

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRİOLEİNİN ENZİMATİK ASİDOLİZİ İLE DÜŞÜK
KALORİLİ YAPILANDIRILMIŞ LİPİDLERİN
ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimyager Füsun DEMİRCİ**

Anabilim Dalı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

HAZİRAN 2005

**TRİOLEİNİN ENZİMATİK ASİDOLİZİ İLE DÜŞÜK
KALORİLİ YAPILANDIRILMIŞ LİPİDLERİN
ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimyager Füsun DEMİRCİ
506021014

Tezin Enstiyüye Verildiği Tarih: 1 Temmuz 2005
Tezin Savunulduğu Tarih: 2 Haziran 2005

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN
Diğer Jüri Üyeleri Prof. Dr. Ayşe AKSOY
Prof. Dr. Artemis KARAALI

HAZİRAN 2005

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan ve daima yol gösteren değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Güldem Üstün'e, tüm çalışmam boyunca büyük yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocam Ar. Gör. Dr. Sevil YÜCEL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans tez aşamasında yaşadığım zorlukları paylaşarak bana destek olan sevgili labaratuvar arkadaşım, Kim. Müh. Raşit Dağlı'ya, ve ismini sayamadığım tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca her zaman olduğu gibi bu çalışmam sırasında da yanımda olan ve bana destek olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2005

Fusun DEMİRCİ

İÇİNDEKİLER	
KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ve TEORİ	3
2.1. Yağ İkame Maddeleri	3
2.1.1. Karbonhidrat Bazlı Yağ İkame Maddeleri	3
2.1.2. Protein Bazlı Yağ İkame Maddeleri	3
2.1.3. Lipid Bazlı Yağ İkame Maddeleri	4
2.1.3.1. Kakao Yağı İkame Maddeleri	8
2.1.3.2. Anne Sütü Yağı Benzerleri	9
2.1.3.3. Sağlık ve Gıda Değeri Yüksek Bileşikler	9
2.1.3.4. Düşük Kalorili Yağlar	10
2.1.3.5. Diğer Uygulamalar	10
2.2. Düşük Kalorili Yağlarla Yapılan Çalışmalarla İlgili Literatür Çalışması	10
2.3. Tepki Yüzey Metodoloji (Response Surface Methodology)	13
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	17
3.1. Kullanılan Hammaddeler	17
3.2. Çalışma Yöntemi	17
3.2.1. Kullanılan Hammaddelerin Karakterizasyonu	17
3.2.2. Triolein ile Laurik Asitin Asidolizinde Uygulanan Yöntem	17
3.2.3. Asidoliz Ürünlerinin Analizi	19
3.2.4. Deneysel Tasarımda Kullanılacak Değişkenlerin ve Değişken Seviye Değerlerinin Belirlenmesi	19
3.2.5. Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu	21
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	22
4.1. Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri	22
4.2. Triolein ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Enzim Miktarının Etkisi	23
4.3. Triolein ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Triolein/Laurik Asit Mol Oranının Etkisi	25

4.4. Triolein ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Reaksiyon Süresinin Etkisi	27
4.5. Tepki Yüzey Metodolojisi'ne Göre Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu	29
4.6. Farklı Reaksiyon Koşullarının Trioleinile Laurik Asitin Asdioliz Reaksiyonuna Etkilerinin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi	34
4.7. Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması	36
5. GENEL SONUÇLAR ve ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	46

KISALTMALAR

GC	: Gaz Kromatografisi (Gas Chromatography)
SL	: Yapılandırılmış Lipid (Structured Lipid)
TAG	: Triaçilgliserol
DAG	: Diaçilgliserol
MAG	: Monoaçilgliserol
LA	: Laurik Asit
TO	: Triolein

TABLO LİSTESİ

		<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1	Merkezi bileşik deney tasarımları.....	15
Tablo 3.1	Gaz Kromatografik Analiz Koşulları.....	18
Tablo 4.1	Laurik Asit ve Triolein Yağ Asitleri Bileşimi	23
Tablo 4.2	Trioleinin Laurik Asit ile Asidolizinde, Ürün Yağ Asitleri Bileşiminin Enzim Miktarı ile Değişimi (50°C; Triolein:Laurik Asit mol oranı, 1:3; 6 saat).....	24
Tablo 4.3	Trioleinin Laurik Asit ile Asidolizinde, Ürün Yağ Asitleri Bileşiminin Triolein:Laurik Asit mol oranı ile Değişimi (50°C; Enzim miktarı %9; 6 saat).....	26
Tablo 4.4	Trioleinin Laurik Asit ile Asidolizinde, Ürün Yağ Asitleri Bileşiminin Zaman ile Değişimi (50°C; Triolein:Laurik Asit mol oranı, 1:5; Enzim miktarı %9).....	28
Tablo 4.5	Yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviyeler.....	29
Tablo 4.6	Yüzey merkezli küp deney tasarımında belirlenen deney tasarım noktaları.....	30
Tablo 4.7.	Triolein ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerin yağ asitleri bileşimleri (Enzim miktarı: %3) (Deney No: 1-4 sonuçları).....	31
Tablo 4.8.	Triolein ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerin yağ asitleri bileşimleri (Enzim miktarı: %15) (Deney No: 5-8 sonuçları).....	31
Tablo 4.9.	Triolein ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerin yağ asitleri bileşimleri (Süre: 6 saat) (Deney No: 9-12 sonuçları).....	32
Tablo 4.10.	Triolein ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerin yağ asitleri bileşimleri (TO:LA mol oranı: 1:5; Enzim: %) (Deney No: 13-17 sonuçları).....	32
Tablo 4.11.	Yüzey merkezli küp tasarımına göre yürütülmüş asidoliz reaksiyonlarından elde edilen tepkiler (ürün TAG larındaki laurik asit yüzdeleri).....	33
Tablo 4.12	Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları.....	34
Tablo 4.13.	Varyans analizi sonuçları.....	35
Tablo 4.14	Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri.....	36

ŞEKİL LİSTESİ

		<u>Sayfa No</u>
Şekil 4.1	Triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda, trioleine katılan laurik asit yüzdesinin enzim miktarı ile değişimi (triolein:laurik asit mol oranı:1:3; 50 °C; 6 saat)	25
Şekil 4.2	Triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda, trioleine katılan laurik asit yüzdesinin substratların mol oranı ile değişimi (%9 enzim; 50 °C; 6 saat).....	27
Şekil 4.3	Triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda, trioleine katılan laurik asit yüzdesinin zamanla değişimi (%9 enzim; 50 °C; triolein:laurik asit mol oranı 1:5).....	28
Şekil 4.4	Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki	36
Şekil 4.5.a.	Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), mol oranı ve enzim miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	37
Şekil 4.5.b.	Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), mol oranı ve enzim miktarı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.....	38
Şekil 4.6.a	Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), enzim miktarı ve süre ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	38
Şekil 4.6.b.	Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), enzim miktarı ve süre ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.....	39
Şekil 4.7.a	Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	40
Şekil 4.7.b	Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.....	40

TRİOLEİNİN ENZİMATİK ASİDOLİZİ İLE DÜŞÜK KALORİLİ YAPILANDIRILMIŞ LİPİDLERİN ÜRETİMİ

ÖZET

Obezite problemi bilincinin gelişimiyle, dünyada düşük kalorili yağların ve yağ ikame maddelerinin pazarı hızla büyümektedir. Günümüzde karbonhidrat ve protein bazlı yağ ikame maddeleri bazı gıda maddelerinde kullanılmaktadır. Ancak bu ikame maddeleri ısıl işleme dayanıklı değildirler. Bu yüzden, pişirme ve kızartma işlemleri gerektiren gıda maddelerinin üretiminde, ısıl dayanıklı ve doğal bir yağın özelliklerini gösteren lipid bazlı yağ ikame maddelerinin kullanımı tek seçenek olmaktadır. Düşük kalorili yağlar ve yağ ikame maddeleri esas olarak lipidlerin yeniden yapılandırılmalarıyla üretilmektedir. Yapılandırılmış lipidler 1,3-pozisyonlarında orta zincirli yağ asitleri (C8-C12) ve 2-pozisyonunda uzun zincirli yağ asitleri (C16-C22) bulunan triağılgliceritlerdir. Literatürde, C8 ve C10 yağ asitlerince zenginleştirilmiş triağılgliceritlerin üretimi ile çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, laurik asit (C12) ile modifiye lipidler üzerinde sistematik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tezde, trioleinden düşük kalorili yağların üretiminde kullanılabilecek, hızlı metabolize olan laurik asit ile zenginleştirilmiş triağılgliceritlerin enzimatik olarak eldesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, trioleinin laurik asit ile *Mucor miehei* lipazı varlığında asidoliz reaksiyonu sistematik olarak incelenmiştir. Tepki Yüzey Metodolojisi uygulanarak, reaksiyon parametrelerinin (substrat oranı, enzim miktarı ve sürenin) trioleine katılan laurik asit yüzdesi üzerine olan etkileri araştırılmış ve reaksiyon koşulları optimize edilmiştir.

Optimizasyon için kullanılan Tepki-Yüzey Metodolojisi yöntemine göre 50 °C’de yapılan bir seri deney sonunda elde edilebilecek en yüksek laurik asit içeriği %49,3 olarak bulunmuştur. Bu istatistiksel analiz yöntemine göre kritik reaksiyon koşulları ise 5,9 saat reaksiyon süresi, %11,4 enzim miktarı ve 1/5,8 TO:LA mol oranıdır.

TO:LA mol oranı, reaksiyon süresi ve enzim miktarının laurik asit yüzdesine etkisini göstermek için varyans analizinden yararlanarak 2. dereceden polinom olan bir model

denklem oluşturulmuş ve bu model denkleme göre tahmin edilen değerler ile gözlenen değerlerin %99 oranında uyum sağladığı görülmüştür.

PRODUCTION OF LOW-CALORIE STRUCTURED LIPIDS BY ENZYMATIC ACIDOLYSIS OF TRIOLEIN

SUMMARY

With increasing awareness of the risks associated with obesity, a market for reduced calorie fats and fat replacers has opened up. Carbohydrate and protein-based fat replacers are currently available, but cannot be exposed to high temperatures. Therefore, lipid-based fat substitutes are the only option for use in cooking and frying applications and for mimicking all the attributes of a natural fat. Low calorie fats and fat replacers can be produced by restructuring lipids. In general, these structured lipids contain medium chain fatty acids (C8-C12) in the 1,3-positions and long chain fatty acids (C16-C22) in the 2-position of triacylglycerides. In the literature, particularly C8 and C10 fatty acids have been used for the production of low calorie structured lipids, however, a limited number of studies are available on the production of structured lipids enriched with lauric acid.

The aim of this project is the production of triacylglycerides enriched with lauric acid to be used in the formulation of low calorie fats. For this purpose, the acidolysis reaction of triolein with lauric acid in the presence of *Mucor miehei* lipase was studied in detail. The effects of reaction parameters (substrate ratio, amount of enzyme and time) on the percentage of incorporated lauric acid into triolein were investigated and reaction conditions were optimized using Response Surface Methodology.

Based on Response Surface Methodology, according to the reactions carried on at 50 °C maximum lauric acid content was found 49.3%. Critical synthesis conditions found by the statistical model were ; reaction time 5.9 h., 11.4% enzyme amount and 1/5.8 TO:LA mol ratio.

A second-order model was obtained to predict conversions as a function of time, enzyme percent and TO:LA mol ratio. The analysis of variance indicated that the second-order model was highly significant and adequate to represent the actual relationship between the response (LA content, %) and the significant variables with a satisfactory correlation coefficient 0.99.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Gelişmiş toplumlarda yüksek yağ içerikli ve yüksek kalorili yiyeceklerin tüketimi ve bunun yanında teknolojik gelişmeler sonucu toplumda fiziksel aktivitenin azalması obeziteyi yaygın bir sorun haline getirmiştir. Genel olarak obezite vücutta harcanmayan enerjinin yağ olarak adipoz (yağ) hücrelerinde aşırı derecede depolanması sonucu oluşan ciddi bir hastalıktır. Obezite, vucüt yapısında meydana gelen görünüş değişikliği dışında beraberinde hipertansiyon, kardiyovasküler ve kononer kalp rahatsızlıkları, diyabet, insülin direnci gibi önemli sağlık problemlerine sebep olmaktadır.

Obezite problemi bilincinin gelişimiyle, dünyada düşük kalorili yağların ve yağ ikame maddelerinin pazarı hızla büyümüşür. Günümüzde karbonhidrat ve protein bazlı yağ ikame maddeleri salata sosları, tatlılar gibi bazı gıda maddelerinde kullanılmaktadır. Ancak bu ikame maddeleri ısıt işleme dayanıklı değildirler. Bu yüzden, pişirme ve kızartma işlemleri gerektiren gıda maddelerinin üretiminde, ısıt dayanıklılığı olan ve doğal bir yağın tüm özelliklerini gösteren lipid bazlı yağ ikame maddelerinin kullanımı tek seçenek olmaktadır.

Lipid bazlı yağ ikame maddeleri esas olarak yapılandırılmış lipidlerdir. Yapılandırılmış lipidler (structured lipids), triaçilgliserollerin yapısı üzerinde yağ asitlerinin pozisyonlarının değiştirilmesi ve/veya yeni yağ asitlerinin spesifik olarak yerleştirilmesi ile oluşturulan özgün triaçilgliserol (TAG) yapılarıdır. Düşük kalorili yapılandırılmış lipidlerin bileşimlerinde bulunan TAG ların sn-1,3 pozisyonlarında orta zincir uzunluğundaki yağ asitleri (C8-C12) yer almakta olup sn-2 pozisyonunda ise uzun zincir uzunluğundaki yağ asitleri (C16-C22) bulunmaktadır. Bilindiği üzere, yağların bağırsaklarda sindiriminde 1,3-spesifik pankreatik lipaz enzimi ile açığa çıkan orta zincir uzunluğundaki yağ asitleri kolaylıkla kan yoluyla karaciğere taşınmakta ve β -oksidasyona uğrayarak kendilerinden enerji sağlamaktadır. Düşük kalorili yapılandırılmış yağlar karaciğerde hemen kullanıldığı için adipoz hücrelerde yağ depolanması olmaz. Diğer taraftan, bu yağların asitlerinden açığa çıkan enerji uzun yağ asitlerinininkine göre daha az olmaktadır.

Günümüzde, yapılandırılmış triaçilgliseroller özellikle enzimatik interesterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarıyla üretilebilmektedir. Literatürde spesifik lipaz enzimlerinin kullanıldığı yapılandırılmış lipidlerin enzimatik üretimi üzerine çok sayıda çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalarda orta zincir uzunluğunda yağ asitleri ile modifiye edilmiş TAG ların üretiminde daha çok C8 ve C10 asitlerinin kullanıldığı, laurik asit (C12) ile yapılmış çalışmaların az sayıda olduğu gözlenmiştir. Ayrıca laurik asit kullanılan bu çalışmalarda, özellikle tristearinin laurik asitle modifiye edildiği, triolein ile yapılmış tek çalışma da ise belirli bir reaksiyon koşulunda üretilmiş TAG ların saflaştırılmasına dönük deneylerin yürütüldüğü görülmektedir. Bu nedenle bu tezde, trioleinin laurik asit ile asidolizinin detaylı olarak incelenmesi ve Tepki Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology) kullanılarak reaksiyon parametrelerinin optimize edilmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR VE TEORİ

2.1. Yağ İkame Maddeleri

Yağ ikame maddeleri, gıda maddelerinde yağların yerine geçerek onların bir yada daha fazla rolünü üstlenebilen maddelerdir. Gıda maddelerindeki yağ miktarını azaltarak insanların fazla yağ alımını azaltmalarına yardımcı olmak amacıyla geliştirilmişlerdir [1]. Besin kaynaklarına göre karbonhidrat, protein ve yağ bazlı olmak üzere üç grupta sınıflandırılabilirler.

