

ÖNSÖZ

Laboratuvar çalışmalarım süresince bana bilgi ve tecrübeleriyle yardımcı olan değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN'E ve Sayın Prof. Dr. H. Ayşe AKSOY'A teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarımdaki yardımlarıyla yetinmeyip benden her konuda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Ar. Gör. Dr. Sevil YÜCEL'E sonsuz teşekkür ederim.

Bununla birlikte, çalışmalarımı paylaştığım laboratuvar arkadaşım Kimyager Füsün DEMİRCİ' ye, deneylerimde bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Kimya Müh. Özlem ATAÇ' a, laboratuvar çalışmalarımın bana bu tezden başka kazandırdığı dostlarım Kimya Müh. Ömer Faruk GÜL' e ve Kimya Müh. Aytuğ GENÇOĞLU'na ve diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Sevinciyle, hüznüyle tüm yaşamım boyunca olduğu gibi bu çalışmalarım sırasında benden maddi ve manevi desteğini çekmeyen ve her zaman yanımda olan değerli ailem, annem Nadide DAĞLI' ya, babam Abdullah DAĞLI' ya ve ablam Kadriye DAĞLI'ya sonsuz teşekkür ederim.

İyi ki varsınız...

MAYIS 2005

Kimya Müh. Raşit DAĞLI

İÇİNDEKİLER

iii

KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix

1. GİRİŞ	1
1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı	1
2. TEORİK KISIM	3
2.1. Yağ İkameleri	3
2.1.1. Karbonhidrat bazlı yağ ikameleri	3
2.1.2. Protein bazlı yağ ikameleri	3
2.1.3. Lipid bazlı yağ ikameleri	4
2.1.3.1. Kakao yağı ikameleri	4
2.1.3.2. Anne sütü yağı benzerleri	5
2.1.3.3. Sağlık ve besi değeri yüksek bileşikler	5
2.2. Yapılandırılmış Lipidler	6
2.2.1. Yapılandırılmış lipidlerin kimyasal sentezi	6
2.2.2. Yapılandırılmış lipidlerin enzimatik sentezi	7
2.2.2.1. Lipazlar	7
2.2.3. Lipid modifikasyon reaksiyon türleri	7
2.2.3.1. Hidroliz	7
2.2.3.2. Direkt esterifikasyon	7
2.2.3.3. Transesterifikasyon	8
2.2.3.4. Alkoliz	8
2.2.3.5. Asidoliz	9
2.2.3.6. İnteresterifikasyon	10
2.2.4. Sentezi etkileyen parametreler	10
2.2.4.1. Reaksiyon karışımının su içeriği	10
2.2.4.2. Substrat ve ürün etkisi	11
2.2.4.3. Sıcaklık	11
2.2.4.4. Enzim	11
2.2.4.5. Solvent sistemi	12
2.2.4.6. Açıl transferi	12

2.2.5. Yapılandırılmış lipidlerin önemi	12
2.2.6. Yapılandırılmış lipidlerin enzimatik üretiminin önemi	14
2.3. Tripalmitin ve Laurik Asitle Yapılan Çalışmalarla İlgili Literatür Çalışması	14
2.4. Tepki Yüzey Metodolojisi	17
3. DENEYSEL ÇALIŞMA	20
3.1. Kullanılan Hammaddeler	20
3.2. Çalışma Yöntemi	20
3.2.1. Kullanılan hammaddelerin karakterizasyonu	20
3.2.2. Tripalmitin ile laurik asitin asidolizinde uygulanan yöntem	20
3.2.3. Asidoliz ürünlerinin analizi	21
3.2.4. Deneysel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi	22
3.2.5. Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu	23
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	25
4.1. Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri	25
4.2. Tripalmitin ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Enzim Miktarının Etkisi	26
4.3. Tripalmitin ile Laurik Asidin Asidoliz Reaksiyonuna Tripalmitin/ Laurik Asit Mol Oranının Etkisi	28
4.4. Tripalmitin ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Reaksiyon Süresinin Etkisi	30
4.5. Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu	32
4.6. Farklı Reaksiyon Koşullarının Tripalmitin ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Etkilerinin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi	36
4.7. Tepki Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması	39
5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ	49

KISALTMALAR

TAG	: Triaçilgliserol
DAG	: Diaçilgliserol
MAG	: Monoaçilgliserol
DAH	: Dokohekzenoik asit
EPA	: Eikosapentaneoik asit
GLA	: Gamma linoleik asit
MLL	: Medium Long Long
LMM	: Long Medium Medium
MLM	: Medium Long Medium
POS	: Palmitik Oleik Stearik
SOS	: Stearik Oleik Stearik
OPP	: Oleik Palmitik Palmitik
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
TLC	: Thin Layer Chromatography
GC	: Gas Chromatography
LaOLa	: Laurik Oleik Laurik
TYM	: Tepki Yüzey Metodolojisi
YA	: Yağ Asidi
TP	: Tripalmitin
LA	: Laurik Asit

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Merkezil bileşik deney tasarımları.....	18
Tablo 3.1. Gaz kromatografik analiz koşulları.....	21
Tablo 4.1. Laurik asitin ve tripalmitinin yağ asitleri bileşimi.....	26
Tablo 4.2. Tripalmitinin laurik asit ile asidolizinde, ürün yağ asitleri bileşiminin enzim miktarı ile değişimi.....	27
Tablo 4.3. Tripalmitinin laurik asit ile asidolizinde, ürün yağ asitleri bileşiminin tripalmitin:laurik asit mol oranı ile değişimi.....	29
Tablo 4.4. Tripalmitinin laurik asit ile asidolizinde, ürün yağ asitleri bileşiminin reaksiyon süresi ile değişimi.....	31
Tablo 4.5. Yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviyeler.....	32
Tablo 4.6. Yüzey merkezli küp deney tasarımında belirlenen deney tasarım noktaları.....	33
Tablo 4.7. Tripalmitin ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri.....	34
Tablo 4.8. Tripalmitin ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri.....	34
Tablo 4.9. Tripalmitin ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri.....	35
Tablo 4.10. Tripalmitin ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri.....	35
Tablo 4.11. Yüzey merkezli küp tasarımına göre yürütülmüş asidoliz reaksiyonlarından elde edilen tepkiler.....	36
Tablo 4.12. Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları.....	37
Tablo 4.13. Varyans analizi sonuçları.....	38
Tablo 4.14. Tepki yüzey metodolojisine göre asidoliz reaksiyonunda kullanılan değişkenlerin sahip olduğu kritik değerler.....	39

