,25	4,52
18:3 n-3	-	-	-	-	-	-	-
18:4 n-3	1,46	1,22	1,09	1,59	-	1,79	1,90
20:1 n-9	10,28	12,19	13,73	11,06	15,73	8,82	8,72
20:1 n-7	0,44	0,59	0,53	0,47	-	-	-
20:5 n-3	5,49	6,30	6,44	6,16	6,02	5,46	5,44
20:4 n-6	7,45	5,86	6,21	9,34	3,25	9,73	10,18
20:3 n-3	0,34	0,38	1,43	0,37	-	-	-
20:4 n-3	4,66	4,13	3,64	5,88	2,23	6,36	7,29
22:1 n-11	9,25	11,27	13,26	11,17	16,15	11,73	8,02
22:1 n-9	0,92	1,19	1,33	1,04	1,39	0,70	0,81
22:6 n-3	13,98	13,76	13,85	16,50	16,39	16,83	17,70
Doymuş yağ asitleri	23,22	24,00	23,66	19,56	26,16	20,04	20,49
Teklidoymamış yağ asitleri	38,10	40,43	41,33	36,91	44,62	35,53	32,48
Çiftlidoymamış yağ asitleri	5,02	3,65	2,34	3,69	1,33	4,25	4,52
Çoklidoymamış yağ asitleri	32,18	30,69	31,57	38,25	27,89	38,38	40,61
DHA	13,98	13,76	13,85	16,50	16,39	16,83	17,70

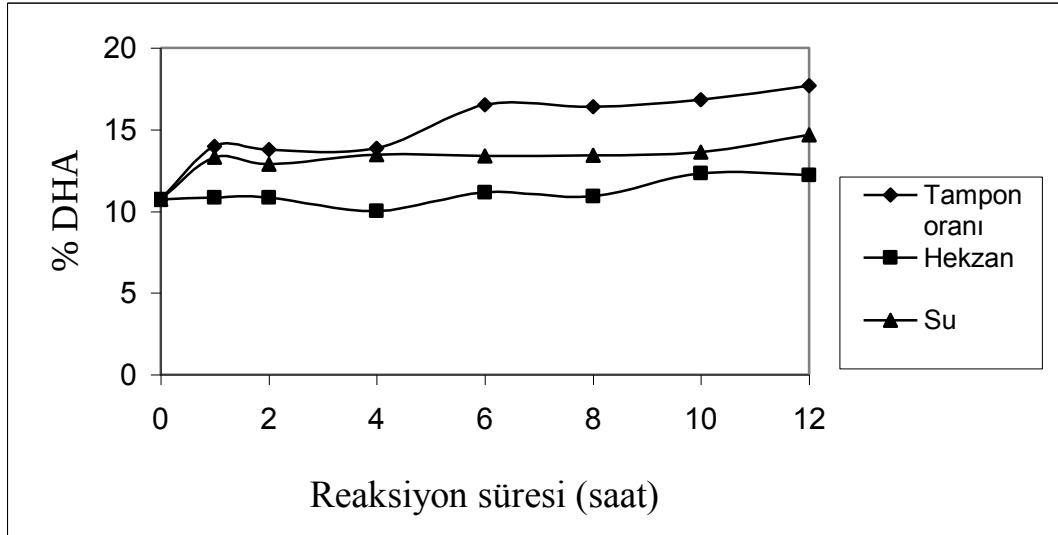
Tablo 3.26 Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 12. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g_{yağ}, 35°C, pH 5, su kullanımı)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
	%Bileşim						
14:00	6,89	7,25	7,81	7,13	7,40	6,92	6,43
15:00	1,23	0,91	0,91	1,07	0,83	1,75	1,93
16:00	15,28	16,22	17,16	15,85	16,17	15,43	14,20
16:1 n-7	3,97	3,06	3,04	3,37	2,86	4,50	4,98
16:4 n-1	0,42	0,44	0,45	0,53	0,46	0,43	0,43
18:00	7,25	3,63	3,71	3,58	3,72	3,00	3,04
18:1 n-9	9,93	10,22	10,25	9,97	10,16	9,63	8,94
18:1 n-7	2,34	2,52	2,41	2,50	2,57	2,62	2,34
18:2 n-6	2,83	2,04	1,88	2,17	1,79	2,88	3,10
18:3 n-3	0,86	0,63	0,62	0,71	0,58	0,91	0,94
18:4 n-3	0,92	0,69	0,70	0,83	0,70	0,89	1,30
20:1 n-9	13,13	13,79	14,11	13,48	14,05	11,28	11,26
20:1 n-7	0,67	0,78	0,69	0,77	0,86	0,67	0,68
20:5 n-3	7,26	7,82	7,45	7,78	8,19	8,93	9,57
20:4 n-6	2,85	2,13	1,93	2,42	1,87	3,37	3,74
20:3 n-3	0,45	0,48	0,47	0,50	0,50	0,40	0,38
20:4 n-3	3,15	2,31	2,14	2,42	2,21	2,98	3,40
22:1 n-11	12,05	12,81	12,97	12,36	12,69	9,93	9,93
22:1 n-9	1,35	1,41	1,28	1,40	1,47	1,23	1,19
22:6 n-3	10,85	10,85	10,02	11,15	10,91	12,34	12,20
Doymuş yağ asitleri	30,65	28,02	29,59	27,64	28,12	27,10	25,61
Teklidoymamış yağ asitleri	43,44	44,60	44,75	43,86	44,66	39,86	39,32
Çiftlidoymamış yağ asitleri	2,83	2,04	1,88	2,17	1,79	2,88	3,10
Çoklidoymamış yağ asitleri	25,84	24,66	23,08	25,51	24,73	29,37	30,68
DHA	10,85	10,85	10,02	11,15	10,91	12,34	12,20

Tablo 3.27 Morina balığı karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde 12. saat sonunda , hidroliz ürünlerinin yağ asitleri bileşimi (2000U/g_{yağ}, 35°C, pH 5, yağ:tampon çöz:çözücü, 12g:12 mL:24 mL)

Yağ asitleri	Reaksiyon Süresi (saat)						
	1	2	4	6	8	10	12
	%Bileşim						
14:00	4,95	5,13	4,96	4,91	4,22	5,21	4,04
15:00	3,68	3,26	3,56	3,49	4,14	3,37	4,59
16:00	11,62	12,09	11,50	11,38	9,49	11,77	8,96
16:1 n-7	9,59	8,55	9,21	8,90	10,44	8,59	11,26
16:4 n-1	0,25	0,26	0,26	0,26	0,38	0,26	0,21
18:00	2,39	2,43	2,51	2,38	2,23	2,58	2,15
18:1 n-9	7,92	8,24	7,78	7,76	6,68	7,82	6,15
18:1 n-7	1,69	1,80	1,72	1,78	1,56	1,83	1,45
18:2 n-6	6,93	6,19	6,59	6,32	7,26	5,98	7,90
18:3 n-3	0,12	1,71	0,12	1,80	0,27	0,12	0,15
18:4 n-3	1,60	1,52	1,63	1,54	1,93	1,57	2,01
20:1 n-9	8,90	9,17	9,19	8,96	8,17	9,49	7,60
20:1 n-7	0,46	0,48	0,47	0,47	0,60	0,50	0,39
20:5 n-3	5,41	5,66	5,36	5,45	5,06	5,66	4,53
20:4 n-6	7,16	6,53	7,19	7,11	9,70	6,88	9,59
20:3 n-3	0,31	0,32	0,30	0,31	0,31	0,32	0,28
20:4 n-3	5,32	4,94	5,26	5,11	5,91	5,10	6,57
22:1 n-11	7,52	8,03	8,00	7,80	7,36	8,43	6,74
22:1 n-9	0,87	0,81	0,92	0,86	0,86	0,90	0,74
22:6 n-3	13,32	12,86	13,46	13,40	13,44	13,62	14,68
Doymuş yağ asitleri	22,64	22,91	22,54	22,16	20,08	22,92	19,74
Teklidoymamış yağ asitleri	36,94	37,09	37,31	36,54	35,67	37,58	34,34
Çiftlidoymamış yağ asitleri	6,93	6,19	6,59	6,32	7,26	5,98	7,90
Çoklidoymamış yağ asitleri	31,88	32,28	31,94	33,44	35,06	31,95	36,02
DHA	13,32	12,86	13,46	13,40	13,44	13,62	14,68

Tablolar incelendiğinde % DHA bileşiminin zamanla değişimi üzerinde çözücü türü ve çözücü oran etkisini daha iyi görebilmek için Şekil 3.6 grafik ile gösterimi yer almaktadır.



Şekil 3.6 % DHA bileşiminin zamanla değişimi üzerinde çözücü türü ve çözücü oran etkisi. (2000 U/g_{yağ} enzim miktarı, 35°C)

Tabloların ve Şekil 3.6 'nın incelenmesi sonucunda hidroliz ortamındaki yağ konsantrasyonunun seyreltilmesi ile DHA ve PUFA'ca zenginleşme görülmektedir. DHA orijinal yağa göre 1,65 kat daha konsantre durumdadır. Tampon kullanımı yerine su kullanıldığı takdirde zenginleştirmenin istenildiği kadar iyi olmadığı görülmektedir. Reaksiyonun çözücü ortamında gerçekleştirilmesi ile de DHA ve çokludoymamış yağ asitlerince de zenginleşme olduğu görülmektedir. Özellikle tampon oranı değiştirildiğinde zenginleşme açısından daha yüksek değerlere erişildiği gözlenmektedir.

4. SONUÇLAR ve YORUMLAR

Bu çalışmada Sanofi-Synthelabo İlaç firmasından temin edilen soğuk su balığı olan morina balığı karaciğer yağından enzimatik hidroliz yolu ile DHA'nın zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. İlk olarak morina balığı karaciğer yağının yağ asitleri bileşimi belirlenmiştir. Tablo 3.3 incelendiğinde morina balığı karaciğer yağında % 10,72 oranında DHA bulunduğu görülmüştür. Balık yağı yağ asitleri bileşimi içerisinde EPA ve PUFA bileşenleri sırasıyla %7,28 ve % 29,27 oranında yer almaktadır.

Morina balığı karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile enzimatik hidrolizinde, bu enzim ilk defa denendiği için, DHA 'nın zenginleştirilmesi üzerinde pH ve sıcaklığın etkisini incelemek üzere diğer reaksiyon parametreleri olan enzim miktarı, süre, tampon çözelti türü ve oranının reaksiyona etkileri sistematik olarak incelenmeye alınmıştır.

Hidroliz reaksiyonu için en uygun sıcaklık ve pH değerlerini bulmadan önce reaksiyonda kullanılması gereken enzim miktarı ve reaksiyon süresi 1. seri deneylerde incelenmiştir. Bu deneylerde elde edilen sonuçlar Tablo 3.6- Tablo 3.9'da görülmektedir. 48 saatlik hidrolizler sonucunda % DHA bileşiminde 400 U/g_{yağ} enzim miktarı ile çalışıldığında 1,21 kat, 1000 U/g_{yağ} enzim miktarı ile çalışıldığında 1,48 kat, 2000 U/g_{yağ} enzim miktarı ile çalışıldığında 1,55 kat, 5000 U/g_{yağ} enzim miktarı ile çalışıldığında 1,65 kat artış gözlenmiştir. % hidroliz değerlerinin de bulunmasıyla süre optimizasyonu yapılarak 24. saatten sonra hidrolizde belirgin bir artış gözlenmemiştir. Amacın daha kısa zamanda reaksiyon yürütmek ve düşük enzim miktarında yüksek DHA miktarı elde etmek olduğu göz önünde tutulursa, enzim miktarı ve süre 2000 U/g_{yağ} ve 12 saat olarak belirlenmiştir.

Enzim miktarı ve süreye karar verdikten sonra hidroliz reaksiyonu için önemli parametreler olan uygun pH ve sıcaklık değerleri belirlenmiştir. 2. seri deneylerde pH 3, 5, 7, 8, 9 değerlerinde çalışılmış ve enzimin pH 5 ve pH 8 aralığında

aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. pH 5 ortamında hidrolizlenme derecesinin artması ile DHA artışı da gözlenmiş ve DHA orijinal yağa göre 1,62 kat daha konsantre hale geçmiştir. Sıcaklık deneylerinde ise enzimin 25°C-50°C aralığında aktivitesini koruduğu, 70°C'ye kadar sıcaklık arttırıldığında ise enzimin inaktive olduğu görölmüştür. En iyi DHA artışının 35°C' de olduğu belirlenmiştir.

Morina balığı karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile enzimatik hidrolizi için parametreler 2000 U/g_{yağ}, pH 5, 35°C, 12 saat olarak belirlendikten sonra HPLC yöntemi ile hidroliz ürünü bileşimindeki TG:DG:MG:YA bileşenleri oranı 23,03:19,10:8,37:49,50 olarak bulunmuştur. TG ve DG fraksiyonlarındaki DHA yüzdesi sırasıyla 17,6, 15,1 değerlerine yükselmiştir. Orijinal yağa göre DHA'in zenginleştirilmesi 1,64 kat daha konsantre hale gelmiştir. Digliserid fraksiyonunda da PUFA'ca zenginleşme görölmektedir. PUFA yüzdesi %33,43 'e yükselmiştir. Bu fraksiyonda DHA % 15,1'dir. DHA orijinal yağa göre TG fraksiyonunda 1,64 kat DG fraksiyonunda 1.41 daha konsantre hale gelmiştir. Literatürde de somon balığı ve *Candida rugosa* ile yapılan çalışmada DHA'in trigliserid fraksiyonunda daha çok zenginleştiği orijinal yağa göre 2,2 kat daha konsantre hale geçtiği görölmüştür.[28] % Hidroliz miktarının yüksek olmasına rağmen en yüksek artışın TG fraksiyonunda görölmesinin DHA'nın TG içinde konsantre olmasına ve DHA içeren TG 'lerin daha zor hidroliz edilebildiğine bağlanabilir.

Çalışmanın son bölümünde daha önceden belirlenmiş optimum koşullarda yağ:tampon çöz. oranı ve çözücü türü değiştirilerek deneyler yapılmıştır. Bu koşullarda yağ:tampon çözelti oranının 12g:24 mL olarak değiştirilmesi, tampon çözelti yerine su kullanılarak hidrolizin gerçekeştirilmesi, ve çözücü olarak hekzanın kullanılması ile DHA yüzdeleri sırasıyla 1,65 kat, 1,14 kat, 1,37 kat daha konsantre hale geçmiştir. Buradan görölüyor ki her bir reaksiyon koşulunda DHA zenginleştirilmiştir. En iyi zenginleştirmenin yağ:tampon oranı arttırıldığında ortaya çıktığı görölmektedir. Bu çalışmanın devamında tampon oranı etkisinin pH ve sıcaklığın optimize edilmesinde etkisi incelenebilir.