2.1.1. Karbonhidrat Bazlı Yağ İkame Maddeleri

Pazara 1960’larda girmiş ve halen en geniş kullanım alanına sahip olan yağ ikame maddeleri karbonhidrat bazlıdır. Bu ürünlere örnek olarak dekstrinler, maltodekstrinler, modifiye gıda nişastaları, selüloz ve çeşitli zamlar verilebilir[2]. Bu tür yağ ikame maddeleri, etlerde, salata soslarında, dondurulmuş gıdalarda, dipsoslarda, şekerlemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır [3]. Bu maddeler yağın kıvamlılık özelliğini karşılar fakat yağın pişirme özelliklerini karşılamazlar[2]. Karbonhidrat bazlı yağ ikame maddeleri doğal yağa göre daha düşük kaloriye sahip olmalarına rağmen, ısıya karşı dayanıksızlıklarından dolayı doğal yağ yerine kullanımları sınırlıdır[3].

2.1.2. Protein Bazlı Yağ İkame Maddeleri

Protein bazlı yağ ikameleri 1990’ların başlarında pazarda yerlerini almışlardır. Bu maddelerden ‘genellikle güvenli tanınan’ iki yağ ikame maddesi vardır. Bu ürünler yumurta beyazı ve süt ürünleri proteinlerinden elde edilen peynir altı suyu proteini konsantrelerinden ekstrakte edilip, mikropartikülasyon uygulanması ile elde edilirler. Mikropartikülasyon, proteinlerin birbirlerinin üzerlerinden kolayca kaymalarını sağlayacak şekilde mikroskobik yuvarlak tanecikler şekline getirilme prosesidir. Bu prosesin amacı protein bazlı bu maddelere yağa benzeyen, ağızda kremamsı bir sıvı hissi veren özellik yaratmaktır. Bu yağ ikame maddeleri, ağızda karbonhidrat bazlı

yağ ikame maddelerine göre daha iyi bir his bırakmakta ve bazı pişirilmiş gıdalarda da kullanılabilir. Fakat bu maddeler de kızartma için uygun değildir[3].

Simplese, Nutra Sweet tarafından üretilen protein bazlı bir yağ ikamesidir. Mayonez, salata sosları, yoğurt, ekşi krema, margarin, tereyağı ve peynir gibi gıdalarda kıvam artırıcı ve yapılandırıcı olarak kullanılmaktadır. Fakat fırınlama veya kızartma Simplese'in kremi yapısının bozulmasına sebep olduğu için pişirmede kullanılamamaktadır. Simplese dışında Kraft tarafından üretilen, Simplese gibi yağın 'damak hissi'ni verebilen, yumurta beyazı ve süt proteinlerinden üretilen Trailblazer adlı bir yağ ikame maddesi de bulunmaktadır[4].

2.1.3. Lipid Bazlı Yağ İkame Maddeleri

Lipid bazlı yağ ikame maddeleri yapılandırılmış yağlardır. Bunların çeşitli üretim şekilleri ve kullanım alanları vardır.

Yağ metabolizmasının incelenmesi ve artan bilgiler ışığında trigliserit anayapısı üzerindeki doymamışlık dağılımı ve pozisyonel dağılım, yapılandırılmış yağların sentezi üzerine çalışmalara yol açmıştır. Hastalıkların iyileştirilmesi ve sağlığın korunması açısından belirli yağ asitlerinin kullanımı bağlamında, yapılandırılmış yağların önemi giderek artmaktadır. En geniş anlamda, yağ asitlerinin pozisyonlarını değiştirmek üzere yeniden yapılandırılmış ve doğal haldeki yağ asidi bileşimini değiştirmek üzere modifiye edilmiş yağları yapılandırılmış yağ olarak tanımlayabiliriz. Biyoteknoloji ile, lipidler kolesterolü düşürmek, bağışıklık sistemini güçlendirmek, işlevselliği artırmak ve beyin gelişimini geliştirmek amacıyla yapılandırılabilirler.

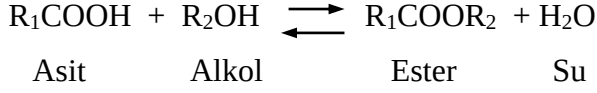
Yapılandırılmış yağlar yağlara uygulanan çeşitli kimyasal dönüşümlerle elde edilirler. Bu reaksiyonlar şunlardır:

Esterleşme Reaksiyonları

Bir alkol ile asidin katalizör varlığında reaksiyona girerek ester oluşturduğu reaksiyonlara esterleşme reaksiyonu denir. Bu reaksiyonun tersi hidroliz reaksiyonudur [5].

Esterler, monohidrik ve polihidrik alkollerle, etilen veya propilen oksitlerle, asetilen veya vinil asetatlarla yürütülen reaksiyonlarla elde edilirler. Esterleşme

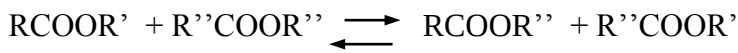
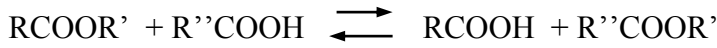
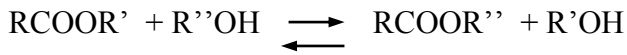
reaksiyonlarında en fazla kullanılan monohidrik alkoller metanol, 1-propanol, 2-propanol ve 1-bütanoldür. Esterleşme bir denge reaksiyonudur ve esterin yanında su da oluşur [6].



Esterleşme reaksiyonları genellikle asit katalizörler varlığında yürütülmektedir. Sülfürik asit, fosforik asit, organik sülfonik asitler ve hidroklorik asit gibi kuvvetli asitler kullanılmadığında da son derece yavaş gerçekleşen reaksiyonlardır [7].

İç Esterleşme Reaksiyonları

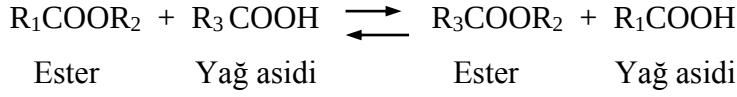
İnteresterifikasyon (iç esterleşme) reaksiyonları bir ester ile başka bir bileşen arasında gerçekleşen, alkoksi ve açıl gruplarının yer değiştirmesiyle karakterize edilen ve farklı bir ester oluşumuyla sonuçlanan reaksiyonlar olarak tanımlanabilir [6].



Yukarıda verilen reaksiyonlarda da görüldüğü gibi; interesterifikasyon reaksiyonları, esterin bir alkolle, bir asitle veya başka bir esterle olan reaksiyonlarıdır. Ester alkol arasındaki iç esterleşme reaksiyonlarına alkoliz, ester ile asit arasındaki iç esterleşme reaksiyonlarına asidoliz, ester ile başka bir ester arasındaki iç esterleşme reaksiyonlarına ise transesterifikasyon denir [6]. Ancak bazı kaynaklara göre transesterifikasyon (transesterleşme) bir esterin bir asit, bir alkol, bir başka ester ve bir amin ile olan reaksiyonlarını ifade eden genel bir terim olarak kullanılmaktadır [8].

Asidoliz Reaksiyonları

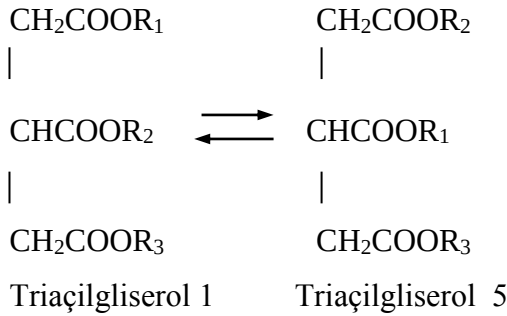
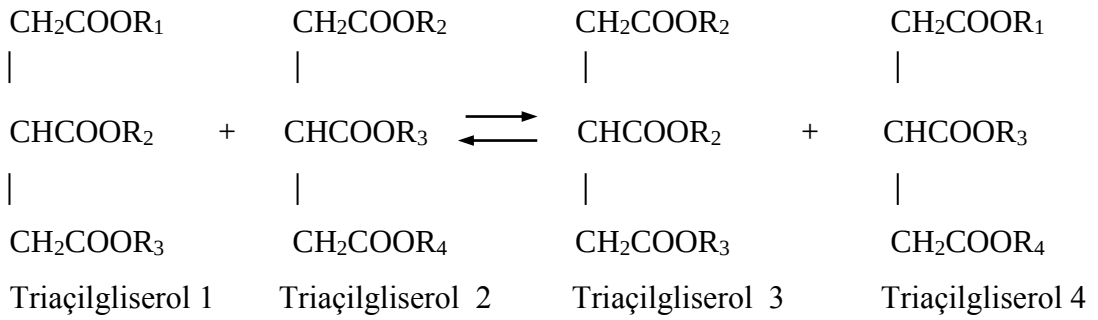
Bir asit ile esterin reaksiyona girmesiyle alkil gruplarının yer değiştirmesi sonucu yeni bir ester oluşmasına asidoliz denir [5].



Bu reaksiyonlar gerçekleşmesi için yüksek sıcaklık veya asit katalizör ya da her ikisi birden gereklidir [6].

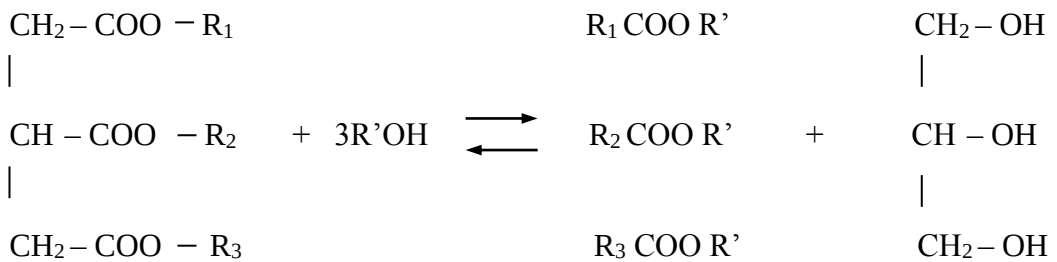
Transesterifikasyon Reaksiyonları

Transesterifikasyon (ester değişimi) reaksiyonları, iki ester arasında gerçekleşen ve farklı iki ester oluşumuyla sonuçlanan reaksiyonlardır [6].



Alkoliz Reaksiyonları

Bir alkol ile esterin reaksiyona girmesiyle alkil gruplarının yer değiştirmesi sonucu yeni bir ester ve alkol oluşmasına alkoliz denir [9].

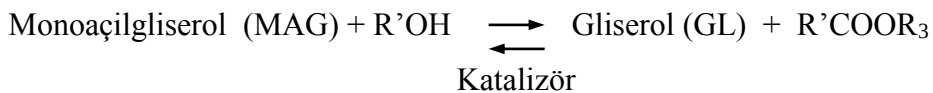
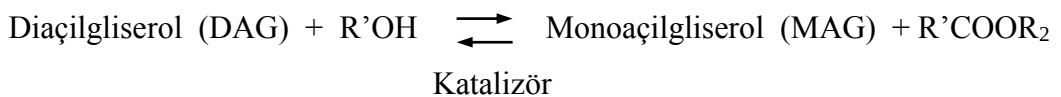
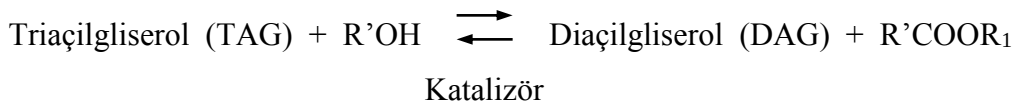


Alkoliz reaksiyonları denge reaksiyonları olup alkol fazlası reaksiyonu ürün lehine döndürür. Bu reaksiyon için stokiyometrik oran 3 mol alkole karşılık 1 mol yağ olmasına karşın pratikte ürün verimini arttırmak için stokiyometrik oran yerine daha yüksek alkol/yag mol oranlarında çalışılmaktadır [7].

Alkoliz reaksiyonunu hızlandırmak için asit, alkali veya enzimatik katalizörler kullanılabilir. Alkali katalizörler olarak NaOH, KOH, sodyum metoksit, sodyum etoksit, sodyum propoksit veya sodyum butoksit tercih edilir. NaOH ise hem ucuz olması hem de kolay temin edilebilmesi sebebiyle bu reaksiyon için en çok kullanılan alkali katalizördür. Genel olarak bakıldığında da alkali katalizörler reaksiyonu asit katalizörlere göre daha hızlı yürüttüğünden daha çok tercih edilirler [7]. Alkali katalizörlü alkolizde, gliserollerin ve alkollerin susuz olması gerekir; çünkü su sabunlaşma reaksiyonuna sebep olur. Sabun oluşumu ester miktarını azaltır, ester ve gliserolün ayrılmasını zorlaştırır [5].

Alkolizde kullanılan asit katalizörler ise sülfürik asit, fosforik asit, hidroklorik asit, ve organik sulfonik asitlerdir. Asit katalizli reaksiyonlar alkali katalizörlü reaksiyonlara göre daha yavaş yürür. Bu nedenle asit katalizörler su ve serbest yağ asidi içeren triağılgiserollerin alkolizi için uygundur [5].

Alkoliz reaksiyonlarında enzimler de katalizör olarak kullanılır. Bu amaçla kullanılan enzimler lipazlardır. Ancak enzimin aktivitesini korumak için reaksiyon koşullarının çok iyi denetlenmesi gerekmektedir [7]. Alkoliz reaksiyonu için katalizör olarak lipaz kullanıldığında triağılgiseroller ve kısmi gliseroller önce lipaz varlığında hidrolize olarak kısmi gliserol ve serbest yağ asidi verirler. Metil esterler de, metanol ve serbest yağ asidinin esterleşme reaksiyonu sonucu oluşur [5].



Enzimatik alkolizde, alkoliz reaksiyonunda bir yan ürün olarak ortaya çıkan gliserolin geri kazanılması diğer katalizörlerle gerçekleştirilen alkoliz reaksiyonlarına göre daha kolaydır. Ayrıca enzimler atık yağlar içerisindeki serbest yağ asitlerinin de bütünüyle metil esterlere dönüştürülmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca enzimatik alkolizin diğer bir avantajı da kullanılan lipazın substrat seçiciliğine bağlı olarak, farklı bileşim ve özelliklere sahip pek çok ürünün elde edilmesidir [5,10].

Alkoliz reaksiyonlarında sadece metanol, etanol, propanol, butanol ve amil alkol gibi basit alkoller kullanılır. Bu alkoller arasında en çok tercih edilen alkol metanoldür. Çünkü metanol en kısa zincirli alkoldür ve ayrıca polar bir bileşiktir [7].

Endüstriyel olarak alkoliz reaksiyonu, genellikle bitkisel yağların güçlü bir asit veya baz varlığında 100 °C ile 200 °C arasında ısıtılmasıyla gerçekleşir. Çeşitli katalizörlerin kullanıldığı geleneksel kimyasal teknoloji ile alkil esterlerin üretimi, gliserolün yeniden elde edilme zorluğu, katalizörün uzaklaştırılması ve yüksek enerji sarfıyatı gibi pek çok dezavantaja sahiptir. Bu nedenle alkoliz reaksiyonlarında lipazların kullanımının bu dezavantajları ortadan kaldıracabileceği düşünülmektedir [9].