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 4.1 : Tripalmitin ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda, tripalmitine katılan laurik asit yüzdesinin enzim miktarı ile değişimi.....	27
Şekil 4.2 : Tripalmitin ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda, tripalmitine katılan laurik asit yüzdesinin substratların mol oranı ile değişimi.....	29
Şekil 4.3 : Tripalmitin ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda, tripalmitine katılan laurik asit yüzdesinin zamanla değişimi.....	31
Şekil 4.4 : Tepki yüzey metodolojisine göre tahmin edilen ve reaksiyonda gözlenen tepki değerleri.....	39
Şekil 4.5 : Tepki yüzey metodolojisine göre enzim miktarı ve sürenin asidoliz reaksiyonu üzerine etkisi.....	40
Şekil 4.6 : Tepki yüzey metodolojisine göre enzim miktarı ve sürenin asidoliz reaksiyonu üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.7 : Tepki yüzey metodolojisine göre enzim miktarı ve mol oranının asidoliz reaksiyonu üzerine etkisi.....	41
Şekil 4.8 : Tepki yüzey metodolojisine göre enzim miktarı ve mol oranının asidoliz reaksiyonu üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.9 : Tepki yüzey metodolojisine göre süre ve mol oranının asidoliz reaksiyonu üzerine etkisi.....	42
Şekil 4.10 : Tepki yüzey metodolojisine göre süre ve mol oranının asidoliz reaksiyonu üzerine etkisi.....	43

TRİPALMİTİNİN ENZİMATİK ASİDOLİZİYLE 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 ikame maddelerinin kullanımı tek seçenek olmaktadır. Düşük kalorili yağlar ve yağ ikame maddeleri esas olarak lipidlerin yeniden yapılandırılmalarıyla üretilmektedir. Genel olarak bu yapılandırılmış lipidlerin bileşiminde, 1,3 pozisyonlarında orta zincirli yağ asitleri (C8-C12) ve 2 pozisyonunda uzun zincirli yağ asitleri (C16-C22) bulunan triaçilgliseridler bulunmaktadır. Literatürde, C8 ve C10 yağ asitlerince zenginleştirilmiş triaçilgliseridlerin üretimi ile çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, laurik asit (C12) ile modifiye lipidler üzerinde sistematik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, tripalmitinden düşük kalorili yağların üretiminde kullanılabilecek, hızlı metabolize olan laurik asitle zenginleştirilmiş triaçilgliseridlerin enzimatik olarak üretimi amaçlanmıştır. Bu amaçla, tripalmitinin laurik asitle *Mucor miehei* lipazı varlığında asidoliz reaksiyonu sistematik olarak incelenmiştir. Reaksiyon parametrelerinin tripalmitine katılan laurik asit yüzdesi üzerine olan etkileri tepki yüzey metodolojisi uygulanarak araştırılmış ve optimum değerler tespit edilmiştir.

Bu metoda göre göre yapılan 17 deney sonucunda tripalmitine katılan maksimum laurik asit miktarının % 48,73 olduğu bulunmuştur.. Bu istatistiksel analiz yöntemine göre kritik reaksiyon koşulları, enzim miktarı % 10,52, substrat oranı 4,34 ve reaksiyon süresi 6,2 saat olarak bulunmuştur. Varyans analizinden yararlanarak tepki değerinin proses değişkenlerine bağımlılığını veren ve 2. dereceden polinom olan bir model denklem oluşturulmuş ve bu model denkleme göre tahmin edilen değerler ile gözlenen değerler arasında % 99 oranında uyum sağlandığı görülmüştür.

Bu çalışma sonuçlarına göre, *Mucor Miehei* lipazının tripalmitinin laurik asit ile asidolizi ile yaklaşık % 49 laurik asit içeren düşük kalorili ve yağ ikame maddesi

olarak kullanılabilecek anne st benzeri, antivirtik ve antimikrobiyal zelliği bulunan ürün elde edilebileceği saptanmıştır.

**ENZYMATIC PRODUCTION OF LOW REDUCED CALORIE
STRUCTURED LIPIDS BY ACIDOLYSIS OF TRIPALMITIN WITH
LAURIC ACID**

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-positions 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 tripalmitin with lauric acid in the presence of *Mucor miehei* lipase will be studied in detail. The effects of reaction parameters (substrate ratio, amount of enzyme and time) on the percentage of incorporated lauric acid into tripalmitin will be investigated and reaction conditions will be optimized using Response Surface Methodology.

1.GİRİŞ

1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı

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, vücut yapısında meydana gelen görünüş değişikliği dışında hipertansiyon, kardiyovasküler ve koroner kalp rahatsızlıkları, diabet, insülin direnci gibi önemli sağlık problemlerine sebep olmaktadır.

Obezitenin bir problem olduğu bilincinin gelişimiyle, dünyada düşük kalorili yağların ve yağ ikame maddelerinin pazarı hızla büyümektedir. Günümüzde karbonhidrat ve protein bazlı yağ ikame maddeleri salata sosları, tatlılar gibi bazı gıda maddelerinde kullanılmaktadır. Ancak bu ikame maddeleri ısıl işleme dayanıklı değildirler. Bu yüzden, pişirme ve kızartma işlemleri gerektiren gıda maddelerinin üretiminde, ısıl 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, triaçilgliserollerin yapısı üzerinde yağ asitlerinin pozisyonlarının değiştirilmesi ve yeni yağ asitlerinin spesifik olarak yerleştirilmesi ile oluşturulan özgün tiaçilgliserol 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 gibi, yağların bağırsaklarda sindiriminde 1,3-spesifik pankreatik enzimi ile açığa çıkan orta zincir uzunluğundaki bu yağ asitleri kolaylıkla kan yoluyla karaciğere taşınmakta ve β -oksidasyona uğratarak kendilerinden enerji sağlanmaktadır. Karaciğerde hemen kullanıldığı için adipoz hücrelerde depolanmamaktadır. Diğer taraftan bu yağ asitlerinden açığa çıkan enerji uzun yağ asitlerine göre çok az da olmaktadır.