Sonuç olarak , morina balığı karaciğer yağının *Candida rugosa* enzimi ile sulu veya hekzanlı ortamda enzimatik hidrolizi sonucunda, DHA'ca zenginleşmiş ürünler elde edilebilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] www.nutrition.org.uk/news/keyfacts/n3fattyacids.htm
- [2] <http://www.benbest.com/health/dha.html>
- [3] www.jefo.ca/pdf/PROME-AN.PDF
- [4] <http://www.powerpak.com/CE/omega3/dietitian/lesson.cfm>
- [5] <http://www.nf-2000.org/secure/Fair/S1015.htm>
- [6] <http://www.acibademhastanesi.com.tr/omega.htm>
- [7] **Gabor, H. And Abraham, S.,** 1986, effects of dietary menhaden oil on tumor cell loss and the accumulation of mass of transplantable mammary in mice, J Natl. Cancer Ins, **76**, pp.1223-1229
- [8] **United Nations Food and Agriculture Organization,** (FAO), June 2000. World Production Of Fish Oil , Faostat and fishstat database, <http://apps.fao.org>
- [9] www.omega-3info.com
- [10] www.berkeywellness.com
- [11] www.veinlase.com/prodcarlson.html
- [12] **Swern, D.,** 1979, Bailey's Industrial Oil and Faty Products, Vol 1, Fourt ed. , pp 442-453, John Willey and Sons
- [13] www.vitaminuk.com
- [14] www.veinlase.com/prodcarlson.html
- [15] www.mercola.com/forms/foq.html
- [16] www.royal_health.com/dhaproma.html
- [17] www.oilofpisces.com/generalhealtyeffects.com
- [18] **Wille, H.J. and Traitler, H. and Kelly, M.,**1987, Production of polioneic fish oil fatty acid by combined urea fraction and industrial scale preparative HPLC, Rev. Fr. Corps Gras, **34**, pp. 69-74
- [19] **Abe, Y. And Tanaka, M.,** 1984, Concentration of ethyl eicopentaenonote from Japanese sardine oil by a molecular sieve column, Fette, Seifen, Anstrichmittel, 86(1), pp.8-10.
- [21] **Stout, V.P. and Nilson, W.B. and Krzynowek and J. and Schlenk, H.,** 1990, Fractionation of fish oils and their fatty acids, In fish oils in nutrition, Van nostrond reinhold pub, pp. 73-119, New York.
- [20] **Kureha Chemical Industry Co.Ltd.,** Concentration of eicosapentaenoic acid from fish oils, Jpn. Kokai Tokyo Koho FP 5059,644, 1984, CA 101:71394
- [22] **Eisenbach, W,** 1984, Supercritical fluid extractions, Afilm demonstration, Ber. Bunsenges Phys Chem, **88**, pp 882-887.
- [23] **Gunnlaugsdottir, H., Sivik, B.,** 1995. Lipase –Catlyzed Alcoholysis of Cod Liver Oil in Supercritical Carbon Dioxide, J.Am.Oil.Chem.Soc.,**72**, 399-405
- [24] **Wanasundara, U.N., Shaidi, F.,** 1998. Lipase assisted concentration of n-3

- polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils, J.Am.Oil.Chem.Soc., **75**,945-951
- [25] **Tomatsu Hoshino and Tsuneo Yamane and Shoichi Shimizu**, 1989, Selective hydrolysis of fish oil by lipase to concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids, Agric. Biol. Chem., **54(6)**, pp.1459-1467.
- [26] **Yuji Shimada and Kazuaki Moruyama and Suguru Okazaki and Masaki Nakamura and Akiko Sugihara**, 1994, Enrichment of polyunsaturated fatty acids with geotrichum candidum lipase, JAOCS, **71**, no 9, September 1994, pp. 951-954.
- [27] **Yukihisa Tanaka and Jiro Hirano and Tadashi Funada**, 1992, Concentration of Docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with candida cylindracea lipase, JAOCS, **69**, no 12, pp.1210-1214.
- [28] **Sun, T. and Pigott G.M. and Herwing R.P.**, 2002, Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids from viscera of farmed atlantic somon (salmo solor), Journal of food science, **67**, no 1, pp. 130-136
- [29] **Yuji Shimado and Kazuaki Maruyama and Akiko Sugihara and Shigeru Mariyama and YoshioTominaga**, 1997, Purification of docosahexaenoic acid from tuna oil by a two step enzymatic method: Hydrolysis and selective esterification, JAOCS, **74**, no 11, pp. 1441-1446.
- [30] **Üstün, G. ve Arer, G.**, 1995, Hamsi yağından n-3 çokludoymamış yağ asitlerinin enzimatik üretimi, Yüksek lisans tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [31] **Üstün, G. ve Erturhan,A.**, 2001, Menhaden balık yağından enzimatik hidroliz ile çokludoymamış yağasitlerinin zenginleştirilmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [32] **Kalaycıoğlu, L., Serpek , B., Nizamhoğlu, M., Başpınar, N., Tiftik, A.M.**, Mart 2000, Biyokimya, Ankara
- [33] European Pharmacopeia, published by the directorate for the quality of medicines of the council of Europe (EDQM), ISBN: 92-871-4587-3, 4th Edn., 2002.
- [34] **Güvenilir, A.Y. ve Karakaş, S.**, 2003, Isırgan otu toprak altı ve toprak üstü kısımlarında ısırgan otu ekstraktının eldesi ve özelliklerinin incelenmesi,*Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- [35] **Yukihisa Tonaka and Tadashi Funado and Jiro Hirano and Ran Hashizume**, 1993, Triglyceride specificity of candida cylindracea lipase: Effect of docosahexaenoic acid on resistance if triglyceride to lipase, JAOCS, **70**, no 10, October 1993, pp.1031-1034.

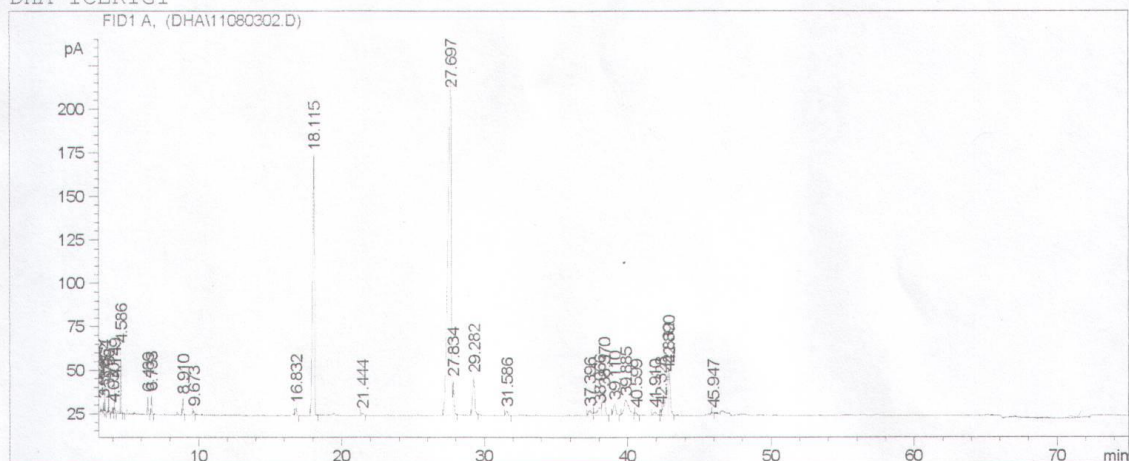
EKLER

=====

Injection Date : 11.08.2003 15:56:04
Sample Name : ZYTNYG MTL EST Vial : 1
Acq. Operator : OZLEM SIRIN -TUBA YASAR Inj : 1
Inj Volume : Manually

Acq. Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 11.08.2003 14:28:07 by OZLEM SIRIN -TUBA YASAR
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 11.08.2003 17:14:50 by OZLEM SIRIN -TUBA YASAR
(modified after loading)

DHA ICERIGI



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.204	BV S	0.0157	8.49795e4	7.83511e4	91.69487
2	2.257	VB S	0.0294	891.67596	504.76511	0.96214
3	2.329	BV X	0.0298	32.46386	14.66233	0.03503
4	2.470	VV X	0.0197	13.21309	10.14873	0.01426
5	2.581	VV X	0.0238	13.93351	8.64947	0.01503
6	2.619	VV X	0.0369	23.00626	9.30241	0.02482
7	2.818	VV X	0.0311	35.44724	15.85254	0.03825
8	2.864	VV X	0.0330	25.38132	11.38555	0.02739
9	2.928	VV X	0.0283	12.06005	6.17959	0.01301
10	3.358	VV X	0.0348	14.44956	5.75861	0.01559
11	3.464	VV X	0.0390	40.73046	16.10427	0.04395

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
12	3.738	VV X	0.0356	30.00484	12.01624	0.03238
13	4.030	VV X	0.0451	10.90965	3.63015	0.01177
14	4.149	VV X	0.0404	46.61976	17.90847	0.05030
15	4.586	BV T	0.0367	91.74448	37.90162	0.09899
16	6.489	BB	0.0522	35.39853	10.26910	0.03820
17	6.733	BB	0.0537	38.21751	10.81118	0.04124
18	8.910	BB	0.0660	41.26671	9.53320	0.04453
19	9.673	VV	0.0815	17.34043	2.62771	0.01871
20	16.832	VP	0.0995	32.61863	4.61338	0.03520
21	18.115	BB	0.1197	1375.96692	149.77095	1.48470
22	21.444	BB	0.1035	11.38949	1.30935	0.01229
23	27.697	BV	0.1994	3272.15454	205.34077	3.53073
24	27.834	VB	0.0915	137.01622	19.38425	0.14784
25	29.282	BB	0.1259	225.26968	21.47604	0.24307
26	31.586	BP	0.1260	29.12715	2.75139	0.03143
27	37.396	BV	0.1716	44.07343	3.02311	0.04756
28	38.066	VV	0.2376	90.96042	4.53309	0.09815
29	38.370	VP	0.1569	183.19215	14.11676	0.19767
30	39.110	BB	0.1422	72.86670	6.28910	0.07862
31	39.885	BB	0.2826	208.79892	8.68018	0.22530
32	40.599	BB	0.1214	16.78078	1.65345	0.01811
33	41.910	BB	0.2159	33.13002	1.82431	0.03575
34	42.328	BV	0.0407	11.65171	3.55598	0.01257
35	42.832	VV	0.1419	265.57541	22.54826	0.28656
36	42.890	VB	0.1179	261.45599	27.02447	0.28212
37	45.947	VV	0.0932	11.00252	1.41457	0.01187

Totals : 9.26764e4 7.95579e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASİTLERİ KOMPOZISYONU
SAF DHA METİL ESTERİ

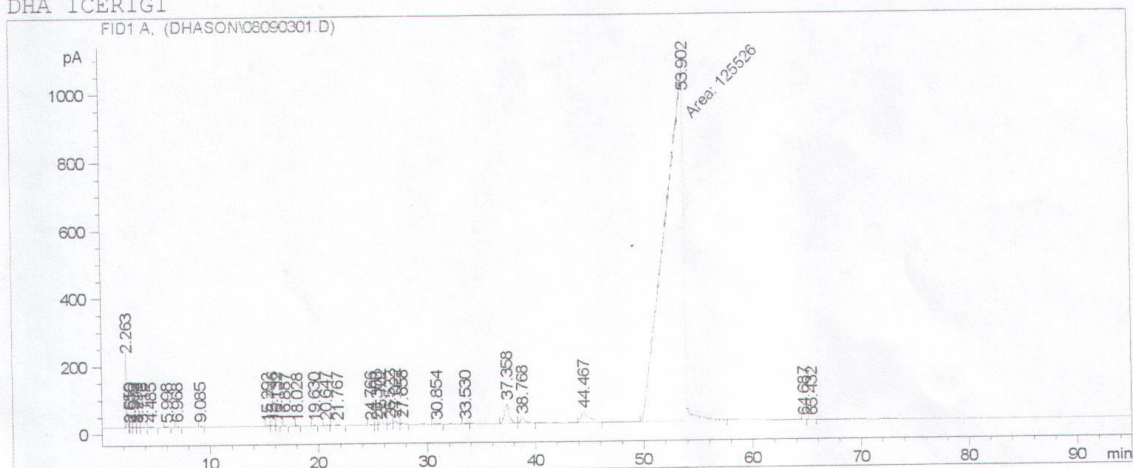
```

=====
Injection Date   : 08.09.2003 13:54:48
Sample Name      : SAF DHA
Acq. Operator    : OZLEM SIRIN - TUBA YASAR
Vial             : 1
Inj              : 1
Inj Volume       : Manually

Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 08.09.2003 14:52:00 by OZLEM SIRIN - TUBA YASAR
                  (modified after loading)
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 08.09.2003 15:32:32 by OZLEM SIRIN - TUBA YASAR
                  (modified after loading)

```

DHA ICERIGI



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.263	BV	0.0414	622.86377	205.52998	0.47645
2	2.550	VV	0.0409	4.25409	1.50783	0.00325
3	2.610	VV	0.1365	18.47146	1.73108	0.01413
4	2.973	VV	0.2156	18.62813	1.08872	0.01425
5	3.295	VV	0.2023	13.08877	8.28408e-1	0.01001
6	3.716	VB	0.2158	14.48530	8.13156e-1	0.01108
7	4.485	BB	0.3448	20.04833	7.33692e-1	0.01534
8	5.998	BV	0.2355	7.30331	3.71188e-1	0.00559
9	6.968	BB	0.1746	10.21418	7.80912e-1	0.00781
10	9.085	PB	0.1651	6.09193	4.64356e-1	0.00466

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
11	15.292	PV	0.1863	8.67111	6.08451e-1	0.00663
12	15.746	VV	0.1776	45.13290	3.34204	0.03452
13	16.132	VB	0.1528	5.64428	4.48556e-1	0.00432
14	16.887	BP	0.1785	6.33135	4.48923e-1	0.00484
15	18.028	PB	0.1949	5.84624	4.18615e-1	0.00447
16	19.630	PB	0.2199	6.66298	3.70420e-1	0.00510
17	20.647	BB	0.2108	35.82817	2.33833	0.02741
18	21.767	BB	0.3627	18.99462	6.17805e-1	0.01453
19	24.766	BV	0.2152	8.25626	4.69475e-1	0.00632
20	25.308	VV	0.1639	8.06659	6.11455e-1	0.00617
21	25.702	VV	0.2670	201.66426	9.22718	0.15426
22	26.522	VV	0.2315	74.82955	3.90583	0.05724
23	27.022	VV	0.2223	187.62169	10.11926	0.14352
24	27.658	VB	0.2317	86.82944	4.48869	0.06642
25	30.854	BB	0.2955	27.19340	1.10348	0.02080
26	33.530	PV	0.2357	20.40869	1.03679	0.01561
27	37.358	BV	0.3618	1745.77942	57.24493	1.33539
28	38.768	VB	0.3495	440.46371	15.13438	0.33692
29	44.467	PB	0.5924	1526.02673	30.25618	1.16730
30	53.902	MM	1.9617	1.25526e5	1066.47900	96.01794
31	64.687	BP	0.1652	3.15575	2.28414e-1	0.00241
32	65.432	PP	0.2485	6.94606	3.36997e-1	0.00531

Totals : 1.30731e5 1423.08453

Results obtained with enhanced integrator!