Yapılandırılmış lipid uygulamalarına örnek olarak aşağıda açıklanan üretimler verilebilir:

- Kakao yağı ikameleri
- Anne sütü yağı benzerleri
- Sağlık ve gıda değeri yüksek bileşikler
- Düşük kalorili yağlar
- Diğer uygulamalar [11].

2.1.3.1. Kakao Yağı İkameleri

Kakao yağının, çikolata ürünlerinin fiziksel özellikleri üzerindeki etkisinden dolayı şekerleme endüstrisinde büyük yeri vardır. Bu etkiler parlaklık, ısıya dayanıklılık ve ağızda bıraktığı hoş tat ve aromadır[13]. Fakat pahalı bir hammadde olmasından dolayı endüstride kakao yağının yerini tutacak yeni maddeler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Kakao yağının % 70'inden fazlasını sn-2 pozisyonunda oleik asit

içeren triaçilgliseroller oluşturmaktadır.[12] Doğada kakao yağına benzer yapıda başka yağ bulunmamaktadır; bu yağın alternatifleri karışım halinde kullanılan bitkisel yağlar ve modifiye yağlardır [13].

Palm yağı, palm yağı ara fraksiyonları, illipe (shorea stenoptera) yağı, shea (Butyro dpermum) bilinen kakao yağı muadilleridir. Ayrıca bazı karışım alternatifleri de mevcuttur.

2.1.3.2. Anne Sütü Yağı Benzerleri

İdeal bir bebek maması formülasyonu elde etmek için yağ asitleri dizilimi ve miktarı anne sütündekilerle aynı olmalıdır. Ticari formülasyonlarda bitkisel yağlar kullanılarak üretimler yapılmaktadır. Anne sütünün trigliserit yapısında esterleşen palmitik asitin %70'i 2 pozisyonunda yer alır. Bitkisel yağlarda ise palmitik asitin %80'inden çoğu trigliseridin 1,3 pozisyonlarında yer alır. Bağırsaklarda pankreatik lipaz sadece bu yapıdaki 1,3 pozisyonunda esterleşen asitleri hidroliz eder. Dolayısıyla bitkisel yağların kullanılması durumunda, serbest kalan palmitik asit daha sonra sütte bulunan kalsiyum ile suda çözünmeyen kalsiyum sabunları oluşturabilir ve bunlar dışkı ile dışarı atılır. Bunun sonucu olarak vücut için gerekli enerji ve kalsiyum kaybedilmiş olur. Bu durum küçük çocuklar için problem yaratabilir çünkü temel bes kaynakları olan sütün, kemik gelişimi için gerekli olan kalsiyumundan yeterli miktarda faydalanamamış olurlar. Anne sütü trigliseritlerine benzer yapıda yapılandırılmış trigliserit üretimi, 1,3-spesifik lipaz kullanılarak palm yağından elde edilen tripalmitin ile bitkisel yağlardan elde edilen oleik asitin transesterifikasyonu ile yapılır. Bu durumda 2 pozisyonunda esterleşen asitler karaciğerde yerleşerek gerekli kalsiyum ve enerji kaynağını sağlarlar. Bu tür trigliseritler çocuk mamalarında kullanılırlar. Betapol, enzim teknolojisi ile elde edilen ve anne sütü yağı yerine kullanılan ticari bir üründür[11].

2.1.3.3. Sağlık ve Gıda Değeri Yüksek Bileşikler

Bu bileşiklerin temelinde gıda ve sağlık açısından önemli etkileri saptanmış bazı yağ asitlerinin trigliserit moleküllerine yerleştirilmesidir. Bu asitler örnek olarak balık yağ asitleri (DHA- dokosaheksanoik asit ve EPA- eikosapentaenoik asit) ve gamma-linoleik asiti (GLA) gösterebiliriz. Bu asitlerin triaçilgliserit yapısındaki belirli pozisyonlara katılması için de yine biyoteknolojiden yararlanılır. Spesifik

lipaz enzimleri ile yürütülen asidoliz reaksiyonları ile DHA, EPA, veya GLA' nın trigliserit yapısına katılması mümkün olabilmektedir [11].

2.1.3.4. Düşük Kalorili Yağlar

Bitkisel yağ asitlerinin çoğu karbon sayıları 16-22 arasında değişen uzun zincirli yağ asitleridir. 8-12 arasında karbon içeren yağ asitleri orta zincirli yağ asitleri olarak adlandırılırlar. Bu yağ asitlerinin vücutta oksidasyonunda uzun olanlara göre daha az kalori verdiği bilinmektedir. Ayrıca orta zincirli yağ asitlerinin sindirimi daha kolaydır. Bağırsaklardan emilimi uzunlara göre daha kolay gerçekleşir. Dolayısıyla bu asitleri içeren trigliseritlerin tercihli olarak vücutta kullanımı sonucu daha az enerji ortaya çıkar. Bu tür ürünler doğada bulunmaz ve kimyasal sentezle hazırlanması çok zordur, ancak enzimatik reaksiyonla elde edilmeleri mümkündür [11]. Düşük kalorili yağlar çalışma konumuzdur. İleriki bölümlerde geniş olarak incelenecektir.

2.1.3.5. Diğer Uygulamalar

Enzimatik reaksiyonlarla EPA, DHA ve CLA gibi özel yağ asitlerinin trigliserit içerisinde zenginleşmesi sağlanabilir. Balık yağlarının lipaz enzimleri ile seçimli hidrolizi ile EPA ve DHA'ca zengin trigliserit molekülleri elde edilebilmektedir. Benzer reaksiyonlar CLA ve GLA zenginleşmesinde de uygulanmaktadır [11].

2.2. Düşük Kalorili Yağlarla Yapılan Çalışmalarla İlgili Literatür Çalışması

Sellapan ve Akoh kaplama yağları üretmek için tristearinin laurik ve oleik asitle enzimatik asidolizi üzerine bir çalışma yapmışlardır. n-hexan ortamında Lipozym IM60 lipazını kullanarak yürütülen tristearinin laurik ve oleik asitle asidolizinde sıcaklık, zaman, substrat mol oranı, enzim miktarı, enzim geri kullanımı gibi parametrelerin etkileri incelenmiştir. Ürünlerin erime profilleri diferansiyel tarayıcı kalorimetri (DSC) ile belirlenmiştir. 1:4:1 (tristearin/laurik asit/oleik asit) substrat oranında elde edilen ürün makul bir erime profili göstermiştir. Bu ürünün DSC erime piki 31.4 °C olarak gözlenmiştir. Karıştırmalı kesikli reaktörde 1:4:1 substrat oranında optimum koşullar altında yürütülen asidoliz sonunda 1200 g. ürün elde edilmiş, bu ürün destilasyon ile saflaştırıldıktan sonra, krakerlerin kaplanmasında kullanılmıştır. Kaplanmış krakerler bir desikatörün içerisinde doygun su buharı

atmosferi altında tutularak kaplama maddesinin nem engelleme kabiliyeti araştırılmıştır. Sentezlenen bu yağın kaplama özelliği, kaplanmamış krakerlerle ve kakao yağı kaplı krakerlerle karşılaştırılmış ve sentezlenen yağın nem absorpsiyonunu engelleme açısından kakao yağından daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır [14].

Nieto ve arkadaşları ise orta ve uzun zincir uzunluğunda yağ asitleri içeren yapılandırılmış triaçilgliserollerin *Mucor miehei* steriyospesifik lipazı ile interesterifikasyonla sentezini gerçekleştirmişler. Sn-1, sn-3 dilauril, sn-2 elkosapentaenol gliserol ve sn-1, sn-3 dilauril, sn-2 dokosahekzaenol gliserol yapılandırılmış gliserollerinin sınırlı su varlığında enzimatik interesterifikasyonunda gerekli substratlardan laurik asit, *Candida cylindracea*'dan elde edilen bir non-spesifik lipaz ile hindistan cevizi yağının kontrollü hidrolizi sonucunda elde edilmiştir. Yağ asidi hidroliz ürünlerinden kolon kromatografisi ile ayrılmış ve metil esterine dönüştürülmüştür. sn-2 elkosapentaenol gliserol ve sn-2 dokosahekzaenol gliserolleri sn-1 sn-3 spesifik *Mucor miehei* orijinli immobilize lipaz Lipozyme IM-20 ile katalizlenen balık yağı hidrolizi ile hazırlanmıştır. İnteresterifikasyon su ceketli cam reaktörde yürütülmüş ve triaçilgliserol ürünleri alüminyum oksit kolon kromatografisinden geçirilerek saflaştırılmıştır. Tarif edilen bu interesterifikasyon prosedürü ile laboratuvar ölçeğinde, orta zincirli asitlerini sn-1 ve sn-3, uzun zincirli çoklu doymamış asitlerini sn-2 pozisyonunda bulunduran yapılandırılmış triaçilgliserollerinin üretilebileceği açıklanmıştır [15].

Miura ve arkadaşları ise yapılandırılmış bir triaçilgliserol olan 1,3-dilauril-2-oleil-gliserolün (LaOLA) enzimatik sentezi ve saflaştırılmasını incelemişlerdir. Laurik asit ve triolein arasındaki enzimatik transesterifikasyon ile 1,3-pozisyon seçiciliği olan Lipozyme IM kullanarak % 70 LaOLA içeren bir fraksiyon elde edilmiştir. Bu üründen, transesterifikasyon sırasında üretilen mono- ve diaçilgliserollerin uzaklaştırılmasında ve elde edilen TAG fraksiyonundaki, farklı TAG türlerinin ayrılması için kolon kromatografisi uygulamaları yapılmıştır. Bu metotla elde edilen LaOLA fraksiyonunun %99'dan daha yüksek bir saflıkta olduğu açıklanmıştır[16].

Wongsakul ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada triaçilgliseritlerin lipaz katalizli sentezi için yeni bir metod geliştirmişlerdir. Bu çalışmada öncelikle sn1,3-dilaurin ve -dikaprin enzimatik olarak sentezlenmiş, daha sonra bu ürünler farklı lipazlar kullanılarak oleik asit veya vinil esteri ile sn2-pozisyonlarından esterleştirilmişlerdir.

Reaksiyonlar organik çözücü varlığında veya çözücüsüz sistemlerde gerçekleştirilmiştir. İmmobilize *Burkholderia cepacia* lipazı kullanılarak 60 °C’de n-hekzan ortamında yürütülen reaksiyonlarda %87 ve %78 1,3-dikapriol-2-oleil-gliserol veya 1,3-dilauril-2-oleil-gliserol (CyOCy veya LaOLa) bileşiklerini içeren ürünler elde edilmiştir. Düşük basınç altında sn-1,3-DAG ve serbest oleik asit’in esterifikasyonunda çözücü kullanıldığında reaksiyon veriminin %20’den daha düşük olduğu, buna karşılık çözücüsüz bir ortamda %50 civarı verim değeri elde edilebildiği belirlenmiştir [17].

Rao ve arkadaşları, hindistan cevizi yağından elde edilmiş trigliseritler yüksek oranda laurik asit içeren trigliseritleri, immobilize lipaz (*Rhizomucor miehei* orijinli IM 60) varlığında stearik asit ile reaksiyona sokmuşlardır. Reaksiyonlar organik çözücü içerisinde yürütülmüştür. Trigliseritlere maksimum stearik asit bağlanması, trigliserit stearik asit mol oranının 1:6 olduğu durumda 37 °C de 4 saatte veya 60 °C’de 2 saatte sağlanmıştır. Bu koşullar altında, hindistan cevizi trigliseritlerinin içerisindeki stearik asit seviyesi ilk başlangıç değeri olan %2’den % 60’a yükseltilmiştir. Diferansiyel taramalı kalorimetri ile moleküllerdeki stearik asit artışının katı yağ içeriğini artırdığını ve bu modifiye yağların daha yüksek erime profilleri gösterdiği belirlenmiştir. Bu şekilde elde edilen modifiye yağlar birçok değişik gıda uygulamalarında kullanım alanı bulmaktadır [18].

Zhou ve arkadaşları, çözücüsüz ortamda kolza yağı ile kaproik asitin asidolizini Lipozim RM IM lipazı varlığında gerçekleştirmiş ve reaksiyon parametrelerini tepki yüzey metodolojisi ile optimize etmişlerdir. Kolza yağına kaproik asitin katılımında optimum reaksiyon koşulları 17 saat, reaktan oranı 5, %14 enzim miktarı, %10 su ilavesi ve sıcaklık 65 °C olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda yağa % 55 mol oranında kaproik asit bağlanmış yapılandırılmış triaçilgliserol ürünleri elde edilmiştir [19].

Schimid ve arkadaşları lipaz enzimleri kullanarak gliserolün sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında aynı cins yağ asiti (A) ve sn-2 pozisyonunda başka bir cins yağ asiti (B) bulunan ABA yapısında yapılandırılmış trigliseritler sentezlemişler ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu üzerine çalışmışlardır. Reaksiyonlarda önce 2-monopalmitin üretilmiş, daha sonra bu 2-monopalmitinin oleik asitle esterifikasyonu gerçekleştirilerek 1,3-oleil-2-palmitoil-gliserol elde edilmiştir. Bu iki kademeli reaksiyonda *Rhizomucor miehei* ve *Rhizopus javanicus* orijinli lipazlar kullanılmıştır. Bu iki kademeli reaksiyonda su aktivitesinin, çözücünün ve lipaz immobilasyonunda

kullanılan taşıyıcının, ürünlerin saflığına ve bileşimine olan etkileri incelenmiştir [20].

Famuso ve Akoh düşük kalorili yapılandırılmış lipidler (SL) eldesi için, trioleinin kaproik ve bütirik asitle lipaz katalizörlüğünde asidoliz reaksiyonlarını incelemişlerdir. Triolein, kaproik ve bütirik asidin 1:4:4 mol oranlarındaki karışımı, 24 saat boyunca, 55 °C’de ve %10 oranında lipaz varlığında reaksiyonu sonucu, içerisinde %13 reaksiyona girmemiş triolein, %49 disüstitüye ve %38 monosüstitüye kısa zincirli yağ asitlerinden ibaret ürün elde edilmiştir[21].

Akoh ve Yee ise düşük kalorili yapılandırılmış yağların enzimatik üretiminde, immobilize *Rhizomucor miehei* orijinli sn-1,3-spesifik lipaz (IM60) kullanarak tristearin ve trikaprinin interesterifikasyonu üzerinde çalışmışlardır. Reaksiyon parametrelerinin (zaman, sıcaklık, enzim miktarı, substrat mol oranı, su miktarı ve reaksiyon ortamının) ürün bileşimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir [22].

Shieh ve arkadaşları trioleinin orta zincirli kaprik asit (C₁₀) ile modifikasyonunda, reaksiyon zamanı, sıcaklık, kaprik asidin trioleine molar substrat oranı ve enzim miktarının ürün bileşimine olan etkilerini tepki yüzey metodolojisi ile incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, reaksiyon optimum koşulları %10 enzim miktarı, 6:1 molar substrat oranı, 25°C’de 30 saatlik reaksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Mono ve dikaproolein için toplam %100’e varan bir verim elde edilmiştir [23].