Günümüzde, yapılandırılmış triaçilgliseroller özellikle enzimatik yolla, interesterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarıyla üretilmektedir. Literatürde spesifik lipaz enzimlerinin kullanıldığı yapılandırılmış lipidlerin enzimatik üretimi üzerine çok sayıda çalışma yer almaktadır. Orta zincir uzunluğunda yağ asitleri ile modifiye edilmiş TAG' lar üretiminde daha çok C8 ve C10 asitlerinin kullanıldığı, buna karşılık laurik asit (C12) ile yapılmış çalışmaların az sayıda olduğu gözlenmiştir. Ayrıca laurik asidin kullanıldığı bu çalışmalarda, özellikle tristearinin laurik asitle modifiye edildiği görülmektedir. Buna karşın tripalmitinle laurik asitin modifiye edildiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, tripalmitinin laurik asit ile asidolizinin detaylı olarak incelenmesi amaçlanmış ve tepki yüzey metodolojisi kullanılarak deneyler tasarlanmış ve reaksiyon parametreleri optimize edilmiştir.

2. TEORİK KISIM

2.1. Yağ İkame Maddeleri

Yağ ikame maddeleri, gıda maddelerinde yağların yerine geçerek onların bir yada daha fazla rolünü üstlenebilen maddelerdir [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 karbonhidrat bazlı yağ ikame maddeleri, yağ ikame maddelerine ilk örneklerdir. Karbonhidrat bazlı bu maddelere örnek olarak dekstrinler, maltodekstrinler, modifiye gıda nişastaları, selüloz ve çeşitli zamklar verilebilir [2]. Bu tür yağ ikame maddeleri, etlerde, salata soslarında, dondurulmuş gıdalarda, dipsoslarda, şekerlemelerde yaygın olarak kullanılmaktadır [3]. Yağın akışkanlığını ve nemliliğini karşılayan bu maddeler yağın pişirme özelliklerini karşılayamazlar [2]. Doğal yağa göre daha düşük kaloriye sahip olmalarına rağmen, ısıya karşı dayanıksızlıklarından dolayı doğal yağın yerini tam olarak alamazlar. Bu nedenle kullanım alanları sınırlıdır [3].

2.1.2. Protein Bazlı Yağ İkame Maddeleri

Protein bazlı yağ ikame maddeleri, 1990'ların başlarında pazarda yerlerini almışlardır. 'Genellikle güvenli tanınan' iki farklı protein bazlı yağ ikame maddesi vardır. Bunlar yumurta beyazı ve süt ürünleri proteinlerinden elde edilen peynir altı suyu olup protein 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, yağın yapısında mevcut, ağızda kremamsı bir sıvı hissini yaratmaktır. Bu yağ ikame maddeleri, ağızda karbonhidrat bazlı yağ ikame maddelerine göre daha iyi bir tat bırakmakta ve bazı pişirilmiş gıdalarda da kullanılabilirler. Fakat yine de kızartma için uygun değildir [3].

Simplese, Nutra Sweet tarafından üretilen protein bazlı bir yağ ikame maddesidir. Mayonez, salata sosları, yoğurt, ekşi krema, margarin, tereyağı ve peynir gibi gıdalarda kıvam artırıcı ve yapılandırıcı olarak kullanılmakta fakat pişirmede kullanılamamaktadır. Çünkü fırınlama veya kızartma kremesi yapısının bozulmasına sebep olmaktadır. Ayrıca Simplese dışında Kraft tarafından üretilen, Simplese gibi yağın ‘damak hissi’ni taklit etmek üzere, yumurta beyazı ve süt proteinlerinden üretilen Trailblazer adlı yağ ikame maddesinde bulunmaktadır [4].

2.1.3. Lipid Bazlı Yağ İkame Maddeleri

Genel olarak lipid bazlı yağ ikame maddeleri, yapılandırılmış yağlardır. Bunların çeşitli üretim şekilleri ve kullanım alanları vardır.

Yağ metabolizmasının sağlık ve yağ asiti zinciri uzunluğuna bağlı olarak incelenmesi ve artan bilgiler ışığında trigliserid 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 asiti bileşimini değiştirmek üzere modifiye edilmiş yağlar yapılandırılmış yağ olarak tanımlanabilir. Biyoteknoloji ile, lipidler kolesterolü düşürmek, bağışıklık sistemini güçlendirmek, işlevselliği artırmak ve beyin gelişimini geliştirmek amacıyla yapılandırılabilirler. Yapılandırılmış lipid uygulamalarına örnek olarak şunlar verilebilir:

- Kakao yağı ikameleri
- Anne sütü yağı benzerleri
- Sağlık ve besi değeri yüksek bileşikler
- Düşük kalorili yağlar
- Diğer uygulamalar [5].

2.1.3.1. Kakao yağı İkameleri

Kakao yağının, çikolata ürünlerinin fiziksel özellikleri üzerindeki etkisinden dolayı şekerleme endüstrisinde büyük yeri vardır. Bu etkiler parlaklık, kırılganlık, ısıya dayanıklılık, ağızda çabuk ve belirgin bir erime sağlamasıdır. 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 [6]. Doğada kakao yağına benzer yapıda başka yağ bulunmamaktadır; tüm alternatifler karışım halinde elde edilenler ve modifiye yağlardır [7]. Palmiye yağı, palm ara fraksiyonları, illipe (shorea stenoptera) yağı, shea (Butyro dpermum) bilinen kakao yağı eşdeğeridirler. Ayrıca bazı karışım alternatifleri de mevcuttur.

2.1.3.2. Anne sütü yağı benzerleri

İdeal bir bebek maması formülasyonu kullanılacak yağın yağ asitleri dizilimi ve miktarı anne sütündekilerle aynı olmalıdır. Ticari formülasyonlarda bitkisel yağlar kullanılarak üretimler yapılmaktadır. Anne sütünün trigliserit yapısında çoğunlukla esterleşen palmitik asitin %70'i 2. pozisyonunda yer almakta bitkisel yağlarda ise palmitik asitin %80'inden çoğu trigliseridin 1. ve 3. pozisyonlarında yer almaktadır. Bağırsaklarda pankreatik lipaz sadece bu yapıda 1 ve 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 da vücut için gerekli olan enerji ve kalsiyum kaybedilmiş olur. Bu durum küçük çocuklar için problem yaratabilir, çünkü temel bes kaynakları olan sütün kemik gelişimi için gerekli olan kalsiyumundan da yeterli miktarda faydalanamamış olurlar. Anne sütü trigliseritlerine benzer yapıda yapılandırılmış trigliserit üretimi, 1,3- spesifik lipaz biyokatalizörü kullanılarak palm yağından elde edilen tripalmitin ile bitkisel yağlardan elde edilen oleik asitin transesterifikasyonu ile yapılır. Bu durumda 2. pozisyonda 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 [5].