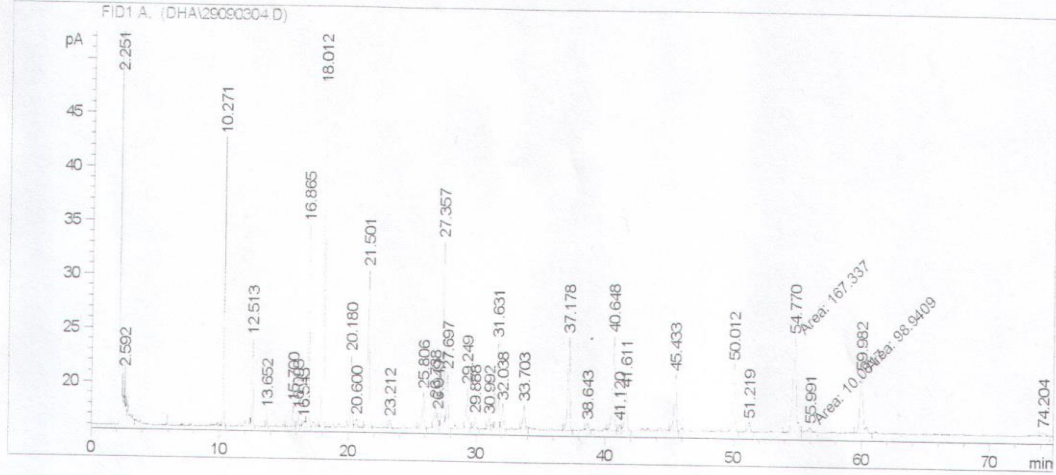
*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
ORJİNAL BALIK YAGI 2mcl

=====

Injection Date : 29.09.2003 16:18:14
Sample Name : STD
Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 25.09.2003 12:59:35 by OZLEM SIRIN
DHA ICERIGI

Vial : 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.251	BB S	0.0355	6.40449e4	4.81438e4	96.88999
2	2.592	BV X	0.0539	12.86498	3.26984	0.01946
3	10.271	VB	0.0732	121.93430	26.73293	0.18447
4	12.513	VB	0.0858	45.88951	8.13669	0.06942
5	13.652	PP	0.0926	8.24924	1.40308	0.01248
6	15.700	VV	0.1135	14.98950	2.04448	0.02268
7	16.095	VV	0.1153	10.18619	1.36104	0.01541
8	16.543	VV	0.1694	6.81976	5.47188e-1	0.01032
9	16.865	VB	0.1151	140.55878	18.81986	0.21264
10	18.012	VB	0.1141	260.47368	35.30859	0.39406
11	20.180	BV	0.1359	57.50916	6.71673	0.08700
12	20.600	VB	0.1658	9.14412	7.97124e-1	0.01383
13	21.501	BB	0.1363	130.85139	14.64308	0.19796
14	23.212	PB	0.1448	6.08330	6.52175e-1	0.00920

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
15	25.806	VB	0.1688	36.23232	3.28250	0.05481
16	26.738	BV	0.1546	24.55109	2.41590	0.03714
17	26.949	VV	0.1377	12.62508	1.39328	0.01910
18	27.357	VV	0.1618	175.54021	17.38374	0.26557
19	27.697	VB	0.1609	51.14949	5.10485	0.07738
20	29.249	BB	0.1597	38.42792	3.74599	0.05814
21	29.888	BB	0.1808	12.09786	1.03142	0.01830
22	30.992	BV	0.1704	11.19109	1.00112	0.01693
23	31.631	VV	0.1680	89.82205	8.18428	0.13589
24	32.038	VB	0.1700	25.01768	2.31622	0.03785
25	33.703	BB	0.1896	27.49961	2.20284	0.04160
26	37.178	BB	0.1856	104.89779	8.64423	0.15869
27	38.643	BB	0.1863	7.70428	6.31779e-1	0.01166
28	40.648	VV	0.1918	113.68192	8.73482	0.17198
29	41.120	VV	0.1834	6.60907	5.37755e-1	0.01000
30	41.611	VB	0.2010	46.89121	3.57466	0.07094
31	45.433	BP	0.2107	70.53367	5.18600	0.10671
32	50.012	BP	0.2042	81.56326	6.25028	0.12339
33	51.219	BP	0.2017	11.16838	8.70573e-1	0.01690
34	54.770	MM	0.3180	167.33698	8.77087	0.25315
35	55.991	MM	0.3988	10.08174	4.21364e-1	0.01525
36	59.982	MM	0.3017	98.94086	5.46612	0.14968
37	74.204	PP	0.2766	6.61580	3.05564e-1	0.01001

Totals : 6.61006e4 4.83617e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DHA\01100300.D

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

pH:7, 35°C, 1000 IU/GYAG,48.SAAT, 2mcl

Injection Date : 01.10.2003 09:45:52

Sample Name :

Vial : 1

Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

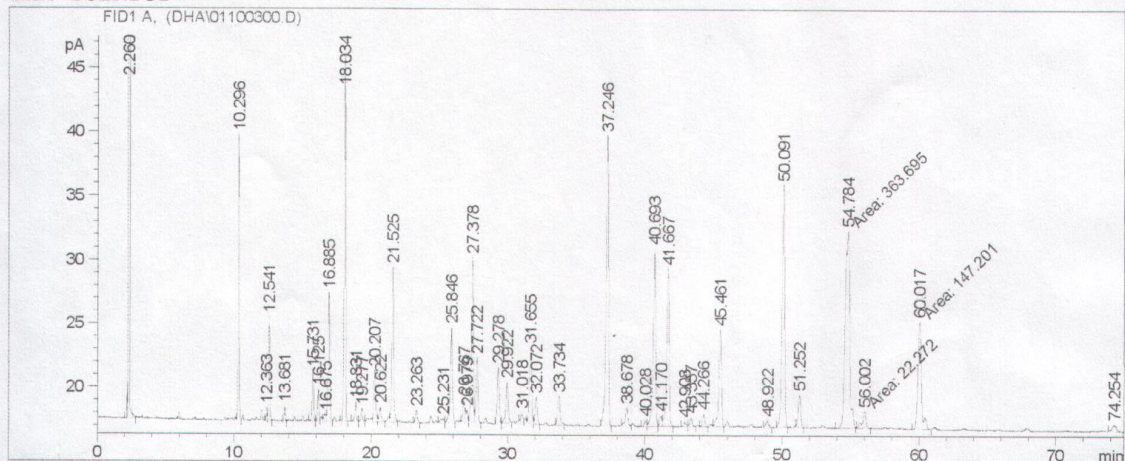
Inj : 1

Inj Volume : Manually

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M

Last changed : 25.09.2003 12:59:35 by OZLEM SIRIN

DHA ICERIGI



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.260	PB S	0.0327	1.03773e5	5.84439e4	97.33811
2	10.296	VB	0.0770	109.10429	22.34122	0.10234
3	12.363	BV	0.0881	5.55413	1.01081	0.00521
4	12.541	VB	0.0934	48.48613	8.15536	0.04548
5	13.681	PB	0.0927	6.81482	1.15796	0.00639
6	15.731	VB	0.1162	28.34428	3.92708	0.02659
7	16.125	BV	0.1159	18.74320	2.48877	0.01758
8	16.675	VV	0.1636	6.84791	5.41138e-1	0.00642
9	16.885	VV	0.1224	81.55998	10.07661	0.07650
10	18.034	VB	0.1201	219.14186	29.01682	0.20555
11	18.831	BV	0.1298	13.22353	1.51536	0.01240
12	19.277	VV	0.1383	9.04883	1.03176	0.00849
13	20.207	VV	0.1530	42.86359	4.00086	0.04021
14	20.622	VV	0.1624	12.34559	1.13919	0.01158

Instrument 1 01.10.2003 11:26:18 OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

Page 1 of 2

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DATA\01100300.D

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
15	21.525	VB	0.1336	109.89856	12.13695	0.10308
16	23.263	PP	0.1407	9.38162	9.71419e-1	0.00880
17	25.231	VV	0.2509	5.95720	3.11796e-1	0.00559
18	25.846	VV	0.1639	79.42964	7.48127	0.07450
19	26.767	BV	0.1634	19.58753	1.85114	0.01837
20	26.979	VV	0.1438	9.13735	9.89036e-1	0.00857
21	27.378	VV	0.1593	132.81546	12.96227	0.12458
22	27.722	VB	0.1608	50.90067	5.08375	0.04774
23	29.278	PP	0.1641	44.83495	4.35558	0.04205
24	29.922	VP	0.1699	36.16971	3.15119	0.03393
25	31.018	BV	0.1662	8.87554	7.71766e-1	0.00833
26	31.655	VV	0.1666	66.81638	5.96742	0.06267
27	32.072	VB	0.1640	22.54768	2.12159	0.02115
28	33.734	BB	0.1891	27.44611	2.26981	0.02574
29	37.246	BB	0.1671	278.04544	22.67508	0.26080
30	38.678	BB	0.2116	19.83546	1.41446	0.01861
31	40.028	PV	0.1820	5.06988	4.16542e-1	0.00476
32	40.693	VV	0.1947	179.24466	13.87384	0.16813
33	41.170	VV	0.1819	9.74601	8.01142e-1	0.00914
34	41.667	VB	0.1923	156.11548	12.28176	0.14644
35	42.908	BV	0.2251	5.04308	3.32305e-1	0.00473
36	43.357	VB	0.2037	8.67638	6.49960e-1	0.00814
37	44.266	BP	0.1963	12.05385	9.74453e-1	0.01131
38	45.461	VV	0.2065	102.75777	7.56492	0.09639
39	48.922	BP	0.2050	6.54447	4.74381e-1	0.00614
40	50.091	BB	0.2073	252.00926	18.93194	0.23638
41	51.252	BB	0.1955	32.81361	2.52657	0.03078
42	54.784	MM	0.3932	363.69458	15.41703	0.34114
43	56.002	MM	0.2889	22.27199	1.28478	0.02089
44	60.017	MM	0.2923	147.20132	8.39275	0.13807
45	74.254	PB	0.3124	10.85260	4.71803e-1	0.01018

Totals : 1.06611e5 5.86992e4

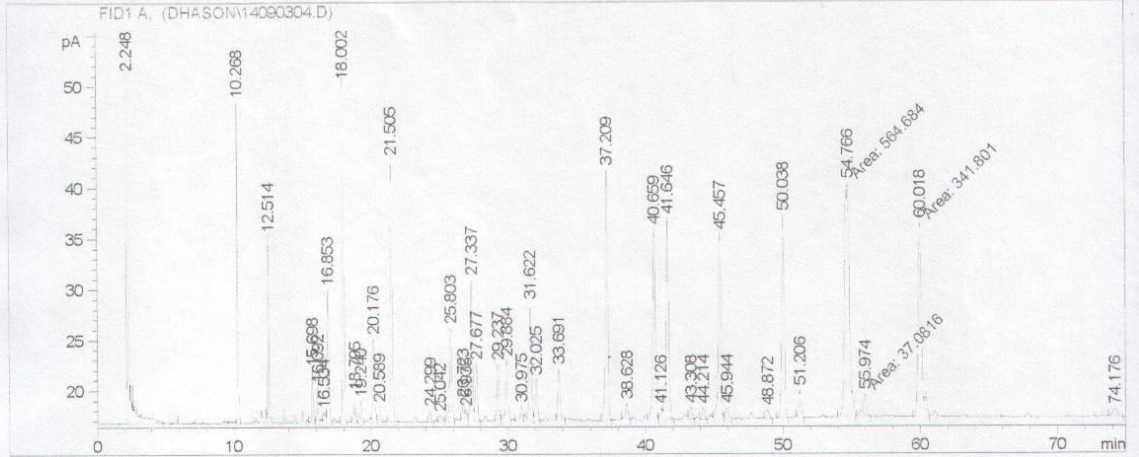
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASİTLERİ KOMPOZİSYONU

2000 IU/GYAG, 35°C, pH:5, 12. SAAT, 2mcl

Injection Date : 14.09.2003 15:24:02
Sample Name : NUMUNE Vial : 1
Acq. Operator : OZLEM SIRIN- TUBA YASAR Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 14.09.2003 09:23:03 by YAG ASİTLERİ KOMPOZİSYON
DHA ICERİGİ



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.248	BB S	0.0239	1.02232e5	7.14047e4	96.01737
2	10.268	VB	0.0738	156.83507	31.64301	0.14730
3	12.514	VB	0.0872	105.88937	18.37252	0.09945
4	15.698	VV	0.1120	37.39513	5.19114	0.03512
5	16.092	VV	0.1147	26.25427	3.53269	0.02466
6	16.534	VV	0.1557	11.28492	1.03064	0.01060
7	16.853	VV	0.1203	103.86001	13.12964	0.09755
8	18.002	VB	0.1191	277.42914	37.15345	0.26056
9	18.795	BV	0.1258	23.52208	2.80620	0.02209
10	19.240	VV	0.1308	18.06010	2.13213	0.01696
11	20.176	VV	0.1385	75.10058	8.23082	0.07054
12	20.589	VB	0.1610	17.43517	1.57624	0.01638
13	21.505	BB	0.1432	237.48262	25.84584	0.22305
14	24.299	BB	0.1470	10.70041	1.12500	0.01005

Instrument 1 14.09.2003 16:42:44 OZLEM SIRIN- TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
15	25.042	VV	0.2398	10.39765	5.95325e-1	0.00977
16	25.803	VV	0.1653	102.33889	9.23616	0.09612
17	26.723	VV	0.1564	21.40093	2.00776	0.02010
18	26.935	VV	0.1422	10.09869	1.06868	0.00948
19	27.337	VV	0.1640	148.72559	13.98750	0.13968
20	27.677	VB	0.1646	60.77827	5.69119	0.05708
21	29.237	BV	0.1629	58.77086	5.58007	0.05520
22	29.884	VV	0.1767	69.96977	5.97375	0.06572
23	30.975	VV	0.1856	19.30544	1.46595	0.01813
24	31.622	VV	0.1775	132.99028	11.61926	0.12491
25	32.025	VB	0.1673	45.14302	4.13867	0.04240
26	33.691	BB	0.1771	61.79182	5.10824	0.05804
27	37.209	BB	0.1914	303.15735	24.67011	0.28473
28	38.628	BV	0.2081	23.62077	1.67964	0.02218
29	40.659	VV	0.2035	250.42497	18.78786	0.23520
30	41.126	VV	0.1786	13.39530	1.12766	0.01258
31	41.646	VB	0.1831	249.41232	19.77525	0.23425
32	43.308	VV	0.1967	14.99817	1.14594	0.01409
33	44.214	VP	0.1971	14.03788	1.09829	0.01318
34	45.457	VV	0.2076	242.76694	18.19874	0.22801
35	45.944	VB	0.1910	12.96268	1.08812	0.01217
36	48.872	BP	0.2009	10.81350	8.24869e-1	0.01016
37	50.038	BP	0.2067	265.29227	20.01341	0.24917
38	51.206	BB	0.1981	36.45941	2.76044	0.03424
39	54.766	MM	0.4082	564.68372	23.05465	0.53036
40	55.974	MM	0.2715	37.08158	2.27609	0.03483
41	60.018	MM	0.2990	341.80133	19.05121	0.32102
42	74.176	PP	0.3525	16.52552	7.18046e-1	0.01552