Senanayake ve Shahidi, dokosahekzaenoik asit (DHA)’in boraj yağına katılımlarında *Candida antarctica* orijinli immobilize Novozym 435 lipazını kullanmışlar ve koşulları tepki yüzey metodolojisi (RSM) kullanarak optimize etmişlerdir. Sonuç olarak optimum koşullarda (165 ünite enzim konsantrasyonunda, 25 saatlik reaksiyon süresinde, 50°C’de) boraj yağına %34,1 DHA bağlanabilmektedir. Varyans analizi sonucu korelasyon katsayısı 0,97 bulunmuştur, bu da modelin uygunluğunu doğrulamıştır [24].

2.3. Tepki Yüzey Metodoloji (Response Surface Methodology)

Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM) matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı ve bağımlı değişkenin (tepkinin) çok sayıda bağımsız değişkenden (parametrelerden) etkilendiği problemlerin analizinde, modellemesinde ve tepkinin

optimizasyonunda uygulanan bir yöntemdir [25, 26]. TYM ile bir seferde birden fazla değişkenin tepki üzerine olan etkisi denenebilmekte, özel deney tasarımları kullanarak optimizasyon için gerekli deney sayısını azaltabilmektedir. Kısacası, TYM tepkinin en iyi değerini bulmak için oluşturulmuş bir teknikler bütünüdür. Bu teknikler, ilk olarak Box ve Wilson tarafından 1951 yılında ortaya konmuştur. Daha sonra 1957 yılında Box ve Hunter'in, 1958 yılında Bradley'in , 1958-1959 yılları arasında Hunter ve 1960 yılında ise Davies'in TYM üzerindeki çalışmaları kullanılan teknikleri geliştirmiştir. Bu tekniklerin tümü deneyin tasarımını ve elde edilen deneysel sonuçların analizini kapsamaktadır [25, 27].

Bu metodoloji kullanılırken öncelikle ölçülmek istenen tepki üzerine en fazla etki ettiği düşünülen değişkenler seçilir. Daha sonra bu değişkenlerin ölçülebilecek değer aralıkları ön denemeler ve literatür araştırması ile belirlenir. Bundan sonra yapılması gereken uygun model denklemin seçilmesidir. Model denklem, ölçülen tepkiyi proses değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak ifade eder. Bu model denklemler birinci veya ikinci dereceden olabilir. Model denklemin belirlenmesinin ardından uygun deney tasarımı tespit edilir. Bunlar arasında en önemlileri merkezil bileşik, Box-Behnken, tam fonksiyonel, kısmi faktoriyel, rastgele, Latin kareler, Taguchi ve Plackett_Burmann deney tasarımlarıdır. Bu tasarımlar sayesinde optimizasyon için yürütülmesi gerekli deneylerin koşulları ve deney sayıları belirlenmiş olur [25-27].

Merkezil bileşik deney tasarımları, küp noktalar (cube points), yıldız noktalar (star points) ve merkez noktaları (center points) olmak üzere üç tip deneysel noktayı kapsamaktadır. Küp noktaları için kodlanan bağımsız değişken değerleri ± 1 dir. Merkezil bileşik deney tasarımında ikinci nokta grubu olan yıldız noktalarının ($\pm\alpha$, 0,0,...0), (0, $\pm\alpha$, 0, ...0), (0, 0,...0, $\pm\alpha$) koordinatları vardır. Üçüncü grup noktalar koordinatları daima (0,...0) olan ve tasarım merkezinde yerleşen noktalardır. Merkez noktaların sayısı Tablo 2. X da da gösterildiği gibi kullanılan ortagonal dizaynla belirlenmektedir [26].

Tablo 2.1: Merkezil bileşik deney tasarımları [26].

Bağımsız Değişken Sayısı k	2. Dereceden Modelde Parametre Sayısı p	Küp Noktaları sayısı 2^k	Yıldız Noktaları		Ortogonal Tasarım	
			Sayı $2k$	Değer α	Merkez Nokta Sayısı	Toplam Nokta Sayısı
2	6	4	4	1.414	8	16
3	10	8	6	1.682	9	23
4	15	16	8	2.0	12	36
5	21	32	10	2.378	17	59
5.5 tekrar	21	16	10	2.0	10	36
6	28	64	12	2.828	24	100
6.5 tekrar	36	32	12	2.378	15	59
7	36	128	14	3.364	35	177
7.5 tekrar	45	64	14	2.828	22	100
8	45	256	16	4.0	52	324
8.5 tekrar	45	128	16	3.364	33	177
8.25 tekrar	45	64	16	2.828	20	100

Yüzey merkezli küp deney tasarımında (Face Centered Design) $\alpha = 1$ dir. Dizayn merkezi ise (0, 0, 0) koordinatlarına sahip merkez noktadır. Bu deney tasarımında, yıldız noktalar kübün yüzlerinin tam ortasında yer almaktadır [28].

Tepki Yüzey Metodolojisinin gıda araştırmalarında kullanımı ile ilgili ilk detaylı derleme Hill ve Hunter tarafından 1966 yılında yayınlanmıştır [29]. Literatürde yapılandırılmış lipidlerin üretimlerinde TYM kullanımı ile reaksiyon koşullarının optimize edilmesi üzerinde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Trioleinin kaprik asit ile modifikasyonunda ve kolza yağından kaproik asitce zenginleşmiş triaçilgliserollerin sentezinde 4-5 değişkenli ve yıldız noktalı merkezil bileşik deneysel tasarımlar kullanılmış ve reaksiyon koşulları optimize edilmiştir [30-32]. Koka yağından n-3 ve n-6 yağ asitlerince zengin yapılandırılmış lipidlerin üretiminde [32]; menhaden balık yağının kaprilik asit ile modifikasyonunda [31]; tripalmitinin eikosapentaenoik ve dokosahekzaenoik asitlerin etil esterleri ile interesterifikasyonunda [33] ve boraj (hodan) yağına dokosahekzaenoik asitin katılımında [24] ise 3 değişkenli ve 3 seviyeli küp tasarımına göre deneylerin tasarımı yapılmış ve reaksiyon değişkenleri optimize edilmiştir.

Bu çalışmamızda, trioleinden laurik asitce zenginleşmiş triaçilgliserollerin üretiminin optimizasyonunda 3 değişkenli ve 3 seviyeli küp deneysel tasarım modeli seçilmiş, bu tasarıma uygun sayıda asidoliz reaksiyonları yürütülmüş ve sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi yapılmıştır. Böylece triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonu optimize edilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1. Kullanılan Hammaddeler

Bu çalışmada kullanılan triolein (T 7752, % 65 teknik saflıkta) ve laurik asit (L 4250, %99-100 saflıkta)) Sigma-Aldrich (Buchs, İsviçre) firmasından temin edilmiştir. Asidoliz reaksiyonlarında Lipozyme IM ticari lipaz enzimi kullanılmıştır. *Mucor miehei* orijinli ve 1,3-spesifikliği olan bu enzim Novo-Nordisk A/S (Copenhagen, Danimarka) firmasından satın alınmıştır. Reaksiyon ürünlerinin analizinde, yağ asitlerinin bileşimlerinin saptanması ve tanımlanmasında kullanılmış tüm çözücüler ve diğer kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasının saf ürünleridir.

3.2. Çalışma Yöntemi

3.2.1. Kullanılan Hammaddelerin Karakterizasyonu

Çalışmamızda substrat olarak kullanılan laurik asit oldukça saf, buna karşılık triolein saf olmadığından önce laurik asit ve trioleinin yağ asitleri bileşimleri kapiler gaz kromatografisi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla önce bu substratların BF₃ metanol kompleksi ile metil esterleri hazırlanmış ve Hewlett-Packard 5890 Seri II (Hewlett-Packard, Waldron, Almanya) gaz kromatografi cihazına beslenmiştir. Uygulanan kromatografik analiz koşulları Tablo 3.1’de verilmiştir. Kromatogramlarda yer alan piklerin tanımlanmasında, 8:0, 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 ve 20:0 yağ asitlerinin metil esterlerini içeren standart yağ asitlerinin metil esterlerinin aynı cihaz ve koşullarda yapılan analizlerinden elde edilmiş kromatogramları kullanılmıştır.

3.2.2. Triolein ile Laurik Asitin Asidolizinde Uygulanan Yöntem

Asidoliz reaksiyonları 25 mL’lik kahverengi renkli, ısıya dayanıklı ve kapaklı cam reaksiyon kaplarında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon kabına 0,7 gram substrat karışımı (belirli reaktan oranında triolein ve laurik asitten hazırlanmış karışım) ve 5,0

mL hekzan konulduktan sonra, reaksiyon kabı sıcaklığı ayarlanabilen orbital çalkalayıcıya (Edmund Bühler, KS-15, Almanya) yerleştirilmiştir. Çalkalayıcının sıcaklığı reaksiyon süresi boyunca 50°C’de sabit tutulmuştur. Çalkalayıcıya yerleştirilen karışımın sıcaklığı 50°C’ye erişince ortama substratların ağırlıkça belirli bir yüzdesi kadar enzim ilavesi yapılarak reaksiyonun başlaması sağlanmıştır. Reaksiyon sonlandırılana kadar reaksiyon karışımı 200 rpm sabit hızla karıştırılmıştır. Belirli sürenin sonunda çalkalayıcı durdurulmuş ve reaksiyon karışımından 2 mL’lik numune alınmıştır. Bu numunenin analizleri yapılarak asidoliz reaksiyonunun değerlendirilmesi yapılmıştır.

Tablo 3.1: Gaz Kromatografik Analiz Koşulları

Dedektör tipi	FID ⁽¹⁾
Dedektör sıcaklığı (°C)	280
İnjesiyon sıcaklığı (°C)	250
Gaz hızları (mL/dak)	
Azot	1,6
Hidrojen	33
Hava	460
Dağıtma oranı	88:1
Fırın sıcaklığı	150°C (5 dak) 150-275 °C (5°C/dak) 275 °C (10 dak)
Kolon tipi	Kapiler kolon Ultra 2 ⁽²⁾

(1) Alev iyonizasyon dedektörü

(2) 25m x 0,32mm, 0,52µm film kalınlığında %5 difenil ve %95 dimetil polisiloksan

3.2.3. Asidoliz Ürünlerinin Analizi

Asidoliz reaksiyonu ürün karışımından alınmış numuneler anında 90-100°C'lik su banyosunda 15 dakika ısıtılmıştır. Böylece lipaz enziminin inaktive edilmesi sağlanarak reaksiyon tamamiyle sonlandırılmıştır. Bilindiği üzere, asidoliz reaksiyonunun ana ürünü triolein triaçilgliserollerinden türemiş yeni bir yağ asiti profiline sahip triaçilgliseroller (TAG) dir. Bu TAG'ler ortamda reaksiyona girmemiş laurik asit ile trioleinden açığa çıkmış yağ asitleri (YA) ile birlikte bulunurlar. Yeni oluşmuş bu TAG'ların analizleri yapılabilmesi için ortamda bulunan YA'lerinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla numunelere 5 mL hekzan ve 5 mL etil alkol ilave edilmiş, fenolftalein eşliğinde dikkatli bir şekilde 0,02 M NaOH çözeltisi ile titrasyonu yapılmıştır. Bu esnada numune içerisinde bulunan serbest yağ asitlerinin sodyum tuzları haline geçmesi sağlanır. Daha sonra bu karışım içerisinde su ve hekzan bulunan ayırma hunisine aktarılmış, TAG fraksiyonunu içeren hekzan fazının yağ asitleri sodyum sabunlarını içeren sulu fazdan ayrılması için belli bir süre beklenmiştir. Ayırma hunisinden alınan hekzan fazı daha sonra döner buharlaştırıcı da çözücüsü tamamen uçurulana kadar evapore edilmiştir. Böylece saf olarak TAG ürünleri elde edilmiştir.

Elde edilen TAG fraksiyonları metanolik sodyum hidroksit ve BF_3 ile metil esterlerine dönüştürülmüş ve yağ asitleri bileşimi kapiler gaz kromatografisinde Bölüm 3.2.1'de açıklanan analiz koşullarında belirlenmiştir. Gaz kromatogramlarının değerlendirilmesi ile yeniden yapılandırılmış TAG'ların yağ asiti bileşimleri ve trioleine katılan laurik asitin yüzdesi belirlenmiştir.

3.2.4. Deneysel Tasarımda Kullanılacak Değişkenlerin ve Değişken Seviye Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimatik olarak trioleinden laurik asitce zenginleşmiş TAG ların eldesinde, reaksiyon parametrelerinin (değişkenlerin) ürün bileşimi üzerine olan etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla deneysel tasarımdan yararlanılmıştır. Bu amaçla Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılmıştır. 3 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak asidoliz deneylerinin tasarımı yapılmıştır.

Literatür verilerine göre, yapılandırılmış lipidlerin üretiminde reaksiyon zamanı, substrat oranı, enzim miktarı ve reaksiyon sıcaklığı en önemli değişkenlerdir [24-30].

Optimizasyon için parametrelerin ve parametre etki aralıklarının seçimi önemli olup, sadece reaksiyon sistemine göre değil aynı zamanda ekonomiklik ve uygulanabilirlik faktörleri de dikkate alınarak seçilmelidir. Genellikle uzun reaksiyon sürelerinde ve yüksek enzim miktarlarında yüksek ürün verimi elde edilir, ancak ekonomiklik ve uygulanabilirlik açısından kısa reaksiyon zamanında ve daha az miktarda enzimle çalışmak tercih sebebidir. Yüksek sıcaklıkta çalışmak reaksiyon hızını arttırmakta ise de diğer taraftan sıcaklığın yükseltilmesi enzimlerin yarılanma süresini kısaltmaktadır. Benzer şekilde, yüksek substrat konsantrasyonlarında ürünlerin denge verimlerinde artışlar sağlanabilir, buna karşılık bu yüksek konsantrasyonlar enzimleri inhibe edebilir. Enzimlerin aktivitesinde ortamdaki su miktarı da çok önemlidir. Yüksek su miktarı hem başlangıç reaksiyon hızını hem de yan ürünlerin oluşumunu artırır. Bütün bu faktörler ürün verimini ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu birlikte etkilemektedir [15,16]. Bundan dolayı optimizasyon için parametrelerin etki aralıklarının seçiminde çok yönlü düşünülmelidir. Bu yüzden TYM ile deneylerin tasarımında parametreler için seçilecek seviye değerleri keyfi olarak belirlenmemeli, aynı reaksiyon sisteminde yapılacak ön denemeler ile saptanmalıdır. Bu nedenlerden dolayı bu çalışmanın birinci bölümünde ön denemeler yapılarak parametrelerin seviye değerleri belirlenmiştir.

Değişkenler olarak enzim miktarı, substratların mol oranı ve reaksiyon süresi seçilmiştir. Kullanılan enzimin optimum sıcaklığı olan 50 °C da çalışıldığından sıcaklık parametre olarak incelenmemiştir. Lipozyme IM enzimi %2-3 su taşıdığından reaksiyon için gerekli su enzim ile sağlandığından, ortamdaki suyun etkisi de incelenmeye alınmamıştır. Seçilen değişkenlerin (enzim miktarı, substratların mol oranı ve reaksiyon süresinin) etkin oldukları aralıklar ve bu aralıklarda 3 seviye değerinin belirlenmesi için, önce 3 seri asidoliz deneyi yürütülmüştür. Her bir seride, 2 parametre sabit tutularak 3. parametrenin farklı değerlerinde asidoliz reaksiyonları yürütülmüştür. Reaksiyonlar Bölüm 3.2.2. de verilen yöntemle göre gerçekleştirilmiş, asidoliz ürünlerinin analizi ise Bölüm 3.2.3. de açıklanan deneysel prosedüre göre yapılmıştır. Yürütülen 3 seri asidoliz reaksiyonları sonucunda, enzim miktarının /substratların mol oranının /reaksiyon süresinin değişimine göre ürün TAG larındaki laurik asit miktarının değişim grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerdeki ürün laurik asit içeriklerinin incelenen değişkene göre değişim eğrilerinden, her bir parametre (değişken) için etkin çalışma

aralığı yani yüksek laurik asit katılımının sağlandığı aralıklar belirlenmiş ve bu aralıkta her bir parametre için 3 seviye değeri saptanmıştır.