2.1.3.3. Sağlık ve Besi Değeri Yüksek Bileşikler

Bu bileşiklerin üretimi, bes ve sağlık açısından önemli etkileri saptanmış bazı yağ asitlerinin trigliserit moleküllerine yerleştirilmesi ile yapılır. Bu asitlere örnek olarak balık yağı asitleri, (DHA- dokosahekzenoik asit ve EPA- eikosapentaenoik asit) ve gamma-linoleik asidi (GLA) gösterilebilir. Bu asitlerin triaçilgliserit yapısındaki belirli pozisyonlara katılması için de yine biyoteknolojiden yararlanılır, spesifik lipaz

enzimleri ile yürütülen asidoliz reaksiyonları DHA, EPA, veya GLA' nın trigliserit yapısına katılmasını mümkün kılar [5].

Yağ ikame maddeleri kullanımının temelindeki fikir, gıdaların kalorisini ve yağını azaltırken yağ tarafından sağlanan özellikleri korumaktır. Örneğin olestra, yağ asitleriyle sukrozun kimyasal kombinasyonundan oluştuğundan, özellikleri doğal yağlara benzemektedir. Fakat, doğal ürünlerin tersine, bu sentetik ikame maddeleri kalori vermezler. Çünkü, sindirilemeyen maddelerdir, sindirim sisteminden geçmelerine rağmen, vücutta absorbe edilmezler.

Yağlar, diyetlerde önemli birçok role sahiptirler. Ayrıca, yağlar sağlıklı bir yaşamın devamı, gelişimi ve mükemmel büyüme için gerekli besinlerden bir tanesidirler. Bunlar, yağda çözünen, A, D, E, K vitaminlerini taşır ve bağırsakta absorpsiyonunu sağlarlar. Ayrıca, vücut için gerekli yağ asidi olan linoleik asidin tek kaynağıdır.

Yağlar, gıda hazırlanması ve tüketilmesinde de önemli rol oynarlar. Yağ, gıdalara tat, kıvam, sağlamlık ve lezzet verir. Diğer yanda, diyetteki fazla yağ zararlı olabilir. Yağlar gram başına 9 kalori içerirken, karbonhidrat ve proteinler gram başına 4 kalori içerirler. Dolayısıyla, aşırı yağ alımı, aşırı kalori alınımına ve istenmeyen ağırlığa yol açarlar.

Yağ alımı, değişik kronik hastalıklarla da ilgilidir. Yüksek yağ alımının göğüs, prostat kanseri gibi bazı kanser riskini yükselttiği bilinmektedir. Ayrıca, yüksek doymuş yağ alımıyla kolesterol ve kronik kalp rahatsızlığının riskinin arttığı da belirlenmiştir.

2.2. Yapılandırılmış Lipidler

2.2.1. Yapılandırılmış Lipidlerin Kimyasal Sentezi

Yapılandırılmış lipidlerin kimyasal sentezi için orta ve uzun zincirli triağılglicerol karışımları hidrolizlenir ve hidroliz sonucu açığa çıkan yağ asitleri karışımı tekrar esterleşme reaksiyonlarında kullanılır. Bu proses transesterifikasyon olarak adlandırılır ve yüksek sıcaklık ve anhidroz koşullarda meydana gelir. Kimyasal transesterifikasyon reaksiyonunda değişik triağılglicerol türleri oluşur ve bunların içinde istenmeyen ve uzaklaştırılması zor olan ürünler mevcuttur. Yapılandırılmış lipidler, MLL ve LML yada LMM ve MLM tipindedir ve ayrıca az miktarlarda istenmeyen orta ve uzun zincirli triağılglicerollerde içerirler [8].

2.2.2. Yapılandırılmış Lipidlerin Enzimatik Sentezi

Yapılandırılmış lipidlerin enzimatik sentezi, çevresel ve sağlık nedenlerinden dolayı son yıllarda tercih edilir hale gelmiştir. Yapılandırılmış lipidlerin enzimatik sentezinde katalizör olarak lipazlar kullanılır [8].

2.2.2.1. Lipazlar

Lipazlar, lipidlerin hidrolizini katalizleyen hidrolaz sınıfına giren enzimlerdir. Bitki, hayvan ve mikroorganizmalardan elde edilirler. Bütün lipazlar yapılandırılmış lipid sentezleme kabiliyetine sahip olmasına rağmen, çalışmaların büyük çoğunluğu mikrobiyal lipaz kullanılarak yapılmaktadır. Mikrobiyal lipazların kullanımı hayvansal ve bitkisel lipazlara nazaran daha avantajlıdır. Mikrobiyal lipazlar, büyük ölçekli üretimde kullanılabilir, spesifiklik özelliği bulunabilen, yüksek aktivite ve stabiliteye sahip olan lipazlardır [8].

Lipazın spesifikliği, yapılandırılmış lipid sentezinde önemli bir özelliktir. Bu özellik, gliserol üzerindeki özel pozisyonlardan yağ asitlerinin taşınmasını sağlar. Örnek olarak *Pseudomonas* lipazı kullanılarak balık yağındaki EPA ve DHA oranı % 80 ve % 90 oranında arttırılabilir. Sn-1,3 spesifik lipaz 2. pozisyonundaki yağ asidini sabit tutup, 1. ve 3. pozisyonundaki yağ asitlerinin değişimini sağlar. Yulaf lipazı gibi bazı bitkisel lipazlarda 3. pozisyonundaki yağ asidini 1. ve 2. pozisyonundaki yağ asitlerinden daha hızlı parçalar. *Papaya latex* den elde edilen lipazın sn-3 seçiciliği de gösterdiği bulunmuştur. Lipazın seçiciliği, reaksiyon tipine ve koşullarına ve su aktivitesine bağlıdır [8].