Totals : 1.06472e5 7.17792e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DHA\02100301.D

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

pH:7, 35°C, 400 IU/GYAG,48.SAAT, 2mcl

Injection Date : 02.10.2003 16:29:16

Sample Name :

Vial : 1

Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

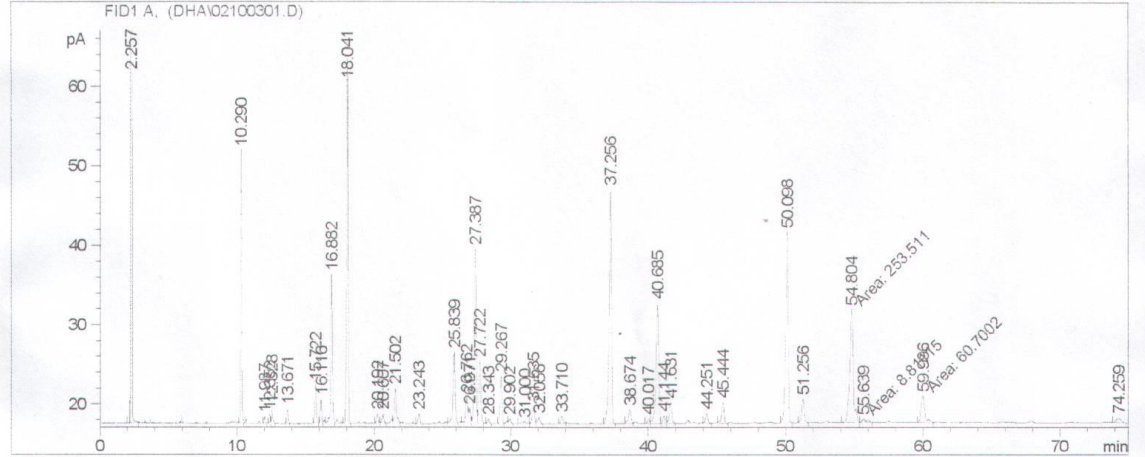
Inj : 1

Inj Volume : Manually

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M

Last changed : 25.09.2003 12:59:35 by OZLEM SIRIN

DHA ICERIGI



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.257	PB S	0.0311	9.98942e4	5.04138e4	97.24885
2	10.290	VB	0.0769	167.71306	34.38618	0.16327
3	11.987	BB	0.0906	5.04194	8.83008e-1	0.00491
4	12.352	BV	0.0850	6.96884	1.25169	0.00678
5	12.528	VB	0.0995	13.78972	2.02238	0.01342
6	13.671	PP	0.0931	11.35523	1.91836	0.01105
7	15.722	BB	0.1149	34.91273	4.91249	0.03399
8	16.116	BV	0.1160	23.60365	3.12963	0.02298
9	16.882	VV	0.1235	153.78979	18.77882	0.14972
10	18.041	VB	0.1207	366.30524	48.16397	0.35660
11	20.192	BV	0.1296	10.06806	1.20290	0.00980
12	20.607	VB	0.1465	11.01977	1.12302	0.01073
13	21.502	VB	0.1545	44.75832	4.40543	0.04357
14	23.243	BB	0.1482	11.39804	1.18473	0.01110

Instrument 1 02.10.2003 17:54:39 OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

Page 1 of 2

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\DHA\02100301.D

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
15	25.839	VV	0.1626	97.55369	8.98847	0.09497
16	26.762	VV	0.1722	37.82428	3.33791	0.03682
17	26.971	VV	0.1449	18.01358	1.92908	0.01754
18	27.387	VV	0.1649	228.12569	22.00969	0.22208
19	27.722	VB	0.1593	80.07664	7.82946	0.07796
20	28.343	BB	0.1564	6.06818	5.88077e-1	0.00591
21	29.267	BV	0.1644	62.04333	6.01179	0.06040
22	29.902	VB	0.1646	6.19015	5.79550e-1	0.00603
23	31.000	PV	0.2869	6.10778	2.75225e-1	0.00595
24	31.635	VV	0.1737	27.03296	2.35835	0.02632
25	32.056	VP	0.1733	8.78933	7.93217e-1	0.00856
26	33.710	BB	0.1861	12.16690	9.45869e-1	0.01184
27	37.256	BB	0.1756	352.17599	29.42745	0.34285
28	38.674	BV	0.2034	22.79715	1.71180	0.02219
29	40.017	PV	0.1919	6.04164	5.03906e-1	0.00588
30	40.685	VV	0.1928	197.66985	15.09311	0.19244
31	41.144	VV	0.1957	11.81731	9.33443e-1	0.01150
32	41.631	VB	0.1954	33.64191	2.59267	0.03275
33	44.251	PP	0.1859	13.85007	1.13901	0.01348
34	45.444	BB	0.2008	34.29883	2.55149	0.03339
35	50.098	BB	0.2116	328.51447	24.01725	0.31981
36	51.256	BP	0.1941	39.44696	2.98584	0.03840
37	54.804	MM	0.2962	253.51120	14.26392	0.24680
38	55.639	MM	0.3846	8.81115	3.81803e-1	0.00858
39	59.996	MM	0.3011	60.70025	3.35938	0.05909
40	74.259	BP	0.2846	11.99883	5.37152e-1	0.01168

Totals : 1.02720e5 5.06923e4

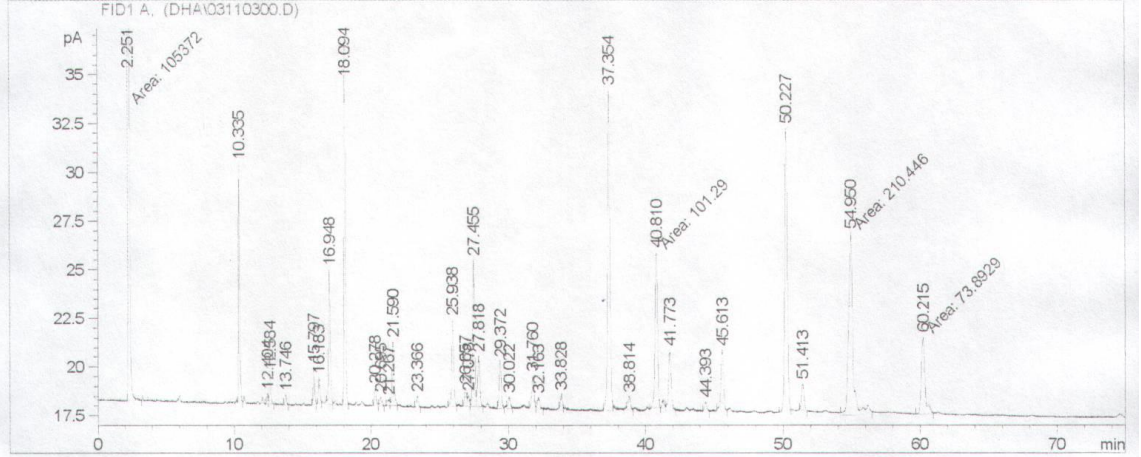
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

2000 IU/GYAG, 35°C, pH:7, 48. SAAT, 2mcl

=====
Injection Date : 03.11.2003 09:09:28
Sample Name :
Acq. Operator : OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 30.10.2003 11:12:30 by OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
DHA ICERIGI
Vial : 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.251	MM	0.0227	1.05372e5	7.73175e4	98.59905
2	10.335	BB	0.0835	71.71418	12.29611	0.06710
3	12.404	VV	0.0752	3.40818	5.62702e-1	0.00319
4	12.584	VB	0.0907	11.21411	1.53512	0.01049
5	13.746	BB	0.0879	3.49719	5.07594e-1	0.00327
6	15.797	BB	0.0899	14.28161	1.95010	0.01336
7	16.183	BB	0.0934	10.05905	1.30572	0.00941
8	16.948	VB	0.1038	58.01991	6.88571	0.05429
9	18.094	BB	0.0960	146.62183	18.59981	0.13720
10	20.278	PV	0.1112	8.43535	9.09611e-1	0.00789
11	20.695	VP	0.1250	5.14764	4.92238e-1	0.00482
12	21.267	PV	0.1179	3.28747	3.32312e-1	0.00308

Instrument 1 03.11.2003 10:33:33 OZLEM SIRIN- TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	21.590	VB	0.1225	33.36407	3.28482	0.03122
14	23.366	BB	0.1211	5.60028	5.57919e-1	0.00524
15	25.938	BB	0.1267	46.35868	4.44257	0.04338
16	26.857	BV	0.1228	9.40251	9.23375e-1	0.00880
17	27.078	VV	0.1070	5.19277	5.79643e-1	0.00486
18	27.455	VV	0.1296	78.67475	7.51756	0.07362
19	27.818	VB	0.1350	28.67789	2.57305	0.02683
20	29.372	BB	0.1283	25.77730	2.39951	0.02412
21	30.022	VB	0.1350	6.87460	6.05325e-1	0.00643
22	31.760	BV	0.1386	20.05759	1.71950	0.01877
23	32.163	VP	0.1407	7.25073	6.12103e-1	0.00678
24	33.828	BV	0.1215	7.68106	7.49633e-1	0.00719
25	37.354	BV	0.1472	195.86700	16.47231	0.18328
26	38.814	VV	0.1583	9.78725	7.32717e-1	0.00916
27	40.810	MM	0.2120	101.28963	7.96367	0.09478
28	41.773	VV	0.1601	42.02561	3.10147	0.03932
29	44.393	BB	0.1458	6.07031	4.94244e-1	0.00568
30	45.613	BB	0.1621	41.35717	3.11147	0.03870
31	50.227	PB	0.1546	188.06491	14.52059	0.17598
32	51.413	BB	0.1530	17.79062	1.37919	0.01665
33	54.950	MM	0.3757	210.44592	9.33643	0.19692
34	60.215	MM	0.3089	73.89293	3.98741	0.06914

Totals : 1.06869e5 7.74500e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

pH:7, 35°C, 5000 IU/GYAG 48.SAAT, 2mcl, 2.ENJ

Injection Date : 29.09.2003 09:31:24

Sample Name : NUMUNE

Vial : 1

Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

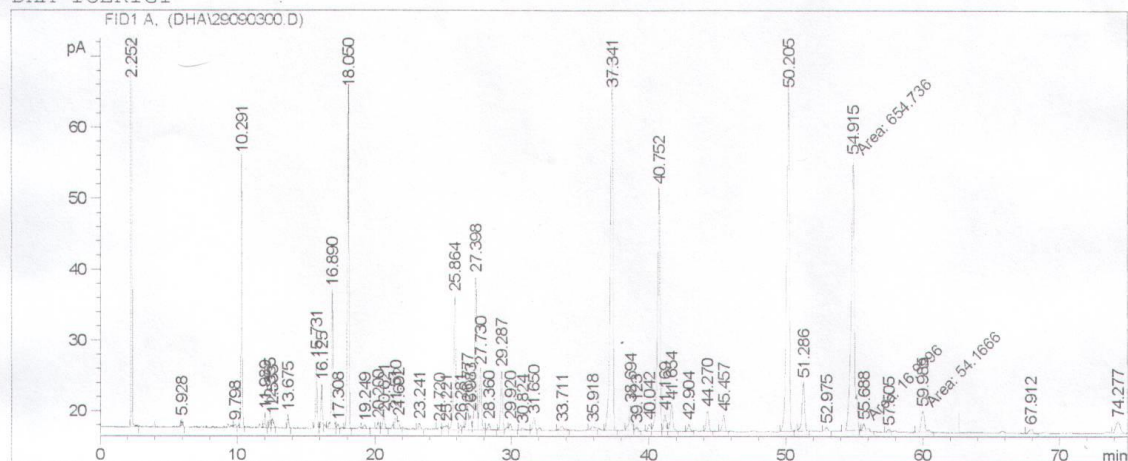
Inj : 1

Inj Volume : Manually

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M

Last changed : 25.09.2003 12:59:35 by OZLEM SIRIN

DHA ICERIGI



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.252	BB S	0.0379	9.77164e4	6.36753e4	95.34723
2	5.928	VP	0.0787	6.19560	1.08366	0.00605
3	9.798	VV	0.1438	5.33786	5.02834e-1	0.00521
4	10.291	VB	0.0806	198.27946	38.20092	0.19347
5	11.989	BB	0.0947	12.74488	2.10372	0.01244
6	12.355	BV	0.0902	14.06521	2.47792	0.01372
7	12.533	VB	0.1242	12.37484	1.38579	0.01207
8	13.675	PP	0.0972	12.22424	1.94962	0.01193
9	15.731	BV	0.1152	70.03038	9.36454	0.06833
10	16.125	VV	0.1198	47.35729	6.29326	0.04621
11	16.890	VV	0.1270	166.18140	19.57875	0.16215
12	17.308	VV	0.1409	5.19228	5.77454e-1	0.00507
13	18.050	VB	0.1178	376.48151	48.93203	0.36735
14	19.249	VB	0.1820	6.91096	5.23534e-1	0.00674

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
15	20.200	BV	0.1387	7.85257	8.92448e-1	0.00766
16	20.621	VB	0.1544	19.15137	1.82588	0.01869
17	21.510	VV	0.1424	20.82295	2.28296	0.02032
18	21.692	VB	0.1465	12.09166	1.19036	0.01180
19	23.241	BB	0.1460	8.25061	8.74774e-1	0.00805
20	24.720	BV	0.1778	5.96559	5.04921e-1	0.00582
21	25.221	VV	0.2664	10.64470	5.39041e-1	0.01039
22	25.864	VV	0.1653	202.93967	18.89843	0.19802
23	26.281	VV	0.1565	5.84888	5.66412e-1	0.00571
24	26.777	VV	0.1624	36.64334	3.38264	0.03575
25	26.983	VV	0.1484	19.15644	1.98757	0.01869
26	27.398	VV	0.1674	229.07121	21.65401	0.22352
27	27.730	VB	0.1609	92.32355	8.62233	0.09009
28	28.360	BB	0.1899	10.70893	8.80574e-1	0.01045
29	29.287	BV	0.1694	86.52941	8.31812	0.08443
30	29.920	VB	0.1582	9.61434	8.88891e-1	0.00938
31	30.824	BV	0.2474	6.39131	3.46094e-1	0.00624
32	31.650	VV	0.1757	21.36564	1.78379	0.02085
33	33.711	BB	0.2817	13.13916	6.44809e-1	0.01282
34	35.918	BB	0.3219	13.93431	5.45751e-1	0.01360
35	37.341	PB	0.1913	713.81055	53.62234	0.69650
36	38.694	BV	0.2061	48.57035	3.49644	0.04739
37	39.123	VP	0.1953	6.58587	4.82374e-1	0.00643
38	40.042	BV	0.2045	11.96110	9.39433e-1	0.01167
39	40.752	VV	0.2063	452.52466	34.20595	0.44155
40	41.169	VV	0.1854	28.21661	2.32767	0.02753
41	41.654	VB	0.2033	50.03505	3.85708	0.04882
42	42.904	BB	0.1950	12.14632	9.64285e-1	0.01185
43	44.270	BP	0.2060	35.20872	2.81309	0.03436
44	45.457	BP	0.1988	29.40800	2.27498	0.02869
45	50.205	BB	0.2026	733.31708	50.15075	0.71554
46	51.286	BB	0.2149	95.31402	6.99700	0.09300
47	52.975	BP	0.2122	6.84984	4.98703e-1	0.00668
48	54.915	MM	0.2844	654.73590	38.37077	0.63886
49	55.688	MM	0.2819	16.99958	1.00512	0.01659
50	57.505	PV	0.2191	5.41708	3.78276e-1	0.00529
51	59.985	MM	0.2921	54.16663	3.09044	0.05285
52	67.912	BP	0.2969	11.87386	5.84682e-1	0.01159
53	74.277	PP	0.3016	35.41854	1.57980	0.03456