3.2.5. Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Reaksiyona etki eden parametrelerin ve deneysel olarak elde edilen tepki değerlerinin (ürünün laurik asit içeriğinin) birlikte değerlendirilmesi ve neticesinde reaksiyon koşullarının optimizasyonu Tepki Yüzey metodolojisine göre yapılmıştır. Bu amaçla, 3 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak 17 asidoliz deneyi yürütülmüştür. Deneylerin tasarımında, Bölüm 3.2.4 de açıklanan çalışma yöntemine göre belirlenen 3 değişkene ait 9 seviye değerleri kullanılmıştır. Asidoliz deneyleri yine Bölüm 3.2.2. de verilen yönteme göre gerçekleştirilmiş, asidoliz ürünlerinin analizi ise Bölüm 3.2.3. de açıklanan deneysel prosedüre göre yapılmıştır. Deneysel sonuçların istatistiksel analizleri Statistica 6.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçların varyans analizleri ve tepki değerlerinin incelenen değişkenlere göre değişimlerini gösteren izdüşüm (Contour plot) ve tepki yüzey (Response surface) grafikleri değerlendirilerek reaksiyon koşulları optimize edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızın giriş bölümünde etraflıca açıklandığı üzere, bu çalışmada trioleinden düşük kalorili yağların ve yağ ikame maddelerinin üretiminde kullanılabilecek, hızlı metabolize edilebilen orta zincirli laurik asitce zenginleştirilmiş triaçilgliserollerin enzimatik üretimi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır.

Çalışmamızın birinci bölümünde, triolein ve laurik asitin yağ asitleri bileşimleri saptandıktan sonra, trioleinin laurik asit ile asidoliz reaksiyonlarında, sabit sıcaklıkta (50 °C da) , reaksiyon parametrelerinin (enzim miktarının, triolein:laurik asit mol oranının ve reaksiyon süresinin) reaksiyon ürünü bileşimine olan etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, 3 seri asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu 3 seri asidoliz reaksiyonları sonucunda, her parametrenin yüksek laurik asit katılımı verebilen etkin çalışma aralığı tespit edilmiş ve bu aralıkta 3 seviye değeri (minimum, optimum ve maksimum değerleri) saptanmıştır.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, Tepki Yüzey Metodolojisine göre, reaksiyon koşullarının optimizasyonu üzerinde deneyler yürütülmüştür. Birinci bölümde parametreler için belirlenmiş 9 seviye değeri kullanılarak, 3 değişken ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun 17 asidoliz deneyinin çalışma koşulları belirlenmiş ve deneyler bu esas üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneysel veriler Statistica 6.0 programı kullanılarak değerlendirilmiş, triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonu böylece optimize edilmiştir. Aşağıdaki bölümlerde bu çalışmalara ait sonuçlar sırasıyla verilmiştir.

4.1. Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri

Bu çalışmada önce kullanılan substratların, triolein ve laurik asitin bileşimleri Bölüm 3.2.1. de sunulan koşullarda gaz kromatografik yöntemle belirlenmiştir. Tablo 4.1 de laurik asitin ve trioleinin yağ asitleri bileşimi birlikte verilmiştir.

Tablo 4.1: Laurik Asitin ve Trioleinin Yağ Asitleri Bileşimi

Yağ asiti	Yağ Asiti Bileşimi (%)	
	Triolein	Laurik Asit
12:0	0,16	99,45
14:1	0,73	-
14:0	2,61	0,07
16:1	5,24	-
16:0	4,74	0,11
18:2	6,27	0,07
18:1	77,38	0,16
18:0	1,44	-
20:1	1,31	-

Tablo 4.1 den görüldüğü üzere, trioleinin oleik asit içeriği % 77,38 dir. Oleik asit yanında linoleik (% 6.27), palmitik (% 4,74), palmitoleik (% 5,24) ve az miktarlarda C12, C14 ve C20 asitlerini de içermektedir. Laurik asit ise % 99,5 saflıktadır.

4.2. Triolein ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Enzim Miktarının Etkisi

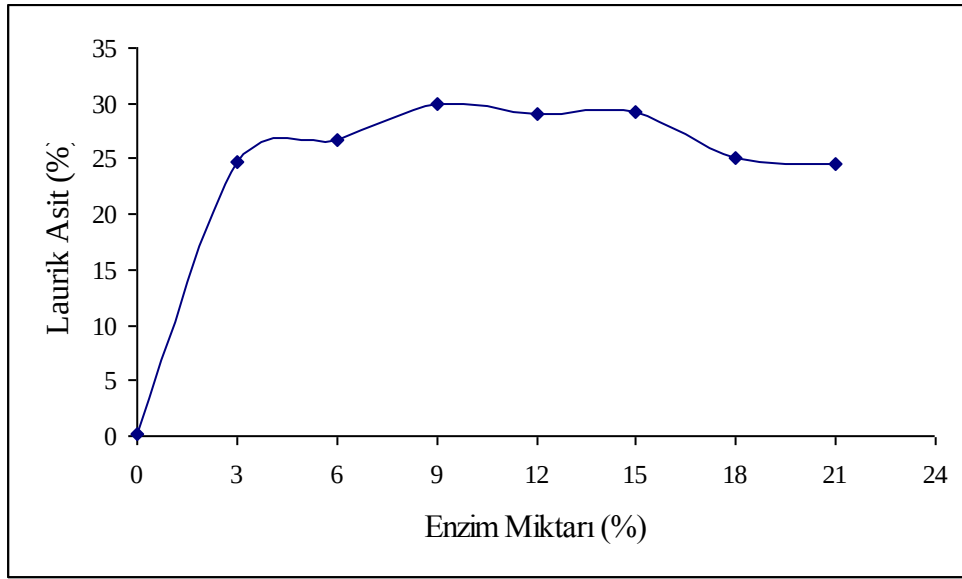
Çalışmamızın bu ilk bölümünde, trioleinin laurik asit ile asidoliz reaksiyonunda enzim miktarının ürün TAG larına katılan laurik asit miktarına olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, bir seri triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonları yürütülmüştür. Bu reaksiyonlarda, triolein:laurik asit mol oranı 1:3 olarak alınmış, enzim olarak 1,3-spesifik Lipozyme IM ticari adlı *Mucor miehei* lipazı kullanılmış ve enzim miktarı substratların toplam ağırlığının %3'ü ile %21 'i arasında olacak şekilde 7 farklı değerde ortama ilave edilmiştir. Reaksiyonlar 50 °C da hekzan ortamında Bölüm 3.2.2 de açıklanan prosedüre göre 6 saat yürütülmüştür. Reaksiyon sonunda karışımdan alınmış örneklerden asidoliz ürünü olan TAG lar reaksiyon ortamından ayrılmış ve bu TAG ların yağ asitlerinin bileşimleri gaz kromatografi

kullanılarak belirlenmiştir. TAG yağ asiti bileşimlerinin enzim miktarı ile değişimi Tablo 4.2 de topluca verilmiştir. Bu verilerden faydalanılarak çizilen TAG lara katılan laurik asitin enzim miktarı ile değişim eğrisi Şekil 4.1 de görülmektedir.

Tablo 4.2: Trioleinin Laurik Asit ile Asidolizinde, Ürün Yağ Asitleri Bileşiminin Enzim Miktarı ile Değişimi (50°C; Triolein:Laurik Asit mol oranı, 1:3; 6 saat)

Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (%)							
	TAG Orijinal	TAG %3	TAG %6	TAG %9	TAG %12	TAG %15	TAG %18	TAG %21
12:0	0,16	24,75	26,64	29,93	29,01	29,20	25,04	24,52
14:1	0,73	0,34	0,41	0,42	0,33	0,33	0,25	0,33
14:0	2,61	2,19	1,86	1,98	1,99	2,00	1,89	2,30
16:1	5,24	4,72	4,11	4,08	4,00	4,28	4,63	4,28
16:0	4,74	3,32	4,03	3,36	4,07	4,54	3,82	4,62
18:2	6,27	5,46	6,07	5,74	5,48	5,88	6,31	6,10
18:1	77,38	58,09	56,11	53,16	53,59	52,65	56,77	56,21
18:0	1,44	0,59	0,61	0,57	0,73	0,80	0,91	0,84
20:1	1,31	0,54	0,16	0,76	0,80	0,33	0,38	0,80

Şekil 4.1’ den görüldüğü üzere, enzim miktarı %3 değerinden %9 değerine yükseltilmesiyle başlangıç TAG moleküllerinde % 0,16 miktarında bulunan laurik asit (12:0) % 29,93 değerine ulaşmıştır. Enzim miktarının %9 ila % 15 arasında değişimi pratik olarak laurik asit katılımını etkilememiş olup, enzim miktarının daha fazla arttırılmasıyla laurik asit yüzdelerinde bir miktar düşme de gözlenmiştir. Bu sonuçlardan, reaksiyonda enzimin etkin çalışma aralığının % 3-15 arasında olduğu görülmektedir. Maksimum laurik asit katılımı %9 enzim ile elde edilmiştir. Enzim miktarı için kabul edilebilir en düşük çalışma değerinin %3 ve en yüksek çalışma değerinin %15 olduğu da belirlenmiştir. Enzim miktarının ürün bileşimi üzerinde etkisinin incelendiği bu birinci seri asidoliz reaksiyonları verilerinden, enzim miktarının 3 seviye değeri %3, %9 ve %15 olarak saptanmıştır.



Şekil 4.1: Triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda, trioleine katılan laurik asit yüzdesinin enzim miktarı ile değişimi (triolein:laurik asit mol oranı:1:3; 50 °C; 6 saat)

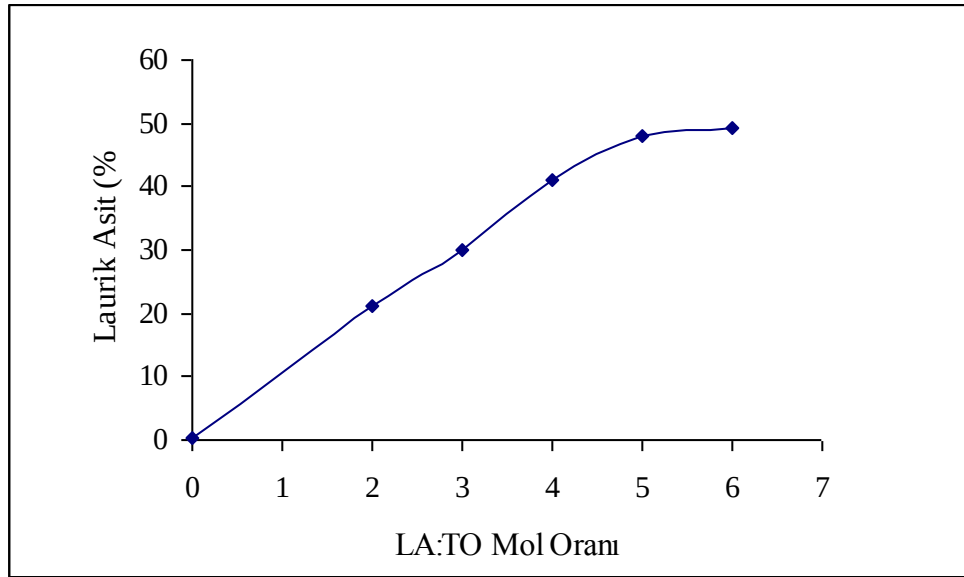
4.3. Triolein ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Triolein/Laurik Asit Mol Oranının Etkisi

Çalışmamızın bu bölümünde, trioleinin laurik asit ile asidoliz reaksiyonunda substratların mol oranının ürün TAG larına katılan laurik asit miktarına olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, ikinci seri triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonları yürütülmüştür. Bu reaksiyonlarda, birinci seri deneyler sonucunda saptanan maksimum laurik asit katılımı veren enzim miktarı (%9) ile çalışılmıştır. Triolein(TO):laurik Asit(LA) mol oranları 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 ve 1:6 olmak üzere 5 ayrı asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar 50 °C da hekzan ortamında Bölüm 3.2.2 de açıklanan prosedüre göre 6 saat yürütülmüştür. Reaksiyon ürünü TAG lar reaksiyon ortamından izole edilmiş ve bu TAG ların yağ asitlerinin bileşimleri gaz kromatografi kullanılarak belirlenmiştir. TAG yağ asiti bileşimlerinin mol oranı ile değişimi Tablo 4.3 de topluca gösterilmiştir Bu tablodaki laurik asit verilerden TAG lara katılmış laurik asit miktarlarının mol oranları ile değişim eğrisi çizilmiş ve Şekil 4.2 de verilmiştir.

Tablo 4.3: Trioleinin Laurik Asit ile Asidolizinde, Ürün Yağ Asitleri Bileşiminin Triolein:Laurik Asit mol oranı ile Değişimi (50°C; Enzim miktarı %9; 6 saat)

Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (%)					
	TAG (Orijinal)	TAG (1:2)	TAG (1:3)	TAG (1:4)	TAG (1:5)	TAG (1:6)
12:0	0,16	21,16	29,93	41,21	47,98	49,18
14:1	0,73	0,33	0,42	0,52	0,40	0,40
14:0	2,61	2,28	1,98	2,35	1,63	1,74
16:1	5,24	4,30	4,08	4,50	3,35	3,23
16:0	4,74	3,53	3,36	4,30	2,38	4,09
18:2	6,27	6,07	5,74	2,39	3,28	4,16
18:1	77,38	61,15	53,16	43,53	40,21	36,31
18:0	1,44	0,62	0,57	0,81	0,38	0,50
20:1	1,31	0,56	0,76	0,39	0,40	0,38

Şekil 4.2' den, TO:LA mol oranının arttırılmasıyla ürün TAG moleküllerindeki laurik asit miktarlarının arttığı, özellikle 1:4 mol oranından sonra laurik katılımının %40 ların üzerine çıktığı görülmektedir. TO:LA mol oranının 1:5 e yükseltilmesiyle laurik asit yüzdesi 48 lere erişmiştir. Mol oranının daha 1:6 ya çıkarılmasıyla TAG moleküllerinin laurik asit içeriği beklenen kadar olmamış, % 49 larda kalmıştır. Bu deneysel verilerden, asidoliz reaksiyonlarında TO:LA mol oranının 1:4 -1:6 değerleri arasında olduğu koşullarda % 40-50 laurik asit içerikli TAG ürünleri elde edilebileceği anlaşılmaktadır. Sonuçlardan, reaksiyonda etkin reaktan mol oranı aralığı 1:4-1:6 olduğu ve 1:4, 1:5 ve 1:6 mol oranlarının 3 seviye değeri olarak seçilebileceğine karar verilmiştir.