2.2.3. Lipid Modifikasyon Reaksiyon Türleri

2.2.3.1. Hidroliz

Hidroliz reaksiyonları, lipazın pozisyon seçiciliğine bağlı olarak su varlığında yağların ester bağlarının kırılması ile gliserol, yağ asitleri ve kısmi açıl gliserollere dönüştüğü reaksiyonlardır

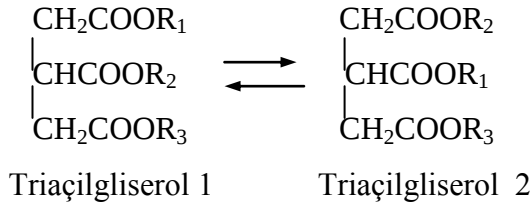
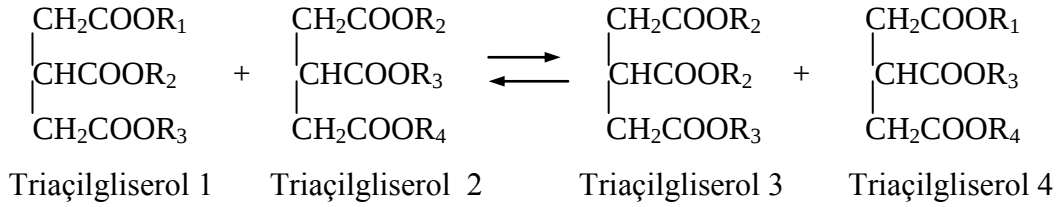
2.2.3.2. Direkt Esterifikasyon

Direkt esterifikasyon, hidrolizin tersidir. Hidroliz ve esterifikasyon reaksiyonunun denge değişimi, reaksiyon karışımındaki su içeriği gibi birçok değişkenden etkilenir. Pratik amaçlar için, sadece reaksiyon hızı değil verim de önemlidir. Doğrudan esterifikasyonda su düzeyi ve su aktivitesi reaktanların denge pozisyonunu kontrol eder ve ürün verimi için çok gereklidir. Enzimatik interesterifikasyonda reaksiyon

ortamı solvent, substrat ve sudan oluşur. Yüksek substrat konsantrasyonu reaksiyon ortamının polaritesini arttırabilir ve suyun çözünürlüğünü arttırabilir. Diğer yandan, su miktarı da ortamın polaritesini etkiler ve substratların çözünmesini arttırır. Bu iki etki, substratların denge pozisyonunu etkiler

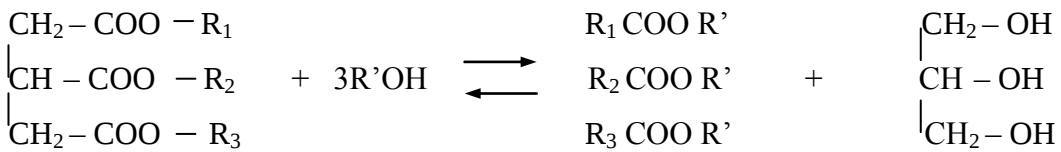
2.2.3.3. Transesterifikasyon

Transesterifikasyon reaksiyonu, iki ester arasında açıl gruplarının değişimidir. Transesterifikasyon reaksiyonlarında, direkt esterifikasyonda oluşan su problemi oluşmaz. Çünkü, transesterifikasyon reaksiyonlarında hidroliz, esterifikasyondan önce gelmektedir.



2.2.3.4. Alkoliz

Bir alkol ile esterin reaksiyona girmesiyle alkil gruplarının yer değiştirmesi sonucu yeni bir ester ve alkol oluşmasına alkoliz denir. Alkoliz reaksiyonları denge reaksiyonları olup alkol fazlası genellikle reaksiyonu ürün lehine döndürür. Bu reaksiyon için stokiometrik oran 3 mol alkole karşılık 1 mol yağ olmasına karşın pratikte ürün verimini arttırmak adına stokiometrik orandan farklı olarak genellikle daha yüksek alkol mol oranlarında çalışılmaktadır.



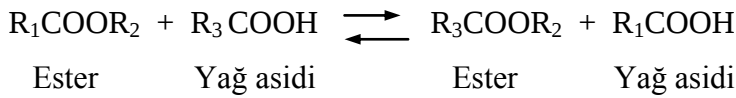
Alkol ve ester arasındaki alkoliz reaksiyonu, metanol kullanıldığında metil ester üretimini sağlar. Alkoliz esnasında, yağ asidi esterine göre daha az miktarda alkolün hidrolizi inhibe etmesine rağmen DAG ve MAG' da oluşabilir. TAG' lardan üretilen metil esterlerin petrol kökenli dizel yakıt eşdeğeri olarak kullanılmaları son yıllarda

önem kazanmıştır. Alkolizin ana uygulaması gliseroliz reaksiyonlarıdır. Gliseroliz reaksiyonu, triaçilgliserol ve gliserol arasındaki açıl gruplarının değişimidir. Gliseroliz reaksiyonu sonucunda MAG, DAG ve TAG' lar üretilir. MAG sentezi için kimyasal interesterifikasyona alternatif metoddur. MAG' lar gıda endüstrisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Ayrıca, emülsiyonlarda, köpüklerde, aerosollerde ve süspansiyonlarda kaplayıcı olarak kullanılırlar.

Üretilen MAG' ın maximum değeri % 74 ve % 96 arasında değişmektedir. Gliseroliz reaksiyonlarında genellikle non spesifik lipazlar kullanılır ve geniş aralıkta reaksiyon ürünleri oluşur. *Pseudomonas fluorescens* ve *Chromobacterium viscosum* dan elde edilen lipazların yüksek gliseroliz aktivitesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Lipaz katalizli MAG sentezinde yüksek verim elde etmek için yeni oluşan MAG' lar kristalizasyon ile reaksiyon ortamından uzaklaştırılmalıdır. Bu durum dengenin MAG lehine dönmesini sağlar. Doymuş yağ asitleri içeren lipidlerin gliserolizi reaksiyon karışımında doymuş monoaçilgliserollerin konsantrasyonunun artmasıyla sonuçlanır. Çünkü, bu MAG' lar, düşük sıcaklıklarda doymamış MAG' lardan daha çabuk kristalize olurlar. Bitkisel yağlar, hayvansal yağlara oranla daha düşük kritik sıcaklıklara sahiptirler. Bunun sebebi, uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin varlığıdır. Reaksiyon sıcaklığının kritik değerin altına alınmasıyla MAG verimi % 30 dan % 90 a artar. Su içeriğinin % 0,5 ve % 5,7 arasında arttırılmasıyla da MAG üretimi arttırılır. Bu değerin üstünde su içeriği verimi arttırmaz.