Totals : 1.02485e5 6.40925e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

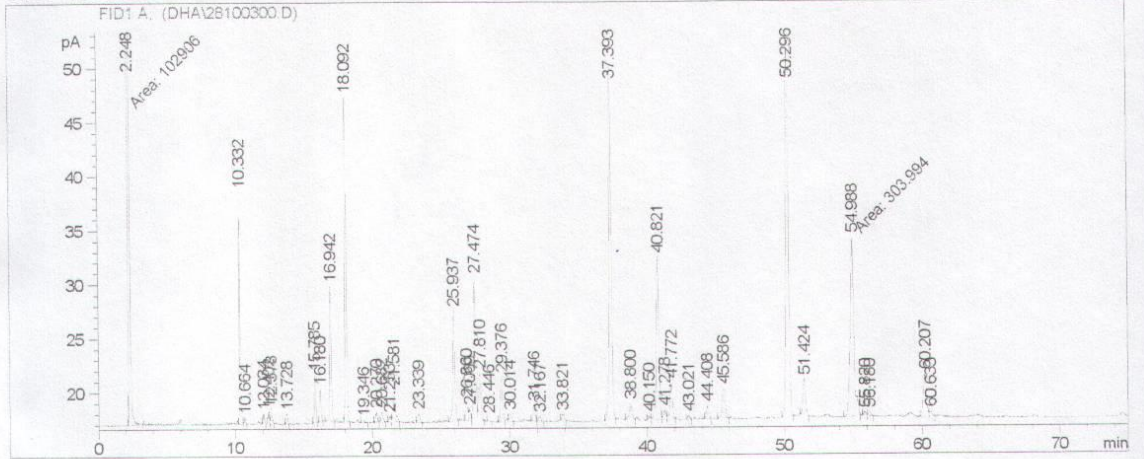
YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

2000 IU/GYAG, 35°C, pH:3, 12. SAAT, 2mcl

```
=====
Injection Date   : 28.10.2003 12:02:24
Sample Name      :
Acq. Operator    : OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
Vial             : 1
Inj              : 1
Inj Volume       : Manually

Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 28.10.2003 12:07:20 by OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
                  (modified after loading)
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 28.10.2003 13:26:21 by OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
                  (modified after loading)
=====
```

DHA ICERIGI



Area Percent Report

```
=====
Sorted By       : Signal
Multiplier      : 1.0000
Dilution        : 1.0000
=====
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.248	MM	0.0252	1.02906e5	6.80676e4	97.51131
2	10.332	VB	0.0782	115.94197	21.40995	0.10986
3	10.664	BB	0.0734	3.34212	5.86962e-1	0.00317
4	12.034	BB	0.0815	5.45309	9.02793e-1	0.00517
5	12.402	PV	0.0834	6.51169	1.13573	0.00617
6	12.578	VP	0.0921	10.47505	1.41883	0.00993
7	13.728	BB	0.0891	6.19657	9.62345e-1	0.00587
8	15.785	BP	0.0968	31.65860	4.46240	0.03000
9	16.180	PB	0.0971	22.04822	3.04154	0.02089
10	16.942	PB	0.1140	101.54626	12.46559	0.09622

Instrument 1 28.10.2003 13:26:23 OZLEM SIRIN- TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
11	18.092	BB	0.1048	233.77634	30.02181	0.22152
12	19.346	BB	0.1452	3.03414	2.49843e-1	0.00288
13	20.270	PB	0.1060	7.86797	9.23003e-1	0.00746
14	20.682	BP	0.1151	9.50838	9.94384e-1	0.00901
15	21.253	PV	0.1290	5.41527	5.01379e-1	0.00513
16	21.581	VP	0.1302	31.34036	2.95627	0.02970
17	23.339	BB	0.1182	8.62107	8.57853e-1	0.00817
18	25.937	BB	0.1286	103.86523	10.17759	0.09842
19	26.860	PV	0.1253	17.87944	1.74110	0.01694
20	27.069	VV	0.1057	9.19294	1.04462	0.00871
21	27.474	VV	0.1341	135.21040	13.19057	0.12812
22	27.810	VB	0.1427	48.68884	4.41402	0.04614
23	28.446	BP	0.1109	3.12541	3.36223e-1	0.00296
24	29.376	BB	0.1309	44.58927	4.18030	0.04225
25	30.014	VB	0.1351	8.28723	7.40040e-1	0.00785
26	31.746	BV	0.1366	17.11915	1.55358	0.01622
27	32.167	VB	0.1318	5.21474	4.74247e-1	0.00494
28	33.821	BB	0.1353	6.73885	6.08182e-1	0.00639
29	37.393	BB	0.1485	397.20593	32.63303	0.37638
30	38.800	BP	0.1514	18.64128	1.47522	0.01766
31	40.150	BV	0.1376	4.00728	3.47278e-1	0.00380
32	40.821	VV	0.1629	196.54993	15.04942	0.18625
33	41.278	VV	0.1572	11.59159	8.71083e-1	0.01098
34	41.772	VB	0.1644	42.65921	3.34288	0.04042
35	43.021	BB	0.1334	3.50769	3.11534e-1	0.00332
36	44.408	BP	0.1481	14.78991	1.21038	0.01401
37	45.586	BP	0.1585	37.08729	2.78333	0.03514
38	50.296	BB	0.1632	468.00616	34.83354	0.44347
39	51.424	BB	0.1603	45.79337	3.40825	0.04339
40	54.988	MM	0.3048	303.99448	16.62139	0.28806
41	55.820	BV	0.1447	4.18147	3.40575e-1	0.00396
42	56.180	VB	0.1523	4.73413	3.68635e-1	0.00449
43	60.207	BV	0.1967	64.32625	3.94468	0.06095
44	60.633	VB	0.1761	6.65147	4.46881e-1	0.00630

Totals : 1.05533e5 6.83069e4

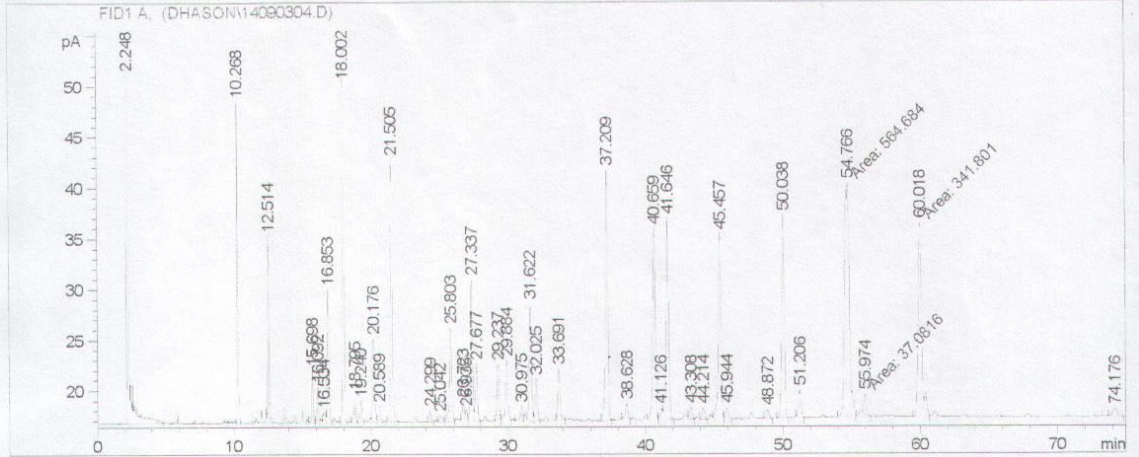
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASİTLERİ KOMPOZİSYONU

2000 IU/GYAG, 35°C, pH:5, 12. SAAT, 2mcl

Injection Date : 14.09.2003 15:24:02
Sample Name : NUMUNE Vial : 1
Acq. Operator : OZLEM SIRIN- TUBA YASAR Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 14.09.2003 09:23:03 by YAG ASİTLERİ KOMPOZİSYON
DHA ICERİGİ



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.248	BB S	0.0239	1.02232e5	7.14047e4	96.01737
2	10.268	VB	0.0738	156.83507	31.64301	0.14730
3	12.514	VB	0.0872	105.88937	18.37252	0.09945
4	15.698	VV	0.1120	37.39513	5.19114	0.03512
5	16.092	VV	0.1147	26.25427	3.53269	0.02466
6	16.534	VV	0.1557	11.28492	1.03064	0.01060
7	16.853	VV	0.1203	103.86001	13.12964	0.09755
8	18.002	VB	0.1191	277.42914	37.15345	0.26056
9	18.795	BV	0.1258	23.52208	2.80620	0.02209
10	19.240	VV	0.1308	18.06010	2.13213	0.01696
11	20.176	VV	0.1385	75.10058	8.23082	0.07054
12	20.589	VB	0.1610	17.43517	1.57624	0.01638
13	21.505	BB	0.1432	237.48262	25.84584	0.22305
14	24.299	BB	0.1470	10.70041	1.12500	0.01005

Instrument 1 14.09.2003 16:42:44 OZLEM SIRIN- TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
15	25.042	VV	0.2398	10.39765	5.95325e-1	0.00977
16	25.803	VV	0.1653	102.33889	9.23616	0.09612
17	26.723	VV	0.1564	21.40093	2.00776	0.02010
18	26.935	VV	0.1422	10.09869	1.06868	0.00948
19	27.337	VV	0.1640	148.72559	13.98750	0.13968
20	27.677	VB	0.1646	60.77827	5.69119	0.05708
21	29.237	BV	0.1629	58.77086	5.58007	0.05520
22	29.884	VV	0.1767	69.96977	5.97375	0.06572
23	30.975	VV	0.1856	19.30544	1.46595	0.01813
24	31.622	VV	0.1775	132.99028	11.61926	0.12491
25	32.025	VB	0.1673	45.14302	4.13867	0.04240
26	33.691	BB	0.1771	61.79182	5.10824	0.05804
27	37.209	BB	0.1914	303.15735	24.67011	0.28473
28	38.628	BV	0.2081	23.62077	1.67964	0.02218
29	40.659	VV	0.2035	250.42497	18.78786	0.23520
30	41.126	VV	0.1786	13.39530	1.12766	0.01258
31	41.646	VB	0.1831	249.41232	19.77525	0.23425
32	43.308	VV	0.1967	14.99817	1.14594	0.01409
33	44.214	VP	0.1971	14.03788	1.09829	0.01318
34	45.457	VV	0.2076	242.76694	18.19874	0.22801
35	45.944	VB	0.1910	12.96268	1.08812	0.01217
36	48.872	BP	0.2009	10.81350	8.24869e-1	0.01016
37	50.038	BP	0.2067	265.29227	20.01341	0.24917
38	51.206	BB	0.1981	36.45941	2.76044	0.03424
39	54.766	MM	0.4082	564.68372	23.05465	0.53036
40	55.974	MM	0.2715	37.08158	2.27609	0.03483
41	60.018	MM	0.2990	341.80133	19.05121	0.32102
42	74.176	PP	0.3525	16.52552	7.18046e-1	0.01552

Totals : 1.06472e5 7.17792e4

Results obtained with enhanced integrator!

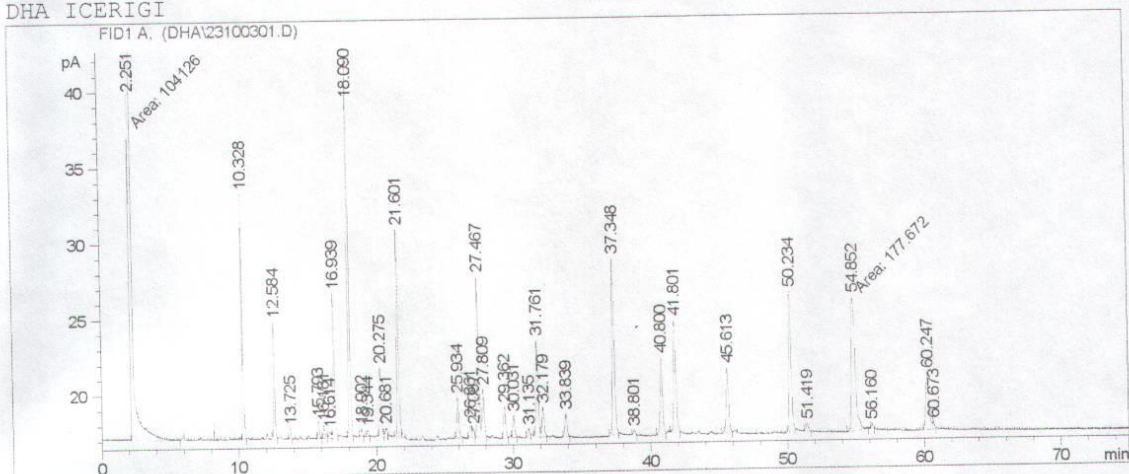
*** End of Report ***

ata File C:\HPCHEM\1\DATA\DHA\23100301.D

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
2000 IU/GYAG, 35°C, pH:8, 12.SAAT, 2 mcl

```
=====
Injection Date   : 23.10.2003 14:47:19
Sample Name      :
Acq. Operator    : OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
Vial             : 1
Inj              : 1
Inj Volume       : Manually

Method           : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 21.10.2003 12:50:29 by OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
DHA ICERIGI
```



Area Percent Report