Şekil 4.2: Triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda, trioleine katılan laurik asit yüzdesinin substratların mol oranı ile değişimi (%9 enzim; 50 °C; 6 saat)

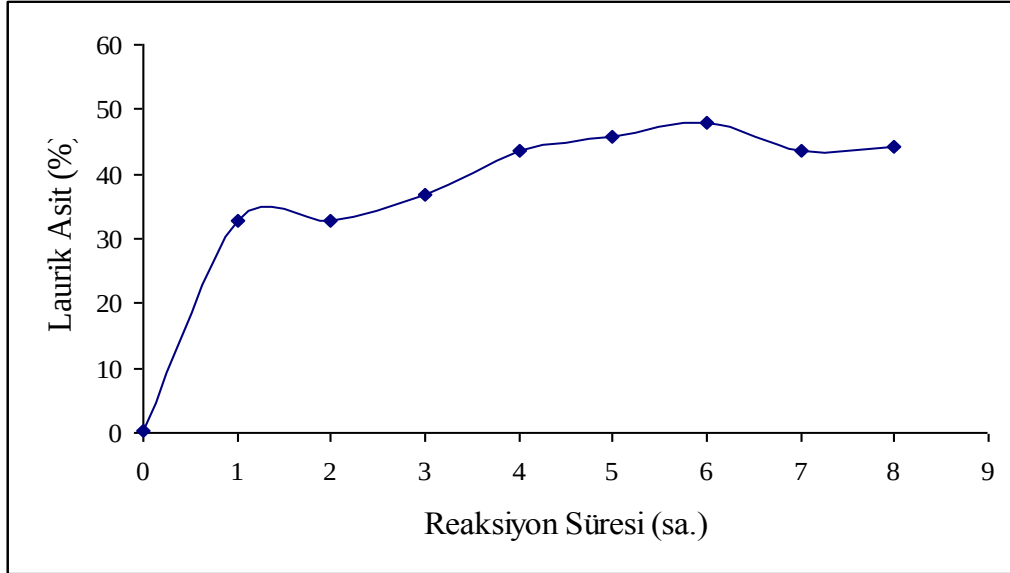
4.4. Triolein ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Reaksiyon Süresinin Etkisi

Çalışmamızın birinci bölümünün son kısmında, reaksiyon süresinin triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonuna olan etkisi incelenmeye alınmıştır. Üçüncü seri asidoliz reaksiyonlarında, daha önce gerçekleştirilmiş 2 seri deneylerde enzim miktarı ve TO:LA mol oranı için saptanmış merkez seviye değerleri kullanılmıştır. Asidoliz reaksiyonları % 9 enzim varlığında, 1:5 TO:LA mol oranında, 50 °C da 1-8 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyondan elde edilen TAG moleküllerinin yağ asit bileşimleri Tablo 4.4 de topluca verilmiştir. TAG ürünlerindeki laurik asit miktarının zamanla değişim eğrisi de Şekil 4.3 de verilmiştir.

Şekil 4.3 den reaksiyonun oldukça hızlı gerçekleştiği görülmektedir. 1 ve 2.saatte laurik asit içeriği % 33 lerde olan TAG lar elde edilmekte, 3. saatlerde TAG bileşiminde laurik yüzdesi 36 lara yükselmekte ve 4. saatten sonra % 40 in üstünde laurik asit içeren TAG ürünleri oluşmaktadır. TAG lardaki laurik asit miktarı 4 saatten sonra tedrici olarak yükselmekte 6 saatte maksimuma ulaşmakta ve daha sonra yavaş bir düşmeye geçmektedir. % 44 ün üstünde laurik asitli asidoliz ürünlerinin elde edilebildiği reaksiyon süresi 4-8 saat arası olduğundan, bu zaman aralığı reaksiyon süresi için etkin aralık alınmış ve 4, 6 ve 8 saatler reaksiyon süresinin 3 seviye değeri olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.4: Trioleinin Laurik Asit ile Asidolizinde, Ürün Yağ Asitleri Bileşiminin Zaman ile Değişimi (50°C; Triolein:Laurik Asit mol oranı, 1:5; Enzim miktarı %9)

Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (%)								
	TAG orijinal	TAG 1 saat	TAG 2 saat	TAG 3 saat	TAG 4 saat	TAG 5 saat	TAG 6 saat	TAG 7 saat	TAG 8 saat
12:0	0,16	32,81	32,79	36,75	43,61	45,89	47,98	43,53	44,25
14:1	0,73	0,45	0,28	0,35	0,51	0,45	0,40	0,47	0,42
14:0	2,61	2,53	1,42	2,19	2,80	1,79	1,63	2,65	3,08
16:1	5,24	3,50	3,42	4,92	5,24	3,59	3,35	4,87	5,96
16:0	4,74	3,42	3,87	3,69	3,39	3,05	2,38	3,00	3,97
18:2	6,27	3,83	4,12	3,18	2,76	2,55	3,28	3,40	3,79
18:1	77,38	52,39	53,00	47,21	40,90	41,39	40,21	41,53	38,08
18:0	1,44	0,39	0,59	1,06	0,31	0,81	0,38	0,30	0,30
20:1	1,31	0,66	0,51	0,65	0,48	0,49	0,40	0,26	0,18



Şekil 4.3: Triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda, trioleine katılan laurik asit yüzdesinin zamanla değişimi (%9 enzim; 50 °C; triolein:laurik asit mol oranı 1:5)

4.5. Tepki Yüzey Metodolojisi'ne Göre Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Çalışmanın ikinci bölümünde, reaksiyon parametrelerinin (bağımsız değişkenlerin) triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonuna etkileri Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM) ile incelenmiştir. Böylece, laurik asitin trioleine katılımının proses koşulları optimize edilmiştir. Bu çalışmada, 3 değişkenli, 3 seviyeli ve 17 özel tasarım noktası içeren yüzey merkezli küp tasarımı esaslarına uygun çalışılmıştır. Optimizasyon için deneylerin tasarımında seçilen değişkenler ve onların belirlenen seviye değerleri Tablo 4.5 verilmiştir.

Tablo 4.5: Yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviyeler.

Bağımsız Değişkenler	Kodlanan değişken seviyeleri		
	-1	0	1
Enzim miktarı (ağırlıkça %)	3	9	15
TO:LA mol oranı (mol/mol)	1:4	1:5	1:6
Reaksiyon zamanı (saat)	4	6	8

Yüzey merkezli küp deney tasarımına göre belirlenen 3 değişkenli ve 3 seviye değerli deney tasarımının noktaları (kodları ve değerleri ile Tablo 4.6 da gösterilmiştir. Merkez noktada 3 tekrar yapılmıştır.

Tablo 4.6: Yüzey merkezli küp deney tasarımı belirlenen deney tasarım noktaları

Deney No	Enzim miktarı (%)		TO:LA, mol/mol		Zaman (saat)	
	Kod	Değer	Kod	Değer	Kod	Değer
1	-1	3	-1	1:4	-1	4
2	-1	3	-1	1: 4	1	8
3	-1	3	1	1: 6	-1	4
4	-1	3	1	1: 6	1	8
5	1	15	-1	1: 4	-1	4
6	1	15	-1	1: 4	1	8
7	1	15	1	1: 6	-1	4
8	1	15	1	1: 6	1	8
9	-1	3	0	1: 5	0	6
10	1	15	0	1: 5	0	6
11	0	9	-1	1: 4	0	6
12	0	9	1	1: 6	0	6
13	0	9	0	1: 5	-1	4
14	0	9	0	1: 5	1	8
15	0	9	0	1: 5	0	6
16	0	9	0	1: 5	0	6
17	0	9	0	1: 5	0	6

Tablo 4.6.' da belirlenen koşullarda 17 asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri saptanmıştır. Bu TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri Tablo 4.7-4.10 da gruplar halinde verilmiştir.

Tablo 4.7: Triolein ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerin yağ asitleri bileşimleri (Enzim miktarı: %3) (Deney No: 1-4 sonuçları)

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	TO:LA, 1:4		TO:LA, 1:6	
	4 saat	8 saat	4 saat	8 saat
12:0	25,14	26,73	25,63	24,00
14:1	0,51	0,3	0,27	0,27
14:0	2,43	1,49	2,59	1,56
16:1	3,11	2,9	2,65	3,48
16:0	3,56	4,15	3,63	3,44
18:2	4,64	3,66	3,63	3,71
18:1	58,25	59,75	59,33	61,52
18:0	1,63	0,72	1,59	1,18
20:1	0,73	0,3	0,66	0,94

Tablo 4.8: Triolein ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerin yağ asitleri bileşimleri (Enzim miktarı: %15) (Deney No: 5-8 sonuçları)

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	TO:LA, 1:4		TO:LA, 1:6	
	4 saat	8 saat	4 saat	8 saat
12:0	32,51	34,08	42,49	42
14:1	0,39	0,24	0,49	0,34
14:0	1,62	1,45	1,91	1,64
16:1	2,87	2,83	2,74	3,06
16:0	3,19	3,17	3,48	3,17
18:2	3,53	3,46	3,27	3,36
18:1	53,96	52,63	43,53	44,63
18:0	1,04	1,51	1,17	1,09
20:1	0,87	0,63	0,92	0,71

Tablo 4.9: Triolein ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerin yağ asitleri bileşimleri (Süre: 6 saat) (Deney No: 9-12 sonuçları)

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	TO:LA, 1:5		TO:LA, 1:4:	TO:LA, 1:6
	%3 Enzim	%15 Enzim	%9 Enzim	%9 Enzim
12:0	32,04	42,37	41,21	49,18
14:1	0,18	0,34	0,52	0,4
14:0	1,45	1,64	2,35	1,74
16:1	3,48	3,06	4,5	3,23
16:0	3,39	3,17	4,3	4,09
18:2	4,01	3,33	2,39	4,16
18:1	53,25	44,29	43,53	36,31
18:0	1,35	1,09	0,81	0,5
20:1	0,85	0,71	0,39	0,38

Tablo 4.10: Triolein ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerin yağ asitleri bileşimleri (TO:LA mol oranı: 1:5; Enzim: %) (Deney No: 13-17 sonuçları)

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)				
	4 saat	8 saat	6 saat	6 saat	6 saat
12:0	43,61	44,25	46,16	47,98	46,84
14:1	0,51	0,42	0,34	0,4	0,45
14:0	2,8	3,08	1,39	1,63	1,79
16:1	5,24	5,96	2,86	3,35	3,59
16:0	3,39	3,97	2,96	2,38	3,05
18:2	2,76	3,79	3,97	3,28	2,55
18:1	40,9	38,08	41,34	40,21	40,63
18:0	0,31	0,3	0,59	0,38	0,6
20:1	0,48	0,18	0,39	0,4	0,5

Triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda amacımız trioleine katılan laurik asit miktarını optimize etmek olduğundan, TYM esaslarına göre yürüttüğümüz deneylerde elde edilmiş TAG bileşimlerinden sadece laurik asit yüzdeleri tepki değeri olarak Tablo 4.11 de gösterilmiştir.

Tablo 4.11: Yüzey merkezli küp tasarımına göre yürütölmüş asidoliz reaksiyonlarından elde edilen tepkiler (ürün TAG larındaki laurik asit yüzdeleri).

Deney No	Enzim miktarı (%)	TO:LA mol oranı (mol/mol)	Süre (Saat)	Tepki (% LA)
1	3	1:4	4	25,14
2	3	1:4	8	26,73
3	3	1:6	4	25,63
4	3	1:6	8	24,00
5	15	1:4	4	32,51
6	15	1:4	8	34,08
7	15	1:6	4	42,49
8	15	1:6	8	42,00
9	3	1:5	6	32,04
10	15	1:5	6	42,37
11	9	1:4	6	41,21
12	9	1:6	6	49,18
13	9	1:5	4	43,61
14	9	1:5	8	44,25
15	9	1:5	6	46,16
16	9	1:5	6	47,98
17	9	1:5	6	46,84

4.6. Farklı Reaksiyon Koşullarının Triolein ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Etkilerinin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi

Tablo 4.11 deki verilen bağımsız değişkenler değerlerine karşılık elde edilen tepki değerlerinin istatistiksel analizlerinde Statistica 6.0 (Stat Soft® Inc.) paket programı kullanılmıştır. Değerlendirmeye “Varyans Analiz” ile başlanmıştır.

3 değişken ,3 seviye yüzey merkezli deney tasarımında elde edilen tepkilerin değerlendirilmesinde aşağıda verilen 2. dereceden polinom eşitliği kullanılmıştır.

$$Tepki = Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{j=i+1}^3 \sum_{i=1}^3 \beta_{ij} x_i x_j$$

Bu denklemde; β_0 , ortalama etki, β_i , β_{ii} , β_{ij} ise sırasıyla değişkenlerin lineer, kuadratik ve etkileşimleri için belirlenen katsayılarıdır. x_i ve x_j de bağımsız değişkenlerdir.

Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerinin tahminleri ve katsayıları alınmıştır. Bu değerler Tablo 4.7’de ve varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.8’de görülmektedir.

Tablo 4.12: Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları.

	Etki	Standart Hata	t	p	Katsayı
Ortalama/Intercept	47,167	0,521597	90,4282	0 ^a	47,167
(1)Enzim miktarı(L)	11,982	0,770943	15,542	0,000001 ^a	5,991
Enzim miktarı(Q)	-20,1846	1,489416	-13,5521	0,000003 ^a	-10,0923
(2)TO:LA mol oranı(L)	4,726	0,770943	6,1302	0,000477 ^a	2,363
TO:LA mol oranı(Q)	-4,2046	1,489416	-2,823	0,025662 ^b	-2,1023
(3)Süre(L)	0,336	0,770943	0,4358	0,676084	0,168
Süre(Q)	-6,7346	1,489416	-4,5217	0,002727 ^a	-3,3673
Enzim Miktarı*Mol oranı (L)	5,035	0,86194	5,8415	0,000636 ^a	2,5175
Enzim Miktarı*Süre (L)	0,28	0,86194	0,3248	0,754789	0,14
Mol Oranı*Süre (L)	-1,32	0,86194	-1,5314	0,169522	-0,66

^a : p<0.01 düzeyinde anlamlı

^b : p<0,05 düzeyinde anlamlı

L : Lineer Q : Kuadratik

Tabloda verilen “p” değeri, sonuçların istatistik olarak önemli olup olmadığını gösterir.