2.2.3.5. Asidoliz

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



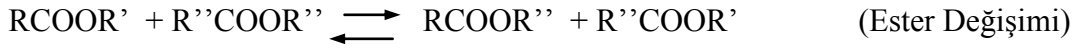
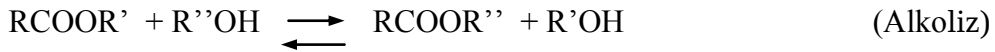
Bu reaksiyonların gerçekleşmesi için yüksek sıcaklık veya asit katalizör ya da her ikisi birden gereklidir.

Asidoliz, yapılandırılmış lipid sentezinde TAG (triaçilgliserol) ile yağ asitlerinin etkileşimi ile yürütülür. Asidoliz reaksiyonunda her yağ asidinin metabolik etkisine göre, TAG' a besinsel, sağlıksal ve düşük kalori gibi özellikler kazandırmak için TAG yeniden yapılandırılır. Asidoliz, bitki ve balık yağlarında EPA ve DHA' nın serbest açıl formlarının birleştirilmesi ve besinsel özelliklerinin geliştirilmesi için kullanılır. Ayrıca bu proses tereyağının tadını kaybettirmeden içindeki doymamış yağ asidinin miktarını arttırmak için de kullanılır. Süt yağının oleik asitle asidolizi

sonucu kristalizasyon sıcaklığının yani süt yağlarının erime aralığının düştüğü bulunmuştur.

2.2.3.6. İnteresterifikasyon

İnteresterifikasyon (iç esterleşme) reaksiyonları, bazı kaynaklarda bir ester ile başka bir bileşen arasında gerçekleşen, alkoksi ve açıl gruplarının yer değiştirmesiyle karakterize edilen ve farklı bir ester oluşumuyla sonuçlanan reaksiyonlar olarak da tanımlanmaktadır.



Lipaz katalizli transesterifikasyonda üretilen yağ kimyasalları interesterifikasyonla elde edilen katı yağ içeriğinden daha düşüktür. Çukulatalarda kakao yağı kullanmanın ana dezavantajı, yüksek fiyattır. Kakao yağı eşdeğeri, ucuz yağlardan interesterifikasyon yoluyla elde edilebilir. Hidrojenasyona uğratılmış pamuk tohumu ve zeytinyağının transesterifikasyonu POS düzeyi aynı SOS düzeyi biraz yüksek oranda olan kakao yağı eşdeğerleri üretilmiştir. İnteresterifikasyon reaksiyonları, hidrokarbon çözücü ortamında yürütülür. Bu çözücüler, reaksiyon ortamının vizkozitesini düşürerek reaksiyonu hızlandırır. Fakat, besinsel güvenlik için reaksiyon ürünü ağartma ve deodorizasyon işlemlerine tabi tutarak çözücü tamamen uzaklaştırılır. Çözücüsüz sistemler, yüksek proses sıcaklığı gerektirmesine rağmen bu sistemler interesterifikasyon için tercih edilir [8].

2.2.4. Enzimatik Sentezi Etkileyen Parametreler

2.2.4.1. Reaksiyon Karışımının Su İçeriği

Reaksiyon karışımında bulunan su miktarı değişik yollarla reaksiyonu etkiler. Organik ve saf fazın karışmayan ortamında su varlığı enzim aktivitesini etkiler. İnteresterifikasyon reaksiyonlarında, TAG sentezinden önce hidrolizi başlatmak için su gereklidir. Fakat, kullanılan enzime bağlı olarak reaksiyon ortamının su içeriği enzim yapısını aktif düzeyde tutmak için gerekli su düzeyini geçerse sistemin veriminin düşmesine neden olur. Esterifikasyon reaksiyonlarında, ester sentezi

ilerlerken su açığa çıkar ve bu su verimi arttırmak için ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Suyun reaksiyon ortamından uzaklaştırılması, moleküler elek yada mikroporoz membran kullanılarak yapılır.

2.2.4.2. Substrat Ve Ürün Etkisi

İnteresterifikasyon reaksiyonlarında kullanılan substrat miktarı sentezlenen TAG' ın verimini etkiler. Bu sentezde kullanılan lipazın özelliğiyle ilgilidir. Substratın zincir uzunluğu, enzimin aktivitesini etkileyebilir. Örneğin *Rhizomucor Miehei* lipazı uzun zincirli yağ asitlerine daha seçicidir. Bu lipazın aktivitesi, yağ asidinin zincir uzunluğunun artmasıyla artar.

Substratın nükleofilitesi de reaksiyon hızında etkilidir. 2. pozisyonda hidroksil grubunun varlığı negatif etkiye yol açar. TAG' lar, DAG' lardan, DAG' lar da MAG' lardan daha hızlı hidrolize olurlar. Yüksek substrat konsantrasyonu substrat inhibisyonuna yol açıp sentezlenen ürün miktarını düşürebilir. Substratların özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu, inhibisyona ve lipazın inaktivasyonuna sebep olabilir.

2.2.4.3. Ortam Sıcaklığı

Sıcaklık, biyokataliz için reaktanların çözünmesine yardım eder. Fakat, yüksek sıcaklık enzimde denaturasyona sebep olup enzim inaktivasyonuna yol açabilir. İmmobilize lipazların çoğunluğu için optimum sıcaklık 30 °C ve 62 °C arasındadır. Sıcaklığın yükselmesiyle uzun zincirli yağ asitlerinin çözünme hızı, kısa zincirli yağ asitlerininkinden daha hızlı olur. Ayrıca, yüksek sıcaklık, reaksiyon karışımının vizkozitesini azaltır ve açıl transferini etkiler.

2.2.4.4. Enzim

Lipazlar, yüksek değerli ürünlerin üretiminde yağların dönüşümü için stereoselektif katalizör olarak kullanılır. Seçilen enzimin türü yapılandırılmış lipidin sentezini etkiler. Lipazlar, reaksiyon karışımında su, pH, sıcaklık ve solvent gibi reaksiyon koşullarından etkilenirler. Lipazlar, organik çözücü ortamında aktif haldeyken kataliz için belli miktar su gerekmektedir. Su ve solvent sistemi, lipazın aktivitesinin belirlenmesinde kritik rol oynarlar. Enzim immobilizasyonu, enzimlerin termostabilitesini arttırmak ve enzimlerin ayrılmasını sağlamak için uygulanır. Bununla birlikte, immobilizasyon enzimin kullanım süresini arttırıp üretim maliyetini azaltır.