```
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.251	MM	0.0268	1.04126e5	6.47889e4	98.47660
2	10.328	VB	0.0844	86.44055	16.14979	0.08175
3	12.584	VB	0.0940	46.84381	7.69400	0.04430
4	13.725	BB	0.0858	4.37147	6.72403e-1	0.00413
5	15.793	BB	0.1008	8.71695	1.19893	0.00824
6	16.181	BB	0.1059	7.78451	8.91162e-1	0.00736
7	16.614	BV	0.1326	4.74595	4.25492e-1	0.00449
8	16.939	VB	0.1130	74.78202	9.48453	0.07073
9	18.090	BB	0.1107	186.68994	24.70540	0.17656
10	18.902	BV	0.0976	4.49131	5.53754e-1	0.00425
11	19.344	BV	0.0978	3.44147	4.30436e-1	0.00325
12	20.275	BB	0.1208	38.52717	4.48000	0.03644
13	20.681	BV	0.1205	5.19294	5.11104e-1	0.00491

Instrument 1 23.10.2003 16:06:46 OZLEM SIRIN- TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
14	21.601	BV	0.1186	120.87965	13.67880	0.11432
15	25.934	BP	0.1196	26.33105	2.68109	0.02490
16	26.861	PV	0.1219	10.52288	1.03264	0.00995
17	27.087	VV	0.1068	5.35213	6.04751e-1	0.00506
18	27.467	VV	0.1342	105.00922	10.59172	0.09931
19	27.809	VV	0.1290	32.66359	3.12341	0.03089
20	29.362	BB	0.1277	21.58819	2.06051	0.02042
21	30.031	BB	0.1250	14.58000	1.41724	0.01379
22	31.135	BV	0.1207	5.92574	5.87155e-1	0.00560
23	31.761	VV	0.1382	70.06702	6.42710	0.06627
24	32.179	VB	0.1358	22.38484	1.95941	0.02117
25	33.839	BB	0.1359	17.21445	1.54007	0.01628
26	37.348	BB	0.1510	125.17661	11.64036	0.11839
27	38.801	BP	0.1284	3.34023	3.15817e-1	0.00316
28	40.800	BP	0.1548	60.82552	5.04072	0.05753
29	41.801	PB	0.1655	86.97519	7.40632	0.08226
30	45.613	BP	0.1671	54.14843	4.30833	0.05121
31	50.234	BV	0.1564	105.50578	9.26260	0.09978
32	51.419	BB	0.1372	6.39344	5.53810e-1	0.00605
33	54.852	MM	0.3345	177.67203	8.85387	0.16803
34	56.160	BV	0.1217	3.90107	3.81779e-1	0.00369
35	60.247	BB	0.1833	59.02634	3.80819	0.05582
36	60.673	BB	0.0828	3.27655	4.72901e-1	0.00310

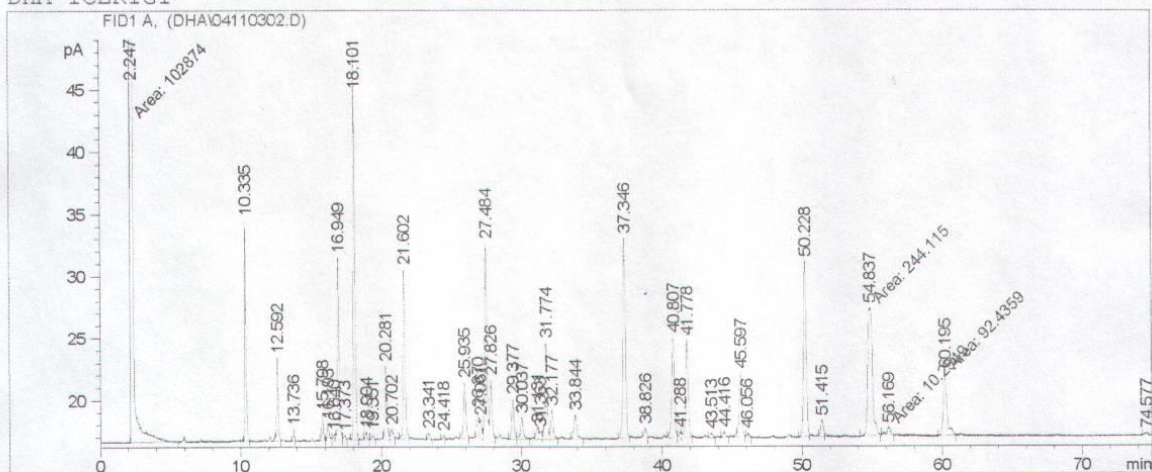
Totals : 1.05736e5 6.49538e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
2000 IU/GYAG, 35°C, pH:9, 12.SAAT, 2mcl

=====
Injection Date : 04.11.2003 13:30:37
Sample Name : Vial : 1
Acq. Operator : OZLEM SIRIN- TUBA YASAR Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 30.10.2003 11:12:30 by OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
DHA ICERIGI



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.247	MM	0.0250	1.02874e5	6.85325e4	97.70094
2	10.335	VB	0.0940	113.20712	17.84967	0.10751
3	12.592	VB	0.0950	47.27048	6.68809	0.04489
4	13.736	BV	0.0900	6.91419	9.54790e-1	0.00657
5	15.798	BV	0.0952	16.76933	2.12299	0.01593
6	16.193	VV	0.1236	12.86841	1.36306	0.01222
7	16.640	VV	0.1019	4.11497	4.83179e-1	0.00391
8	16.949	BB	0.1104	129.38478	14.74179	0.12288
9	17.373	BV	0.1025	3.35199	3.92884e-1	0.00318
10	18.101	VB	0.1066	257.63892	31.29204	0.24468
11	18.904	BP	0.1069	5.73092	6.37201e-1	0.00544
12	19.351	BB	0.1152	4.49413	4.65168e-1	0.00427

ta File C:\HPCHEM\1\DATA\DHA\04110302.D

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	20.281	BB	0.1197	57.11840	5.91380	0.05425
14	20.702	BB	0.1444	9.63202	7.89323e-1	0.00915
15	21.602	BB	0.1262	133.35014	13.62575	0.12664
16	23.341	BP	0.1201	5.30703	5.24085e-1	0.00504
17	24.418	PV	0.1075	3.18188	3.53577e-1	0.00302
18	25.935	BB	0.1378	50.81782	4.49805	0.04826
19	26.870	BV	0.1297	22.62788	2.13363	0.02149
20	27.061	VV	0.1189	14.69091	1.46641	0.01395
21	27.484	VV	0.1417	170.25500	15.67202	0.16169
22	27.826	VB	0.1348	50.52813	4.66801	0.04799
23	29.377	BV	0.1407	37.92764	3.29712	0.03602
24	30.037	VV	0.1704	24.69010	1.76315	0.02345
25	31.131	BV	0.1407	12.02913	1.01531	0.01142
26	31.363	VV	0.1321	7.23795	6.49213e-1	0.00687
27	31.774	VV	0.1439	93.03166	7.84064	0.08835
28	32.177	VV	0.1514	29.45950	2.37153	0.02798
29	33.844	BV	0.1566	26.54573	2.00966	0.02521
30	37.346	BB	0.1543	201.56438	16.12777	0.19143
31	38.826	BV	0.1495	9.26757	7.66613e-1	0.00880
32	40.807	VV	0.1641	109.52139	8.10549	0.10401
33	41.288	VV	0.1413	5.34615	4.49363e-1	0.00508
34	41.778	VV	0.1558	101.78596	7.82515	0.09667
35	43.513	BP	0.1479	4.50865	3.61754e-1	0.00428
36	44.416	PP	0.1438	5.74268	4.72414e-1	0.00545
37	45.597	VV	0.1654	68.12614	5.14806	0.06470
38	46.056	VV	0.1378	3.72418	3.19857e-1	0.00354
39	50.228	BV	0.1703	192.96616	14.17918	0.18326
40	51.415	VV	0.1544	17.69936	1.35971	0.01681
41	54.837	MM	0.3921	244.11513	10.37685	0.23184
42	56.169	MM	0.2627	10.25491	6.50559e-1	0.00974
43	60.195	MM	0.3043	92.43588	5.06329	0.08779
44	74.577	BP	0.2211	3.55708	1.89863e-1	0.00338

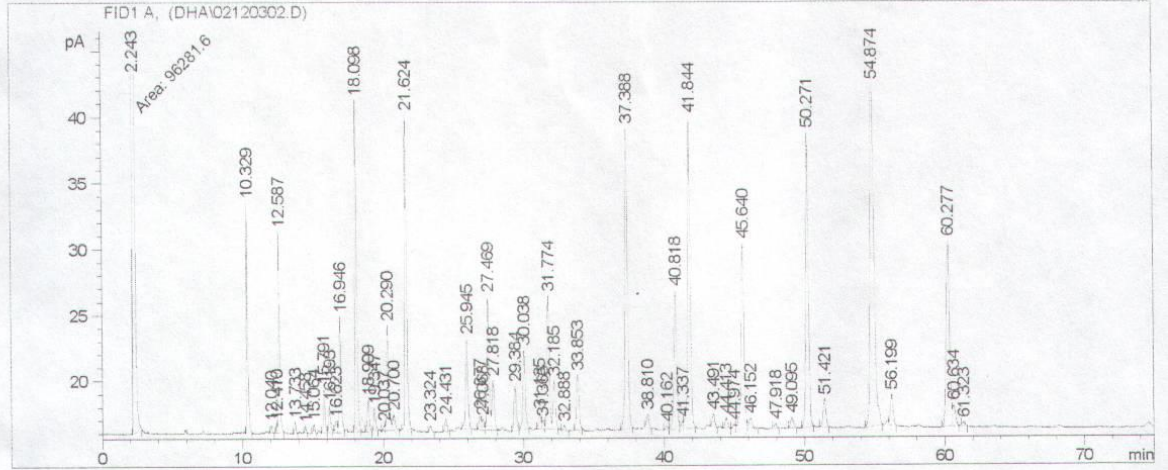
Totals : 1.05295e5 6.87494e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
2000 IU/GYAG, PH:5, 25°C, 12.SAAT, 2mcl

=====
Injection Date : 02.12.2003 11:46:04
Sample Name : Vial : 1
Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 10.11.2003 08:56:45 by OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
DHA ICERIGI



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.243	MM	0.0217	9.62816e4	7.38870e4	96.15181
2	10.329	VB	0.0939	116.33684	17.54393	0.11618
3	12.040	BB	0.0880	4.13592	5.84870e-1	0.00413
4	12.410	PV	0.0711	3.87540	7.00074e-1	0.00387
5	12.587	VB	0.1031	111.22009	15.25368	0.11107
6	13.733	PB	0.0972	6.49293	8.73965e-1	0.00648
7	14.458	BB	0.0863	3.65545	5.00090e-1	0.00365
8	15.064	BP	0.0894	5.13557	6.93348e-1	0.00513
9	15.791	BB	0.1165	28.83025	3.39819	0.02879
10	16.193	BB	0.1103	19.56392	2.13709	0.01954
11	16.623	BV	0.1337	9.74057	8.62665e-1	0.00973
12	16.946	VB	0.1257	82.58704	8.78493	0.08248

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	18.098	BB	0.1215	218.65352	25.13398	0.21836
14	18.909	BP	0.1226	22.96589	2.42147	0.02293
15	19.347	BP	0.1126	15.41554	1.71916	0.01539
16	20.037	PV	0.1025	3.20132	3.91154e-1	0.00320
17	20.290	VV	0.1429	84.68008	7.97364	0.08457
18	20.700	VP	0.1582	14.99888	1.15702	0.01498
19	21.624	BB	0.1287	238.74524	23.85912	0.23842
20	23.324	BB	0.1277	4.87955	4.52938e-1	0.00487
21	24.431	BP	0.1295	9.68529	9.53586e-1	0.00967
22	25.945	BP	0.1413	79.70889	6.87199	0.07960
23	26.877	PV	0.1330	13.93537	1.27064	0.01392
24	27.068	VV	0.1210	7.70664	7.95320e-1	0.00770
25	27.469	VV	0.1393	114.08799	10.13555	0.11393
26	27.818	VB	0.1526	43.98881	3.72958	0.04393
27	29.384	BV	0.1502	40.11300	3.36093	0.04006
28	30.038	VB	0.1447	72.39175	6.04374	0.07229
29	31.135	BV	0.1364	13.86780	1.23167	0.01385
30	31.365	VV	0.1250	6.70215	6.40659e-1	0.00669
31	31.774	VV	0.1573	124.73783	10.15590	0.12457
32	32.185	VB	0.1469	44.34142	3.72321	0.04428
33	32.888	PP	0.1274	3.73712	3.56262e-1	0.00373
34	33.853	BB	0.1477	51.30176	4.19476	0.05123
35	37.388	BB	0.1604	296.45215	22.83976	0.29605
36	38.810	BP	0.1415	13.11687	1.09691	0.01310
37	40.162	BV	0.1505	3.34468	2.68146e-1	0.00334
38	40.818	VV	0.1672	147.67311	10.55748	0.14747
39	41.337	VV	0.1265	5.97653	5.64447e-1	0.00597
40	41.844	VB	0.1617	317.23926	23.61521	0.31681
41	43.491	BP	0.1412	11.37952	9.60862e-1	0.01136
42	44.413	PP	0.1584	10.66543	8.10908e-1	0.01065
43	44.974	VV	0.1501	4.28110	3.37337e-1	0.00428
44	45.640	VV	0.1879	202.90117	14.09928	0.20263
45	46.152	VP	0.1844	12.36147	8.22382e-1	0.01234
46	47.918	BP	0.1512	4.39058	3.48004e-1	0.00438
47	49.095	BB	0.1707	11.54115	8.02805e-1	0.01153
48	50.271	BB	0.1728	307.09964	22.41842	0.30669
49	51.421	BB	0.1650	30.17623	2.18727	0.03014
50	54.874	BB	0.2298	555.76532	29.22775	0.55502
51	56.199	BB	0.1708	33.78210	2.40645	0.03374
52	60.277	BV	0.2102	236.74609	14.14846	0.23643
53	60.634	VP	0.1678	23.06155	1.63285	0.02303
54	61.323	BB	0.1698	4.00674	2.80284e-1	0.00400

Totals : 1.00135e5 7.42043e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

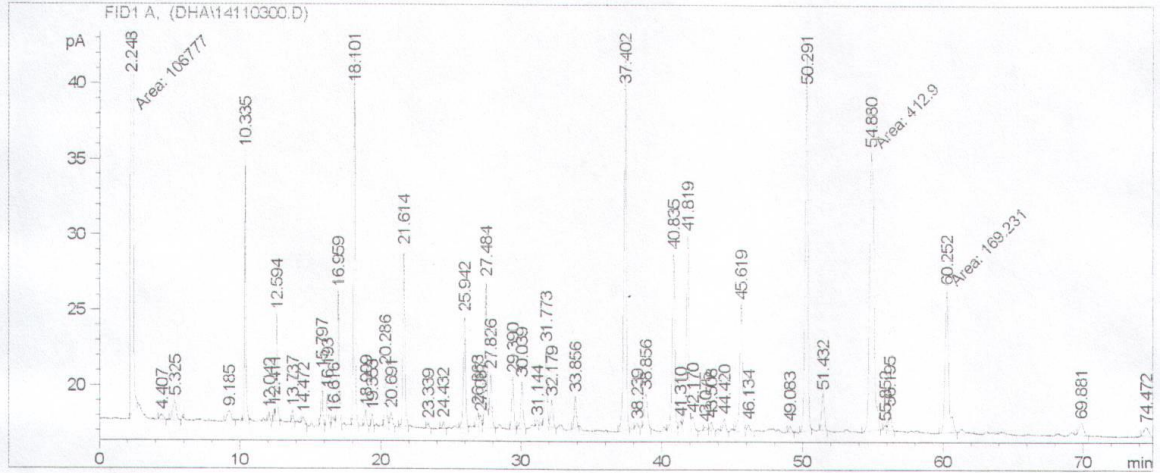
2000 IU/GYAG, 40°C, pH:5, 12. SAAT, 2mcl

```

=====
Injection Date   : 14.11.2003 09:45:20
Sample Name      :
Acq. Operator    : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
Vial             : 1
Inj              : 1
Inj Volume       : Manually

Method           : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 10.11.2003 08:56:45 by OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
DHA ICERIGI