Oluşturulan ve 2. dereceden bir polinom olan model denklem aşağıda verilmiştir. Bu denklemde bağımsız değişkenler (x_i) için kullanılan semboller, “S”, “m” ve “E” dir. “S” süre, “M” triolein/laurik asit mol oranını ve “E” ise enzim miktarını ifade etmektedir.

$$\% \text{ Laurik Asit} = 47,167 + 5,99 \cdot E - 10,1 \cdot E^2 + 2,36 \cdot M - 2,10 \cdot M^2 + 0,17 \cdot S - 3,37 \cdot S^2 + 2,52 \cdot E \cdot M + 0,14 \cdot E \cdot S - 0,66 \cdot M \cdot S$$

Tablo 4.13: Varyans analizi sonuçları

Faktör	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	f Değeri	p Değeri
Enzim miktarı(L)	358,921	1	358,9208	241,554	0,000001 ^a
Enzim miktarı(Q)	272,895	1	272,8945	183,6582	0,000003 ^a
TO:LA mol oranı(L)	55,838	1	55,8377	37,5788	0,000477 ^a
TO:LA mol oranı(Q)	11,842	1	11,8416	7,9694	0,025662 ^b
Süre(L)	0,282	1	0,2822	0,1899	0,676084
Süre(Q)	30,38	1	30,3796	20,4455	0,002727 ^a
Enzim Miktarı*Mol oranı (L)	50,702	1	50,7025	34,1228	0,000636 ^a
Enzim Miktarı*Süre (L)	0,157	1	0,1568	0,1055	0,754789
Mol Oranı*Süre (L)	3,485	1	3,4848	2,3453	0,169522
Hata	10,401	7	1,4859		
Kareler Toplamı	1227,854	16			

^a : p<0,01 düzeyinde anlamlı

^b : p<0,05 düzeyinde anlamlı

L : Lineer, Q : Kuadratik

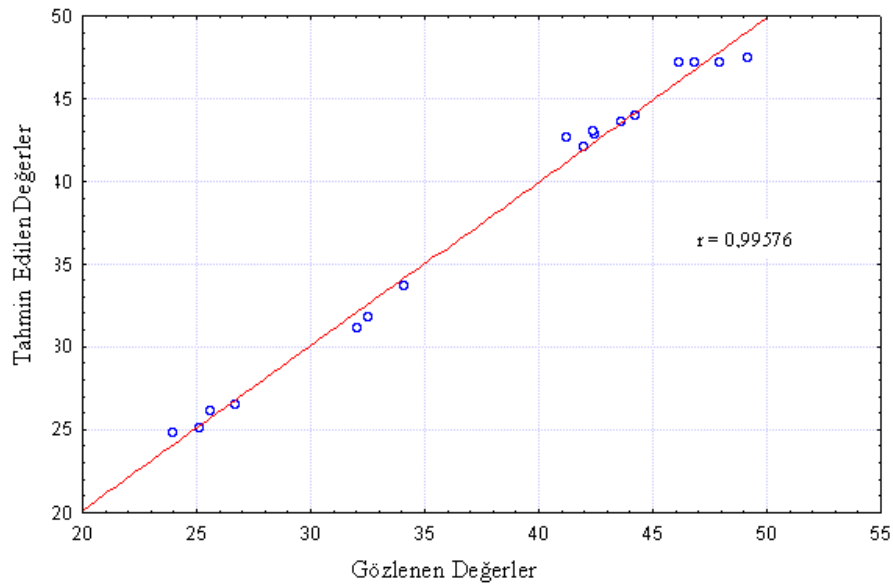
Varyans analizinin sonuçları incelendiğinde, enzim miktarının lineer ve kuadratik etkisi p<0.01 düzeyinde, mol oranının lineer, reaksiyon süresinin kuadratik ve enzim miktarının mol oranıyla birlikte lineer etkisi p<0,01 düzeyinde, mol oranının kuadratik etkisi ise p<0,05 değerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Buna karşılık sürenin, enzim miktarı ile sürenin ve mol oranıyla sürenin lineer etkilerinin istatistiksel açıdan önemli olmadığı görülmüştür.

Oluşturulan Tepki-Yüzey modelinde, süre, enzim miktarı ve triolein/laurik asit mol oranı olmak üzere 3 farklı bağımsız değişken için gözlenen minimum ve maksimum değerler ile kritik değerler Tablo 4.14’te görülmektedir.

Daha önce elde edilmiş olan model denklemden yararlanarak, gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki ise Şekil 4,4'te verilmiştir.

Tablo 4.14: Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri

	Gözlenen minimum değer	Kritik değer	Gözlenen maksimum değer
Enzim miktarı	3	11,38285	15
LA:TO mol oranı	4	5,80698	6
Süre	4	5,90823	8



Şekil 4.4: Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki

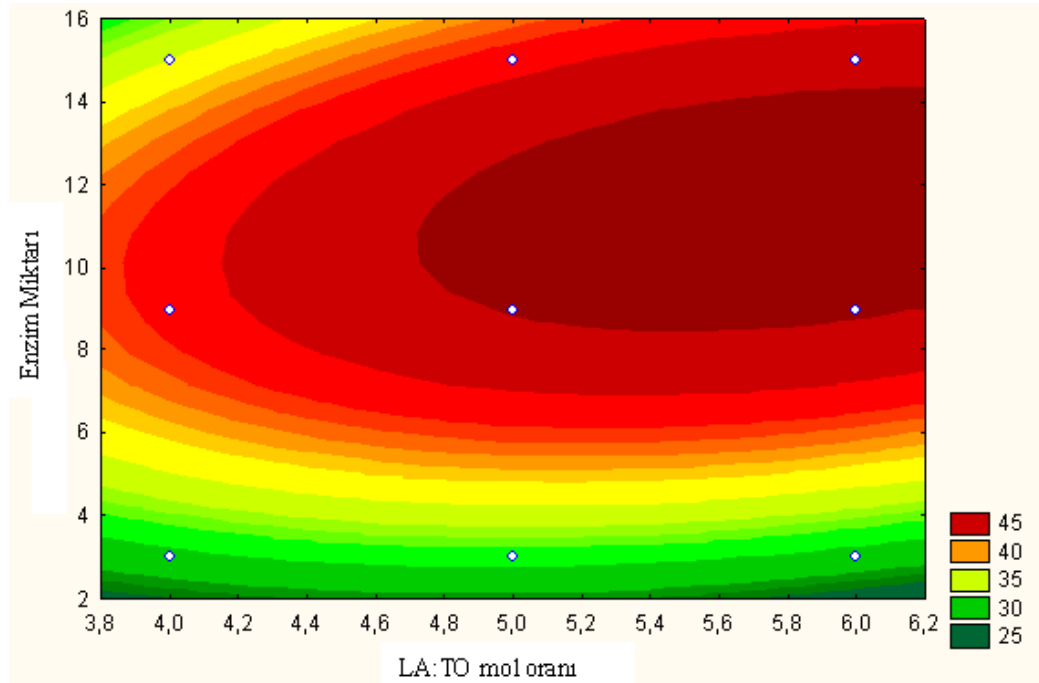
4.7. Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması

Trioleinin laurik asit ile enzimatik asidoliz reaksiyonu sonucu elde edilen ürünün laurik asit içeriğinin LA/TO mol oranı ve enzim miktarına göre değişimini gösteren izdüşüm (Contour Plot) ve tepki-yüzey grafikleri (Response Surface) grafikleri

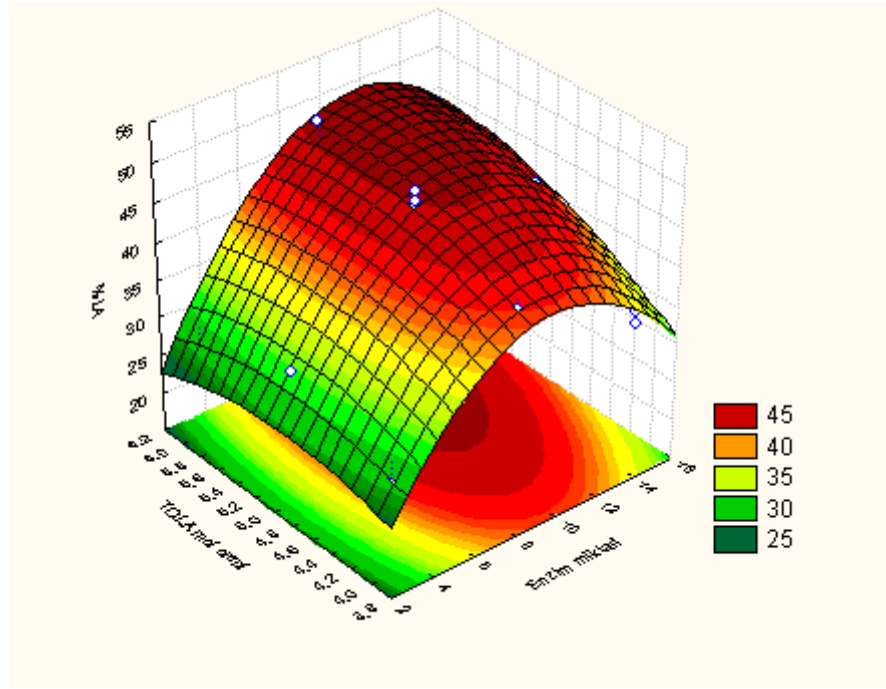
Şekil 4.5.a ve 4.5.b'de görülmektedir. İzdüşüm grafiklerinde denemeler neticesinde elde edilen tepki değerlerine ait eğriler bir düzlem üzerinde gösterilir. Bu düzleme ait koordinatlar ise bağımsız değişkenlerin seviyelerini göstermektedir. Her bir izdüşüm

eğrisi, bağımsız değişkenlere ait seviyelerin bir birleşimi olarak ifade edilen bir düzlemle yüzey arasındaki yüksekliği temsil eden özel bir değere sahiptir. Laurik asit içeriğinin TO/LA mol oranı ve enzim miktarına göre değişimini açıklayan grafiklerden literatürde maksimum tepki (maximum response) olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir [26]. Şekil 4.5.a incelendiğinde enzim miktarı ve mol oranı orta noktadan uzaklaştıkça laurik asit içeriğinin azaldığı görülmektedir. Bu grafikten anlaşılabacağı üzere laurik asit yüzdesinin en yüksek olacağı enzim miktarı aralığı 8.4-14.1 ve TO/LA mol oranı aralığı da 4,7- 6,2'dir.

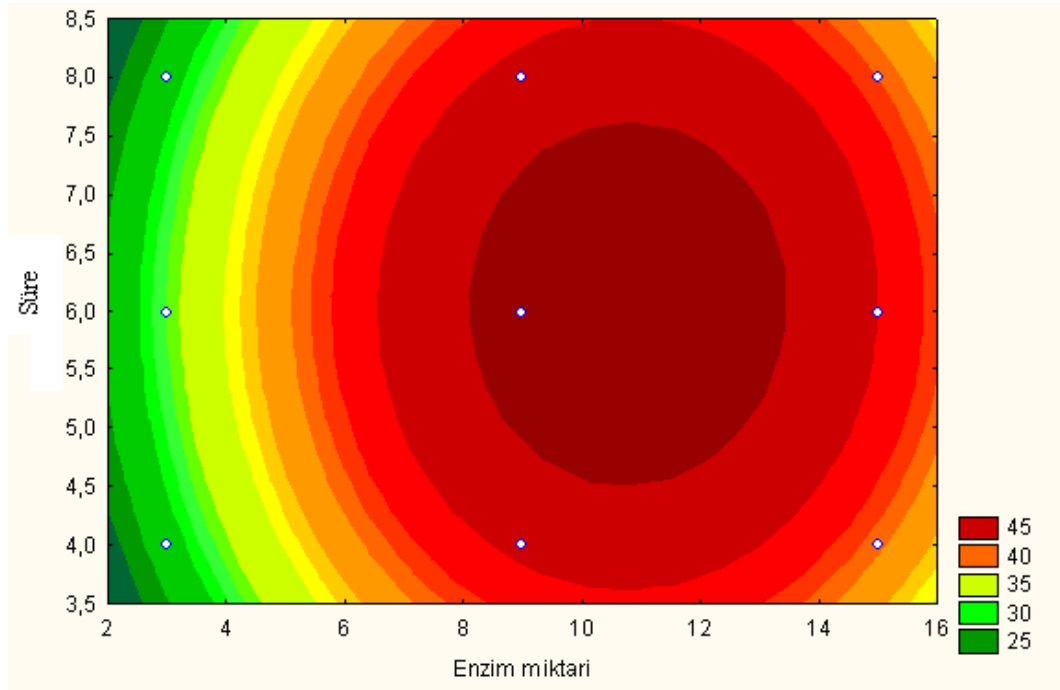
Metil ester içeriğinin reaksiyon süresi ve enzim miktarına göre değişimini gösteren tepki yüzey ve izdüşüm grafikleri Şekil 4.6.a ve 4.6.b'de görülmektedir. Laurik asit içeriğine enzim miktarı ve reaksiyon süresinin etkileşimleri sonucunda yine literatürde maksimum tepki (maximum response) olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir [26]. Çalışmada gözlenen değer aralığında, enzim miktarının 8,2-13,3 ve reaksiyon süresinin de 4,6-7,6 aralığında olması durumunda laurik asit içeriği yüksek değerlere ulaşmıştır. Grafikten de anlaşılabacağı üzere düşük enzim miktarlarında reaksiyon süresinin artırılması laurik asit yüzdesinde artışa sebep olamamaktadır.



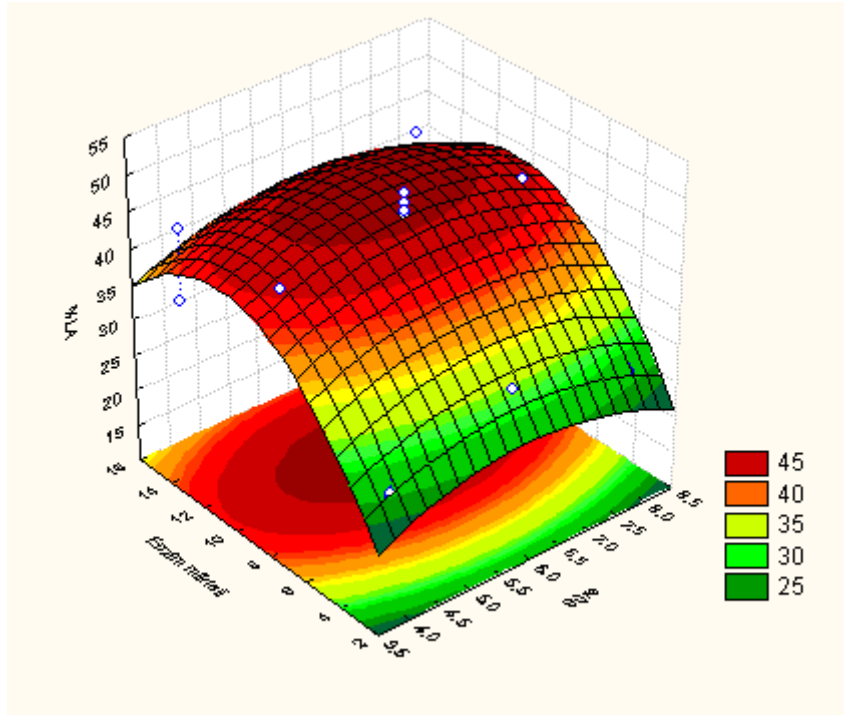
Şekil 4.5.a: Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), mol oranı ve enzim miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.



Şekil 4.5.b: Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), mol oranı ve enzim miktarı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.