2.2.4.5. Solvent Sistemi

Biyokatalizde solvent sisteminin etkisi, enzimatik yapılandırılmış lipid sentezinde önemlidir. Organik solventlerin kullanımı birtakım sınırlamalara sahiptir. Çünkü, organik solventlerin çoğunluğu, biyokatalizi inaktive yada denature eder. Solventlerin hidrofobikliği ya da polaritesi enzimin üç boyutlu yapısının korunmasında önemli etkiye sahiptir ve kataliz için su da gereklidir.

2.2.4.6. Açıl Transferi

Lipaz katalizli interesterifikasyon esnasında, TAG oluşumunda gerekli ve kaçınılmaz ara maddeler olan DAG, MAG gibi kısmi açilgliserollerin oluşması sonucu açıl transferi meydana gelir. Açıl transferi 2. pozisyondan 1. ve 3. pozisyona yada 1. ve 3. pozisyondan 2. pozisyona doğrudur. Denge oluşana kadar açıl transferi devam eder. Reaksiyon karışımında güçlü açıl vericisinin varlığı açıl transferine sebep olabilir. Kuvvetli asitler, kısmi açilgliserollerin açıl transferinin kaynağıdır. Nonpolar solventler, açıl transferinin hızlanmasına sebep olurlar. Aseton ve kloroform gibi polar solventlerde yada solventsiz sistemlerde düşük su miktarlarında açıl transfer hızı azalır [8].

2.2.5. Yapılandırılmış Lipidlerin Önemi

TAG içindeki yağ asitlerinin tipi, yağın fonksiyonel ve fiziksel özelliklerini belirler. Yapılandırılmış lipidlerin sentezinde, çeşitli yağ asitleri kullanılır. Bunlar kısa zincirli, orta zincirli, uzun zincirli doymuş ve doymamış yağ asitlerini içerir. Her bir yağ asidinin özellikleri ve fonksiyonları kullanılarak üretilen TAG' dan maksimum yarar elde edilir.

Lipazın spesifikliği, lipaz katalizli interesterifikasyonun kimyasal interesterifikasyon üzerindeki temel avantajıdır. Örneğin, 1, 3 spesifik lipaz kullanan lipaz katalizli interesterifikasyon reaksiyonunda, 2. pozisyondaki yağ asidinin besinsel değeri korunurken, 1. ve 3. pozisyonlardaki yağ asitleri değiştirilerek yapısal gereklilik tamamlanır.

Orta zincirli triaçilgliseroller, yıllardan beri beslenme zorluğu yaşayan hastaların besinsel ihtiyacını karşılamak için kullanılır ve hızlı enerji kaynağıdır. Çünkü, bu triaçilgliseroller damar sistemi boyunca absorbe olurlar, mitokondriye girmek için karnitine ihtiyaç duymazlar, şilomikron gerektirmez, kolaylıkla oksidize olur ve kolaylıkla yakıt ve enerji olarak kullanılırlar.

Palmitik asit, bebekler için kullanışlı bir enerji kaynağıdır. Anne sütü % 20-30 oranında palmitik asit içerir ve bunun % 70 i TAG' ın 2. pozisyonundadır. Bu durum palmitik asit metabolizması açısından önemlidir. Palmitik asitin en iyi absorblanma şekli 2-MAG olaraktır. Çok az bir kısmı, serbest yağ asidi olarak absorbe edilir. Tripalmitinin doymamış yağ asitleriyle 1,3 spesifik lipaz kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyonunda anne sütü yağ asidi yapısına benzeyen yapılandırılmış lipid üretilmiştir ve şu anda Betapol adıyla satılmaktadır.

Yapılandırılmış lipidler, margarin ve tereyağı gibi yağların üretiminde de önemlidirler. Yağların fiziksel yapısı, yağlarda kullanılan yağ asitlerinin zincir uzunluğu, yağ asitlerinin doymamışlığı ve onların gliserol üzerindeki pozisyonları tarafından belirlenir. Yüksek oranda doymuş yağ asidi içeren yağlar oda sıcaklığında katı, yüksek oranda doymamış yağ asidi içeren yağlar ise oda sıcaklığında sıvı olmaya eğilimlidirler.

İnteresterifikasyon yoluyla yağın gliserol yapısı üzerindeki yağ asidi yapılanması değiştirilip kristalizasyon ve erime karakteristiği farklı yağlar elde edilebilir. Bazı çalışmalar yağın otooksidasyon hızı ve TAG' ın erime özelliklerinin gliserol üzerindeki doymamış yağ asitlerinin pozisyonuyla değiştirilebileceğini göstermiştir.

Yapılandırılmış lipidler, düşük kalorili yağ üretiminde kullanılabilir. Bu genellikle zayıf bir şekilde absorbe olan uzun zincirli yağ asitlerinin kısa ve orta zincirli yağ asitleriyle yer değiştirmesi sonucu oluşur. Bu yöntem, Procter and Gamble şirketi tarafından hindistan cevizi, palm çekirdeği ve kolza yağlarından Kaprenin üretiminde kullanılır. Kaprenin, behenik asidin varlığından dolayı vücutta kısmi olarak absorbe edilir ve normal yağlar gram başına 9 kcal enerji verirken kaprenin gram başına 5 kcal enerji verir. Kaprenin, fiziksel özellikleri açısından kakao yağına benzer ve yumuşak sakız ve tatlılarda kullanım için uygundur.

Bu yöntemin kullanıldığı bir diğer firmada Nabisco Foods Group'tur. Bu firma, asetik asit, propiyonik asit ve bütirik asitten oluşmuş TAG' la hidrojene edilmiş bitkisel yağı kimyasal olarak interesterifiye ederek Salatrim olarak adlandırılan düşük kalorili yağı üretmektedir. Bu ürün, gıda sektöründe kakao yağı eşdeğerinde, fırın ürünlerinde, mayonez, salçada ve süt ürünlerinde kullanılır. Salatrim, gram başına yaklaşık olarak 5 kcal enerji verir [8].