```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.248	MM	0.0207	1.06777e5	8.58599e4	97.22861
2	4.407	BB	0.1923	6.05941	3.72430e-1	0.00552
3	5.325	BP	0.2123	23.70482	1.32782	0.02159
4	9.185	BB	0.2222	13.52272	7.21401e-1	0.01231
5	10.335	VB	0.0903	110.78992	17.87372	0.10088
6	12.042	BB	0.0798	4.06902	6.21998e-1	0.00371
7	12.411	PV	0.0759	4.81072	8.27038e-1	0.00438
8	12.594	VB	0.0983	50.14386	7.15400	0.04566
9	13.737	BB	0.0894	5.25628	7.76869e-1	0.00479
10	14.472	BP	0.1416	5.49864	4.66095e-1	0.00501
11	15.797	BB	0.1028	29.51380	3.61171	0.02687
12	16.193	BB	0.1159	20.29353	2.28899	0.01848

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	16.616	BV	0.1568	8.23866	6.24756e-1	0.00750
14	16.959	VB	0.1143	80.23084	8.97755	0.07306
15	18.101	BB	0.1110	205.18230	25.19609	0.18683
16	18.909	BP	0.1102	10.21767	1.13324	0.00930
17	19.353	BV	0.1052	7.27805	8.51773e-1	0.00663
18	20.286	BB	0.1285	37.27340	3.81544	0.03394
19	20.691	BB	0.1390	10.95778	9.57676e-1	0.00998
20	21.614	BB	0.1250	114.55687	11.77757	0.10431
21	23.339	BB	0.1118	3.55351	3.77624e-1	0.00324
22	24.432	BP	0.1203	4.35516	4.32981e-1	0.00397
23	25.942	BP	0.1323	81.07317	7.40352	0.07382
24	26.883	PV	0.1242	12.16511	1.19574	0.01108
25	27.087	VV	0.1169	7.51105	7.76144e-1	0.00684
26	27.484	VV	0.1398	104.48832	9.72818	0.09514
27	27.826	VB	0.1460	40.53924	3.61134	0.03691
28	29.390	BB	0.1356	38.00058	3.47442	0.03460
29	30.039	BB	0.1501	37.75716	3.15517	0.03438
30	31.144	BV	0.1098	4.12594	4.61502e-1	0.00376
31	31.773	VV	0.1414	63.06905	5.43516	0.05743
32	32.179	VP	0.1386	21.05157	1.83823	0.01917
33	33.856	BB	0.1327	23.29052	2.13696	0.02121
34	37.402	BB	0.1567	312.40814	25.45450	0.28447
35	38.239	BV	0.1635	5.31867	3.84127e-1	0.00484
36	38.856	VB	0.1907	37.92508	2.33919	0.03453
37	40.835	VV	0.1633	157.45374	11.79323	0.14337
38	41.310	VV	0.1501	8.39616	6.61408e-1	0.00765
39	41.819	VV	0.1660	172.77258	12.96094	0.15732
40	42.170	VP	0.1780	13.96174	9.46850e-1	0.01271
41	43.075	BB	0.1843	3.80430	2.48940e-1	0.00346
42	43.508	BP	0.1492	7.01459	5.57717e-1	0.00639
43	44.420	PP	0.1458	10.25211	8.34617e-1	0.00934
44	45.619	VV	0.1651	116.80206	8.45903	0.10636
45	46.134	VP	0.1496	5.97742	4.84075e-1	0.00544
46	49.083	BB	0.1490	5.04763	4.04636e-1	0.00460
47	50.291	BB	0.1738	329.05740	25.04428	0.29963
48	51.432	BB	0.1610	32.04735	2.42761	0.02918
49	54.880	MM	0.3715	412.89972	18.52433	0.37598
50	55.852	BV	0.1408	3.67784	3.11286e-1	0.00335
51	56.195	VB	0.1676	18.71321	1.34236	0.01704
52	60.252	MM	0.2964	169.23131	9.51714	0.15410
53	69.881	BP	0.2561	17.03873	7.88450e-1	0.01552
54	74.472	BPA	0.3124	15.18094	5.71525e-1	0.01382

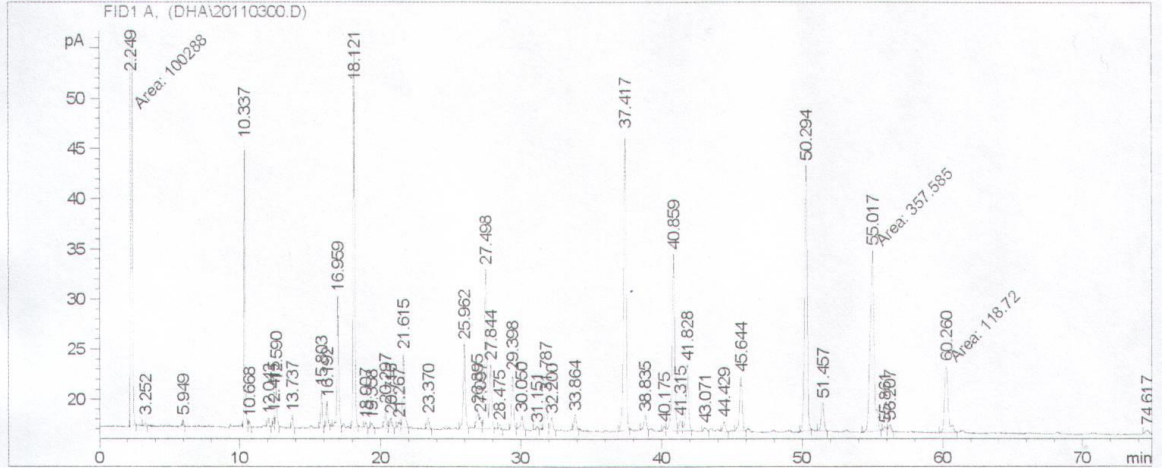
Totals : 1.09821e5 8.61134e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
2000 IU/GYAG, PH:5, 50°C, 12.SAAT, 2mcl

```
=====
Injection Date   : 20.11.2003 09:10:34
Sample Name      :
Acq. Operator    : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
Method           : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 10.11.2003 08:56:45 by OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
DHA ICERIGI
Vial : 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually
=====
```



=====
Area Percent Report
=====

```
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.249	MM	0.0193	1.00288e5	8.66401e4	97.08466
2	3.252	VB	0.0630	3.52292	7.21489e-1	0.00341
3	5.949	VB	0.0667	3.49285	7.24910e-1	0.00338
4	10.337	VV	0.0795	153.50624	28.42589	0.14860
5	10.668	VB	0.0775	4.03460	6.53401e-1	0.00391
6	12.042	BB	0.0920	6.90079	9.30999e-1	0.00668
7	12.415	PV	0.0762	6.43588	1.10116	0.00623
8	12.590	VB	0.0858	27.21943	4.13598	0.02635
9	13.737	BB	0.0904	8.28945	1.28178	0.00802
10	15.803	BB	0.0943	27.60048	3.75297	0.02672
11	16.192	PB	0.1054	19.48901	2.51538	0.01887
12	16.959	PB	0.1153	113.64100	13.09027	0.11001

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	18.121	VB	0.1048	309.34506	38.49105	0.29946
14	18.907	BP	0.0966	4.04639	5.20795e-1	0.00392
15	19.358	VV	0.1155	4.49330	4.63766e-1	0.00435
16	20.297	BB	0.1130	18.33036	1.99885	0.01774
17	20.716	BP	0.1189	10.03507	1.00540	0.00971
18	21.267	PV	0.1309	5.85773	5.30319e-1	0.00567
19	21.615	VP	0.1329	72.84435	7.43151	0.07052
20	23.370	BB	0.1220	11.51968	1.12428	0.01115
21	25.962	BB	0.1312	91.65180	8.50503	0.08872
22	26.895	BV	0.1288	21.78627	2.03607	0.02109
23	27.097	VV	0.1115	10.77586	1.15295	0.01043
24	27.498	VV	0.1303	167.87355	15.87985	0.16251
25	27.844	VB	0.1300	66.78094	6.35901	0.06465
26	28.475	BB	0.1111	4.05072	4.45241e-1	0.00392
27	29.398	BB	0.1278	59.04702	5.49817	0.05716
28	30.050	BP	0.1588	18.33219	1.38152	0.01775
29	31.151	BV	0.1478	4.24691	3.40935e-1	0.00411
30	31.787	BV	0.1415	39.04298	3.42484	0.03780
31	32.200	VB	0.1356	14.60441	1.27502	0.01414
32	33.864	BB	0.1353	16.33932	1.49193	0.01582
33	37.417	BB	0.1519	362.65186	29.71637	0.35107
34	38.835	BP	0.1541	18.81855	1.46237	0.01822
35	40.175	BV	0.1448	5.25338	4.29128e-1	0.00509
36	40.859	VV	0.1567	230.34514	17.65604	0.22299
37	41.315	VV	0.1596	13.34505	1.00043	0.01292
38	41.828	VB	0.1627	85.17538	6.53029	0.08245
39	43.071	BB	0.1541	4.67605	3.58767e-1	0.00453
40	44.429	BP	0.1461	11.56456	9.46428e-1	0.01120
41	45.644	BB	0.1612	71.09272	5.41310	0.06882
42	50.294	BB	0.1598	348.11298	26.58646	0.33699
43	51.457	BB	0.1644	38.35104	2.86921	0.03713
44	55.017	MM	0.3288	357.58548	18.12823	0.34616
45	55.861	BV	0.1476	4.79182	3.83853e-1	0.00464
46	56.207	VB	0.1609	8.71789	6.56563e-1	0.00844
47	60.260	MM	0.2949	118.71997	6.70849	0.11493
48	74.617	BB	0.2320	7.19060	3.64771e-1	0.00696

Totals : 1.03300e5 8.69160e4

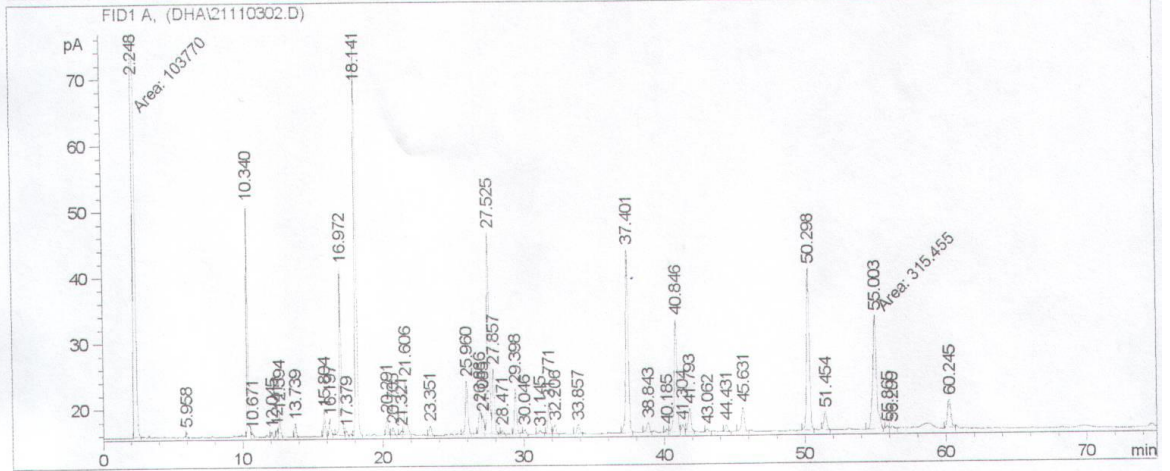
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
2000 IU/GYAG, PH:5, 70°C, 12.SAAT, 2mcl

=====
Injection Date : 21.11.2003 12:46:46
Sample Name :
Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
Vial : 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 21.11.2003 11:20:01 by OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
(modified after loading)

DHA ICERIGI



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.248	MM	0.0232	1.03770e5	7.46077e4	96.72606
2	5.958	VB	0.0741	4.75693	9.15586e-1	0.00443
3	10.340	VB	0.0922	215.66129	35.09902	0.20102
4	10.671	BB	0.0806	3.93046	5.83312e-1	0.00366
5	12.045	BB	0.0820	4.70393	7.17179e-1	0.00438
6	12.411	PV	0.0807	6.33036	1.07431	0.00590
7	12.594	VB	0.0973	25.69712	3.35729	0.02395
8	13.739	BB	0.0898	14.40552	2.00497	0.01343
9	15.804	BB	0.1070	30.60055	3.77749	0.02852
10	16.197	PB	0.1053	20.44084	2.43891	0.01905
11	16.972	PV	0.1282	231.33696	25.41376	0.21563

Instrument 1 21.11.2003 14:05:21 OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
12	17.379	VV	0.1071	5.82756	6.86315e-1	0.00543
13	18.141	VB	0.1185	512.83752	59.54145	0.47802
14	20.291	BV	0.1226	25.38474	2.70268	0.02366
15	20.705	VB	0.1311	12.18565	1.10950	0.01136
16	21.321	PV	0.1366	6.46526	5.82053e-1	0.00603
17	21.606	VP	0.1334	86.44117	8.10643	0.08057
18	23.351	BB	0.1305	15.02277	1.40800	0.01400
19	25.960	BP	0.1395	90.15304	7.93755	0.08403
20	26.886	BV	0.1437	45.80169	4.08989	0.04269
21	27.085	VV	0.1243	26.52149	2.68442	0.02472
22	27.525	VV	0.1364	331.37442	30.34553	0.30888
23	27.857	VB	0.1337	106.18500	9.77545	0.09898
24	28.471	BP	0.1242	6.20429	6.02047e-1	0.00578
25	29.398	BP	0.1294	74.47466	6.93067	0.06942
26	30.046	BP	0.1181	5.68061	5.91113e-1	0.00529
27	31.145	BB	0.2114	9.41373	5.24392e-1	0.00877
28	31.771	BV	0.1438	55.70851	4.71727	0.05193
29	32.206	VB	0.1449	16.45778	1.37265	0.01534
30	33.857	BB	0.1597	18.35021	1.39303	0.01710
31	37.401	BB	0.1581	358.94952	27.71448	0.33458
32	38.843	BV	0.1677	20.60881	1.52420	0.01921
33	40.185	BV	0.1578	5.66845	4.56754e-1	0.00528
34	40.846	VV	0.1703	230.12621	16.96481	0.21450
35	41.304	VV	0.1633	13.86502	1.02171	0.01292
36	41.793	VB	0.1622	47.24585	3.50588	0.04404
37	43.062	BP	0.1394	4.44518	3.85822e-1	0.00414
38	44.431	BP	0.1558	11.66072	9.26475e-1	0.01087
39	45.631	BB	0.1702	50.35228	3.64510	0.04693
40	50.298	BB	0.1652	332.22488	24.50046	0.30967
41	51.454	BP	0.1559	34.87110	2.67915	0.03250
42	55.003	MM	0.3045	315.45486	17.26565	0.29404
43	55.865	BV	0.1428	4.51964	3.77147e-1	0.00421
44	56.200	VP	0.1402	3.45553	2.96093e-1	0.00322
45	60.245	PB	0.2068	70.57175	4.24751	0.06578

Totals : 1.07283e5 7.49337e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

2000 IU/GYAG, 40°C, PH:5, 12. SAAT, hekzan/tampon, 2 mc

1

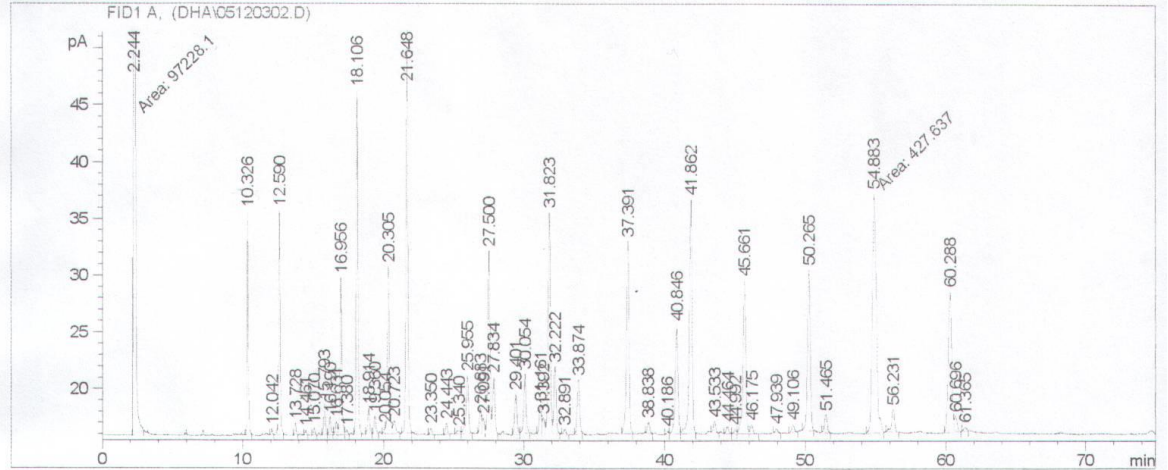
```