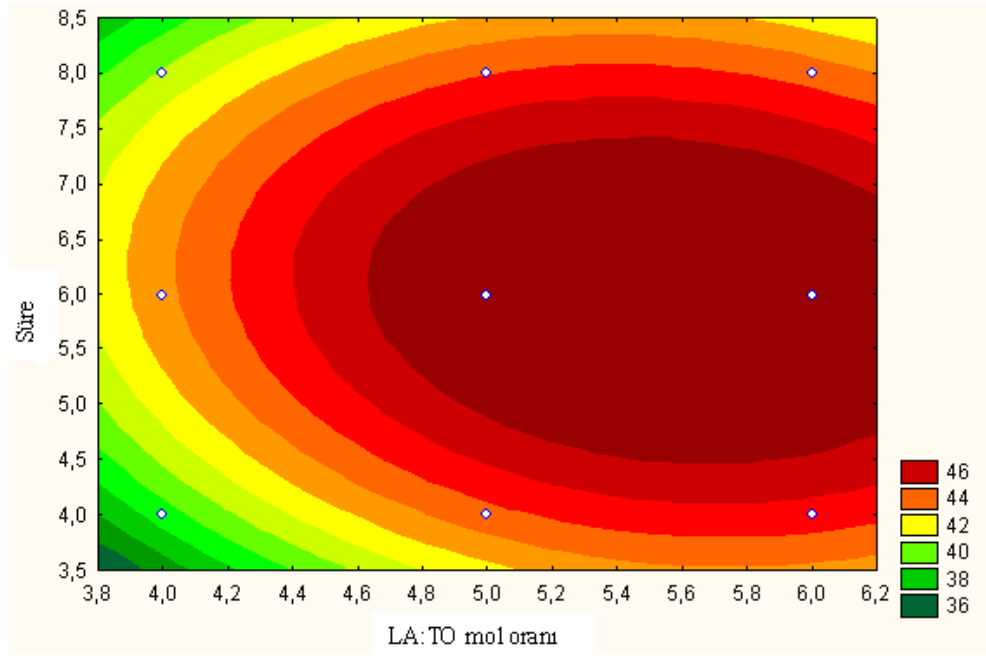


Şekil 4.6.a: Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), enzim miktarı ve süre ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.

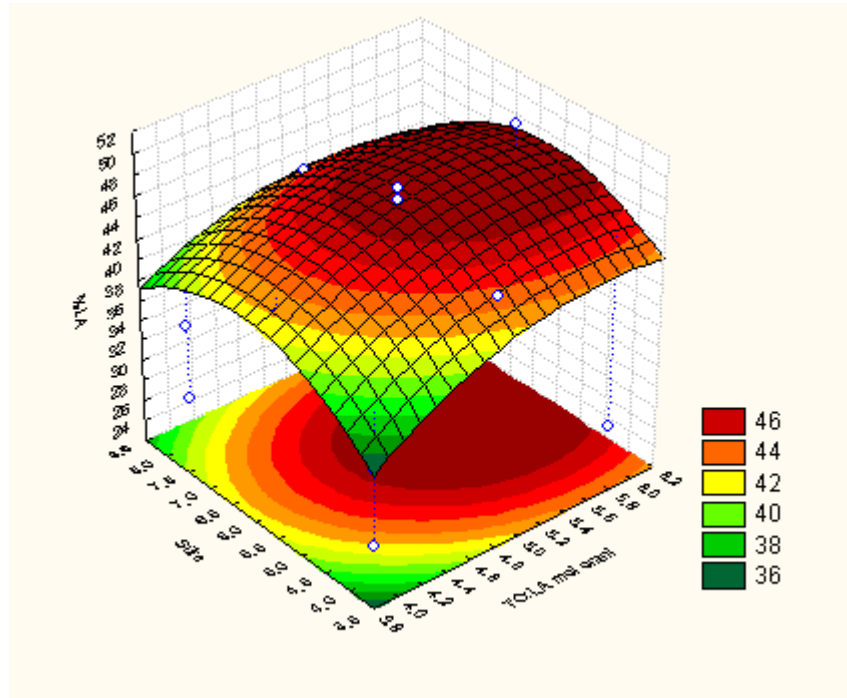


Şekil 4.6.b: Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), enzim miktarı ve süre ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.

Laurik asit içeriğinin reaksiyon süresi ve mol oranına göre değişimini gösteren tepki yüzey ve izdüşüm grafikleri Şekil 4.7.a ve 4.7.b’de görülmektedir. Laurik asit içeriğine mol oranı ve reaksiyon süresinin etkileşimleri sonucunda yine literatürde maksimum tepki (maximum response) olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir [26]. Çalışmada gözlenen değer aralığında, mol oranının 4,65-6,2 ve reaksiyon süresinin de 4,5-7,4 aralığında olması durumunda laurik asit içeriği yüksek değerlere ulaşmıştır.



Şekil 4.7.a: Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.



Şekil 4.7.b: Ürünün laurik asit içeriğinin (%LA), mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği.

5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, trioleinden düşük kalorili yağların ve yağ ikame maddelerinin üretiminde kullanılabilecek, hızlı metabolize edilebilen orta zincirli laurik asitce zenginleştirilmiş triaçilgliserollerin enzimatik üretimi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla, triolein ile laurik asitin 1,3-spesifik *Mucor miehei* orijinli Lipozyme IM ticari lipazı varlığında asidoliz reaksiyonu sistematik olarak incelenmiştir.

Deneyssel çalışmamızın birinci bölümünde, trioleinin laurik asit ile asidoliz reaksiyonunda, sabit sıcaklıkta (50°Cda), enzim miktarının, triolein:laurik asit mol oranının ve reaksiyon süresinin teker teker asidoliz ürünü olan triaçilgliserollerinin bileşimi, özellikle moleküllerin laurik asit içerikleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, 3 seri asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlar sonucunda, reaksiyon parametrelerinin yüksek laurik asitli ürünler verebilecek etkin çalışma aralıkları belirlenmiştir:

1.seri asidoliz reaksiyonlarında, triolein:laurik asit mol oranı 1:3 olarak alınmış, reaksiyon süresi 6 saat seçilmiş ve 7 farklı enzim miktarında reaksiyonlar yürütülmüştür. Bu reaksiyonlarda, enzim substratların toplam ağırlığının %3'ü, %6'sı, %9'u, %12'si, %15'i, %18'i ve %21'i olacak şekilde reaksiyon ortamına ilave edilmiştir. Enzim miktarına göre trioleine katılan laurik asit miktarının değişim eğrisinden, optimum enzim miktarının %9 olduğu, kabul edilebilir en düşük enzim miktarının %3 ve en yüksek enzim miktarının ise % 15 olarak seçilebileceği tespit edilmiştir.

2.seri asidoliz reaksiyonlarında, %9 enzim miktarında ve 6 saatlik reaksiyon süresinde bu kez triolein:laurik asit mol oranının değişimi ile asidoliz ürünü TAG lardaki laurik asit yüzdesinin değişimi incelenmeye alınmıştır. Yürütülen 5 asidoliz reaksiyonunda mol oranları 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 ve 1:6 olarak şekilde triolein ve laurik asitleri karışımları kullanılmıştır. Ürün TAG lerindeki laurik asit yüzdesinin substratların mol oranı ile değişim eğrisinden, % 40-50 laurik asit içerikli ürünlerin

triolein:laurik asit mol oranının 1:4-1:6 olduğu aralıkta elde edilebileceği gözlenmiştir. Sonuç olarak, optimum mol oranının 1:5, kabul edilebilir minimum mol oranının 1:4 ve maksimum mol oranının ise 1:6 olarak saptanabileceğine karar verilmiştir.

3. seri asidoliz reaksiyonlarında ise, %9 enzim miktarı ve triolein:laurik asit 1:5 mol oranında 8 farklı reaksiyon süresinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süresi 1-8 saat arasında değiştirilmiştir. Deneysel sonuçlar, 4 saatte ürün bileşimindeki laurik asit miktarının %44 lere ulaştığını, 6 saatte maksimum %48 değerine vardığını ve reaksiyon süresinin daha fazla arttırılmasıyla azalmaya başladığını göstermiştir. Bu verilerden, %44' ün üstünde laurik asitli ürünler eldesi için uygun çalışma aralığının 4-8 saat arasında olduğu; minimum, optimum ve maksimum sürenin sırasıyla 4, 6 ve 8 saat olarak seçilebileceği belirlenmiştir.

Bu değerler kullanılarak Tepki Yüzey Metodolojisine göre, reaksiyon koşullarının optimizasyonu üzerinde deneyler yürütölmüştür. 3 değişken ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun 17 asidoliz deneyinin çalışma koşulları belirlenmiş ve deneyler bu esas üzerinden gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneyel veriler Statistica 6.0 programı kullanılarak değerlendirilmiş, triolein ile laurik asitin asidoliz reaksiyonu böylece optimize edilmiştir.

Sonuç olarak, optimizasyon sonuçları gösterdi ki 6 saat gibi kısa bir zamanda reaksiyon için optimum koşullar %11.4 enzim miktarı ve 1/5.8 TO:LA mol oranında elde edilmiştir. Bu koşullarda % 49,3 oranında laurik asit içeren triaçilgliseroller elde edilebilecektir. Bu bileşikler düşük kalorili yağ ve yağ ikame meddeleri olarak kullanılabilirler.

KAYNAKLAR

- [1] **Fat Substitutes**, <http://216.185.112.2/presenter.jhtml?identifier=4633>
(14.Şub.2005)
- [2] **Tsang, G.**, Alook at Fat Substitutes, <http://www.healthcastle.com/fat.shtml>,
(14.Şub.2005)
- [3] **Dietary fat**, <http://www.annecollins.com/dietary-fat/fat-substitutes-olestra.htm>.
(14.Şub.2005)
- [4] **Segal, M.**,1990. Fat Substitutes: A Taste of the Future;
<http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/fats.html>. (14.Şub.2005)
- [5] **Esen, A.**, 2003. Fındık yağı-metanol enzimatik alkoliz reaksiyonunun incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [6] **Kurşun, E.**, 2002. Ayçiçek asidik yağının enzimatik esterleşmesi ile yağ asidi esterlerinin üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [7] **Khan, A.K.**, 2002. Research into biodiesel kinetics catalyst and development, The University of Quennsland, Australia.
- [8] **Kıldırın, G.**, 1993. Soya yağının yerinde alkolizi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [9] **Akdere, C.**, 2003. Fındık yağı-füzel yağı fraksiyonu enzimatik alkoliz reaksiyonunun incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [10] **Ban, K., Hama, S., Hama, S., Nishizuka, K., Kaieda, M., Matsumoto, T., Kondo, A., Noda, H., Fukuda, H.**, 2002. Repeated use of whole-cell biocatalysts immobilized within biomass support particles for biodiesel fuel production , *J. of Mol . Catal. B: Enz.*, **17**, 157-165.
- [11] **Dunford, N. T.**, 2002. Utilisation of Biotechnology for the Development of Functional and Bioactive Lipid-Based Products, Business Briefing: Innovative Food Ingredients.
- [12] **Xu, X.**, 2000. Production of Spesific-Structured triacylglycerols by Lipase-Catalysed Reactions: a Review, *Eur.J.Lipid Sci. Technol.*, **102**, 287-303.
- [13] **Osborn, H. T. and Akoh, C. C.**, 2002. Structured Lipids-Novel Fats with Medical, Nutraceutical and Food Applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **3**, 93-102.
- [14] **Selappan, S., Akoh, C. C.**,2000. Enzymatic Acidolysis of Tristearin with Lauric and Oleic Acids to Produce Coating Lipids, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **77**, 1127-1133.

- [15] **Nieto, S., Sanhueza, J. and Valenzuela, A.,** 1999. Synthesis of Structured Triacylglycerols Containing Medium-Chain and Long-Chain Fatty Acids by Interesterification with a Stereospecific Lipase from *Mucor Miehei*, *Grasas Y Acetias*, **50**, 199-202.
- [16] **Miura, S., Ogava, A. and Konishi, H.,** 1999. A Rapid Method for Enzymatic Synthesis and Purification of the Structured Triacylglycerol, 1,3-dilauroyl-2-oleoyl-glycerol, *Journal of the American Oil Chemists Society*, **76**, 927-931.
- [17] **Wongsakul, S., H-Kittikun, A. and Bornscheuer, U. T.,** 2004. Lipase-Catalysed Synthesis of Structured Triacylglycerides from 1,3-Diacylglycerides, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **81**, 151-155.
- [18] **Rao, R., Sankar, K. U., Sambaiah, K. And Lokesh, B. R.,** 2000. Differential Scanning Calorimetric Studies on Structured Lipids from Coconut Oil Triglycerides Containing Stearic Acid, *Eur Food Res Technol*, **212**, 334-343.
- [19] **Zhou, D., Xu, X., Mu, H., Carl-Erik, H. and Adler-Niessen, J.,** 2001. Synthesis of Structured Triacylglycerols Containing Caproic Acid by Lipase-Catalyzed Acidolysis: Optimization by Response Surface Methodology, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **49**, 5771-5777.
- [20] **Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou M. M., McNeill, G. P. and Schmid, R.D.,** 1998. Optimisation of the Reaction Conditions in the Lipase-Catalyzed Synthesis of Structured Triglycerides, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **75**, 1527-1531.
- [21] **Fomuso, L. B. and Akoh C. C.,** 1997. Enzymatic Modification of Triolein: Incorporation of Caproic and Butyric Acids to Produce Reduced-Calorie Structured Lipids, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **74**, 269-272.
- [22] **Akoh, C. C. and Yee, L. N.,** 1997. Enzymatic Synthesis of Position-Specific Low-Calorie Structured Lipids, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **74**, 1409-1413.
- [23] **Shieh, C. J., Akoh, C. C. and Koehler, P. E.,** 1995. Four Factor Response Surface Optimization of the Enzymatic Modification of Triolein to Structured Lipids Using Capric Acid, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **72**, 619-623.
- [24] **Senanayake, S. P. J. and Shahidi, F.,** 2002. Lipase-Catalyzed Incorporation of Docosahexaenoic Acid (DHA) into Borage Oil: Optimization Using Response Surface Methodology, *Food Chemistry*, **77**, 115-123.
- [25] **Cornell, J. A.,** 1990. How to Apply Response Surface Methodology, Quality Press, Wisconsin, USA
- [26] **Montgomery, D. C and Myers, R. H.,** 2002. Response Surface Methodology Process and Product Optimization Using Designed Experiments, A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons Inc., New York

- [27] **Demirkol, S.**, 2004. Soya Yağının Enzimatik Alkolizi ile Yağ Asidi Metil Esterleri Üretiminin Optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [28] **Cocks, L. V., Van, R. C.**, 1966. Laboratory Handbook of Oil and Fat Analysis, Academic Press, London and New York.
- [29] **Hill, W. J. and Hunter, W. G.**, 1966. A review of Response Surface Methodology: A Literature Survey, *Technometrics*, **8**, 571-575.
- [30] **Huang, K. And Akoh, C. C.**, 1996. Optimization and Scale-Up of Enzymatic Synthesis of Structured Lipids using RSM, *Journal of Food Science*, **61**, 137-141.
- [31] **Xu, X., Fomuso, L. B. and Akoh, C. C.**, 2000. Modification of menhaden Oil by Enzymatic Acidolysis to Produce Structured Lipids: Optimization by Response Surface Design in a Packed Bed Reactor, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **77**, 171-176.
- [32] **Rao, R., Manohar, B., Sambaiah, K. and Lokesh, B. R.**, 2002. Enzymatic Acidolysis in Hexane to Produce n-3 or n-6 FA-Enriched Structured Lipids from Coconut Oil: Optimization of Reactions by Response Surface Methodology, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **79**, 885-890.
- [33] **Yang, T., Fruekilde, M. B. and Xu, X.**, 2003. Applications of Immobilized *Thermomyces lanuginosa* Lipase in Interesterification, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **80**, 881-887.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Adana’da doğdu. Orta öğrenimini 1992 yılında Özel Tarsus Amerikan Lisesinde tamamladı. 1995 yılında Atatürk Fen Lisesin’den mezun oldu. 2002 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nden mezun olduktan sonra aynı yıl girdiği İ.T.Ü Fen Bilimleri Enstitüsüne bağlı Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimya Mühendisliği Yüksek Lisans Programı’nda halen öğrencidir.