=====
Injection Date   : 05.12.2003 11:46:27
Sample Name      :
Acq. Operator    : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
Vial             : 1
Inj              : 1
Inj Volume       : Manually

Method           : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 05.12.2003 10:18:52 by OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
                  (modified after loading)

```

DHA ICERIGI



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.244	MM	0.0196	9.72281e4	8.27424e4	96.13603
2	10.326	VB	0.0914	117.52512	19.76693	0.11621
3	12.042	BP	0.0822	3.76585	5.61972e-1	0.00372
4	12.590	VB	0.0919	133.69034	19.77907	0.13219
5	13.728	BB	0.0918	7.73517	1.09011	0.00765
6	14.461	PP	0.0884	3.09114	4.42975e-1	0.00306
7	15.070	BP	0.0981	4.85471	6.42730e-1	0.00480
8	15.793	BB	0.1110	21.91961	2.72136	0.02167
9	16.190	BB	0.1110	14.81796	1.61630	0.01465
10	16.631	BV	0.1285	12.84313	1.22295	0.01270
11	16.956	VB	0.1183	121.63609	13.87085	0.12027
12	17.380	BV	0.1140	3.93695	4.21395e-1	0.00389

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	18.106	BB	0.1205	260.82120	30.28681	0.25789
14	18.914	BB	0.1159	21.52567	2.32816	0.02128
15	19.360	BB	0.1221	14.75213	1.57716	0.01459
16	20.054	BV	0.0857	4.03034	5.68463e-1	0.00399
17	20.305	VB	0.1237	148.46021	14.71234	0.14679
18	20.723	BB	0.1712	15.32430	1.08240	0.01515
19	21.648	BB	0.1207	327.83322	34.25060	0.32415
20	23.350	BB	0.1235	6.17904	6.03058e-1	0.00611
21	24.443	BB	0.1278	9.96691	9.95731e-1	0.00985
22	25.340	PV	0.2134	5.77142	3.18539e-1	0.00571
23	25.955	VP	0.1501	62.69326	5.11023	0.06199
24	26.883	PV	0.1307	23.77610	2.25992	0.02351
25	27.091	VV	0.1180	13.35115	1.36590	0.01320
26	27.500	VV	0.1425	179.06923	16.13646	0.17706
27	27.834	VB	0.1433	56.41510	4.97598	0.05578
28	29.401	BV	0.1457	42.28704	3.53250	0.04181
29	30.054	VB	0.1432	63.02549	5.31999	0.06232
30	31.161	BV	0.1427	29.99976	2.52403	0.02966
31	31.392	VV	0.1312	15.66010	1.42533	0.01548
32	31.823	VV	0.1471	229.95096	19.56672	0.22737
33	32.222	VB	0.1401	69.36925	5.94850	0.06859
34	32.891	BP	0.1298	4.45194	4.09545e-1	0.00440
35	33.874	BB	0.1439	58.66816	4.82191	0.05801
36	37.391	BB	0.1594	221.43317	16.95373	0.21895
37	38.838	BP	0.1413	11.44281	9.65223e-1	0.01131
38	40.186	BV	0.1421	3.25317	2.72806e-1	0.00322
39	40.846	VV	0.1683	131.93582	9.54557	0.13045
40	41.862	VB	0.1702	279.32278	20.60168	0.27619
41	43.533	BP	0.1331	10.25403	9.19246e-1	0.01014
42	44.464	PP	0.1562	8.01006	6.09976e-1	0.00792
43	44.992	VV	0.1483	4.50536	3.69390e-1	0.00445
44	45.661	VV	0.1746	191.36765	13.48509	0.18922
45	46.175	VP	0.1681	10.65138	7.71526e-1	0.01053
46	47.939	BP	0.1564	4.71251	3.60873e-1	0.00466
47	49.106	PP	0.1469	8.09289	6.56176e-1	0.00800
48	50.265	BB	0.1729	196.37910	14.23717	0.19417
49	51.465	BP	0.1605	21.46398	1.60024	0.02122
50	54.883	MM	0.3370	427.63705	21.14912	0.42283
51	56.231	BP	0.1910	31.71248	2.04433	0.03136
52	60.288	BV	0.2026	211.50108	12.42263	0.20913
53	60.696	VP	0.1727	19.66908	1.39318	0.01945
54	61.365	BB	0.2015	5.32278	3.17567e-1	0.00526

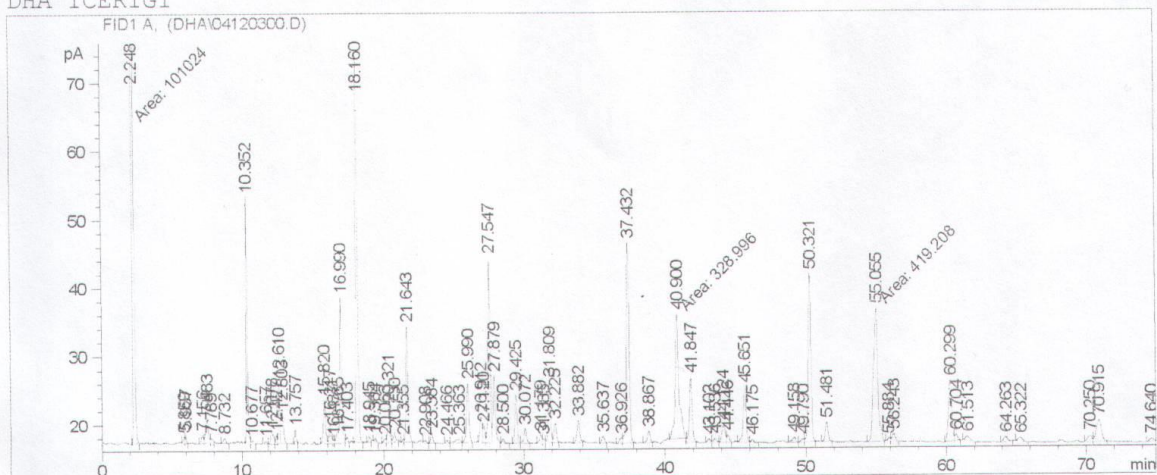
Totals : 1.01136e5 8.30833e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
2000 IU/GYAG, PH:5, 35°C, 12.SAAT, saf su, 2mcl

=====
Injection Date : 04.12.2003 09:06:38
Sample Name : Vial : 1
Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 10.11.2003 08:56:45 by OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
DHA ICERIGI



=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.248	MM	0.0202	1.01024e5	8.33059e4	95.51225
2	5.859	BV	0.0981	7.45149	9.59716e-1	0.00704
3	5.957	VP	0.0727	6.63303	1.26347	0.00627
4	7.156	BV	0.1361	12.80004	1.11754	0.01210
5	7.483	VV	0.1801	48.89878	3.44563	0.04623
6	7.789	VB	0.1155	6.06367	6.31426e-1	0.00573
7	8.732	BP	0.1400	7.20764	6.16148e-1	0.00681
8	10.352	VV	0.0947	221.08940	35.96255	0.20903
9	10.677	VP	0.0838	3.02549	4.34345e-1	0.00286
10	11.657	BP	0.1265	4.12021	3.87600e-1	0.00390
11	12.078	VV	0.1497	20.95558	1.66128	0.01981
12	12.427	VV	0.0854	7.42803	1.21426	0.00702

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	12.610	VV	0.1025	66.44817	9.00957	0.06282
14	12.803	VB	0.1522	53.25219	4.26392	0.05035
15	13.757	PB	0.0866	13.70724	1.94775	0.01296
16	15.820	BV	0.1379	68.35360	6.46058	0.06462
17	16.217	VV	0.1302	28.24280	2.96209	0.02670
18	16.437	VV	0.0746	3.60104	5.78670e-1	0.00340
19	16.765	VV	0.1337	19.12670	1.70720	0.01808
20	16.990	VB	0.1189	199.24274	21.25598	0.18837
21	17.403	BV	0.1225	8.33350	8.45779e-1	0.00788
22	18.160	VB	0.1124	488.08752	57.00752	0.46146
23	18.945	BV	0.1127	7.95998	8.62433e-1	0.00753
24	19.364	BP	0.1187	6.41361	6.55432e-1	0.00606
25	20.063	PV	0.1318	6.12240	5.50190e-1	0.00579
26	20.321	VV	0.1215	50.46849	5.05405	0.04771
27	20.730	VB	0.1435	16.33644	1.37151	0.01545
28	21.355	PV	0.0992	3.19849	3.90019e-1	0.00302
29	21.643	VP	0.1298	171.19107	16.87986	0.16185
30	22.908	BB	0.1476	4.12264	3.29303e-1	0.00390
31	23.384	BB	0.1294	14.82294	1.37935	0.01401
32	24.466	BP	0.1228	4.67628	4.53404e-1	0.00442
33	25.363	VV	0.3625	14.84855	4.82586e-1	0.01404
34	25.990	VP	0.1458	104.29927	8.57881	0.09861
35	26.912	BV	0.1383	42.99353	3.76193	0.04065
36	27.120	VV	0.1173	22.59526	2.35732	0.02136
37	27.547	VV	0.1358	307.04956	26.97681	0.29030
38	27.879	VB	0.1350	109.63787	9.76245	0.10366
39	28.500	BB	0.1422	7.41124	6.28043e-1	0.00701
40	29.425	BB	0.1357	80.31142	7.08839	0.07593
41	30.072	BB	0.1624	28.95899	2.15307	0.02738
42	31.179	BV	0.1450	13.65253	1.13798	0.01291
43	31.385	VV	0.1182	5.65401	5.75269e-1	0.00535
44	31.809	VV	0.1433	106.48774	8.98045	0.10068
45	32.225	VB	0.1428	32.43978	2.82843	0.03067
46	33.882	VB	0.1659	44.60563	3.26453	0.04217
47	35.637	BP	0.1727	13.87177	9.50798e-1	0.01311
48	36.926	PV	0.1615	11.17779	8.17752e-1	0.01057
49	37.432	VB	0.1573	387.05276	29.26262	0.36594
50	38.867	BV	0.1646	23.31732	1.68825	0.02205
51	40.900	MM	0.3016	328.99576	18.18023	0.31105
52	41.847	BB	0.1628	128.65967	9.48286	0.12164
53	43.102	BV	0.1713	7.30685	5.03385e-1	0.00691
54	43.536	VV	0.1861	9.46139	5.99442e-1	0.00895
55	44.124	VV	0.1881	40.99862	2.60516	0.03876
56	44.446	VB	0.1471	13.16204	1.06904	0.01244
57	45.651	VV	0.1784	116.96688	7.96343	0.11059
58	46.175	VP	0.1215	4.00946	3.93161e-1	0.00379
59	49.158	BP	0.2291	14.27473	7.39923e-1	0.01350
60	49.790	VV	0.1946	7.50144	4.55578e-1	0.00709
61	50.321	VB	0.1732	341.29285	24.61782	0.32267
62	51.481	BB	0.1717	40.83495	2.90077	0.03861
63	55.055	MM	0.3545	419.20804	19.70683	0.39634
64	55.884	BV	0.1498	5.79974	4.59357e-1	0.00548
65	56.243	VB	0.1851	17.23003	1.10715	0.01629
66	60.299	BV	0.2011	148.96349	8.92910	0.14084
67	60.704	VB	0.1626	12.48589	9.10113e-1	0.01180

ÖZGEÇMİŞ

Özlem ŞİRİN, 1980 yılında Samsun’da doğdu. Orta öğrenimini Kocaeli ve Konya’da lise öğrenimini Isparta’da Atatürk Lisesi’nde tamamladı. 1996 yılında Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü’nü kazandı. 1997 yılında aynı üniversitenin Kimya Mühendisliği Bölümü’ne yatay geçiş yaptı. Lisans eğitimini bu bölümde tamamladıktan sonra 2000 yılı Haziran ayında mezun oldu. Aynı yıl İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümü’nde Yüksek Lisans eğitimine başladı.