2.2.6. Yapılandırılmış Lipidlerin Enzimatik Üretiminin Önemi

Enzimatik proseslerin ürünleri kolaylıkla saflaştırılabilir, atıkları ayrıştırılabilir ve böylece çevresel kirlilik azaltılabilir. 1,3 spesifik lipaz kullanan transesterifikasyon reaksiyonu ile 2. pozisyondaki yağ asidi sabit tutulup, 1. ve 3. pozisyondaki yağ asitleri değişik olan ürünler elde edilebilir. Bu durum, besinsel açıdan oldukça önemlidir. Çünkü, pankreatik lipaz yalnızca 1. ve 3. yağ asitlerini hidrolize edebilir. 2. pozisyondaki yağ asitleri 1. ve 3. pozisyondaki yağ asitlerinden daha etkili bir şekilde absorbe edilir. TAG'ın otooksidasyon ve erime özellikleri 2. pozisyondaki yağ asitleriyle belirlenir. Düşük sıcaklıkta enzim kullanımı da prosesin maliyetini düşürür.

Yapılandırılmış lipid üretiminde enzimatik sentezin avantajları;

- 1- İstenen yağ asitlerinin pozisyon spesifik birleşimi
- 2- Regioselektif sentez
- 3- Enantioselektif sentez
- 4- Kemoselektif sentez
- 5- Tedavi ve gıda kullanımı gibi uygulamalarda sentez
- 6- Yeni ürünlerin sentezi
- 7- Ilımlı reaksiyon koşulları
- 8- İstenmeyen yan reaksiyon ve ürünlerin azaltılması
- 9- Prosesin kolay kontrolü
- 10- Ürün elde edilmesinin kolaylığı
- 11- Ucuz kaynaklardan elde edilen yağların değerlendirilmesi
- 12- Yağın özelliklerinin ve fonksiyonlarının geliştirilmesi

Enzimatik proseslerin birçok avantajı olmasına rağmen ticareti hala başlangıç aşamasındadır. Enzimlerin endüstriyel gelişimde kullanılmasını engelleyen birçok faktör vardır. Bunlar enzimin fiyatı, sn-2 spesifik lipazın yokluğu, büyük ölçek sorunları ve düzenleyici gereksinimi [8].

2.3. Tripalmitin ve laurik asitle yapılan çalışmalarla ilgili literatür çalışması

Nagao ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *Fusarium heterosporum*

1,3-spesifik lipazıyla tripalmitin ile oleik asitin asidolizinden yapılandırılmış lipid üretilmiştir. Lipid üretiminde optimum reaksiyon şartları, 1:2 substrat oranı (tripalmitin/oleik asit), % 8 enzim, 50 °C ve 24 saat olarak bulunmuştur. Bu şartlarda tripalmitine oleik asit katılımı % 50 olarak elde edilmiştir [9].

Tripalmitin ile yürütülen bir diğer çalışma Yang ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı, *Thermomyces lanuginosa* lipazının katalitik fonksiyonlarını incelemek ve 3. pozisyonunda çoklu doymamış yağ asidi içeren anne sütü eşdeğeri yağ üretimi için gerekli reaksiyon şartlarını tepki yüzey metodolojisiyle optimize etmektir. Yapılan bu çalışmada *Thermomyces lanuginosa* lipazının *Rhizomucor Miehei* lipazından biraz daha düşük aktivite gösterdiği bulunmuştur. Optimum reaksiyon şartları, 5:1 substrat oranı, % 20 enzim oranı, 20 saatlik reaksiyon süresi olarak tespit edilmiştir. Bu şartlarda açıl birleşiminin % 42 olduğu açıklanmıştır [10]. Mukherjee tarafından yapılan bir araştırmada sn-3 spesifikliği bulunan *Carica Papaya Latex* lipazı, kolza yağından elde edilen doymamış 18 karbonlu yağ asitlerinin karışımıyla tripalmitinin asidolizinde kullanılmıştır. Papaya lipazı bitkilerden elde edildiği için gıda endüstrisinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bu çalışma sonucunda 2. pozisyonundaki palmitik asiti yüksek oranda olan, anne sütüne benzeyen trigliseridler elde edilmiştir. Bu triaçilgliseroller, ticari olarak bebek beslenmesinde kullanmak için üretilmiştir [11].

Rhizomucor Miehei lipazı kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada tripalmitin, oleik asitle asidoliz reaksiyonuna tabi tutulmuş ve yüksek oranda OPP içeren trigliseridler elde edilmiştir. Reaksiyon ürünleri HPLC ile analiz edilmiş ve analiz sonucunda enzimin, trigliseridin 1. pozisyonuna 3. pozisyonundan daha seçici olduğu ve OPP senteziyle sonuçlandığı görülmüştür [12].

Gandhi ve Mukherjee tarafından yapılan bir araştırmada tripalmitinin *Carica Papaya* lipazıyla interesterifikasyonu incelenmiştir. Lipaz enzimleri bilindiği gibi endüstriyel önemi olan enzimlerdir. Fakat, iki nedenden endüstride kullanımları sınırlıdır. Bunlardan biri endüstriyel kullanım için gerekli miktarın mevcut olmaması ve diğeri de bu enzimlerin fiyatının yüksekliğidir. Bu çalışma için seçilen enzim *Carica Papaya* lipazıdır. Bu enzim ticari olarak bulunan ve diğer enzimlerden daha ucuz bir enzimdir. Bu enzimin bu çalışma için seçilmesinin bir diğer nedeni de substrat spesifitesine sahip olmasıdır. Daha önce bu enzimle yapılan çalışmalarda, enzimin orta ve uzun zincirli esterler için seçiciliğe ve 1, 3 pozisyon seçiciliğine sahip olduğu açıklanmaktadır. Bu çalışmada tripalmitinin 8 karbonlu farklı substratlarla interesterifikasyon reaksiyonları incelenmiştir. Yürütülen reaksiyonlar, n-oktanol ile alkoliz, kaprilik asitin alkil esterleriyle transesterifikasyon reaksiyonlarıdır. Substrat cinsinin reaksiyon hızına etkisinin incelendiği bu çalışmada, reaksiyon sıcaklığı 63 °C, enzim miktarı 27 mg olarak alınmış,

numuneler, 24 saatlik reaksiyon periyodunda belli aralıklarla alınmış ve bileşimleri TLC ile incelenmiştir. En hızlı dönüşümün n-oktanol ile alkoliz reaksiyonunda elde edildiği 24 saat sonunda ki verimin % 94 olduğu açıklanmıştır. Kaprilik asitle asidoliz ise reaksiyon hızı en düşük olan yavaş reaksiyon olarak açıklanmıştır. [13].

Mu ve Hoy tarafından yapılan bir çalışmada, sn-1, 3 pozisyonlarında orta zincirli sn-2 pozisyonunda temel yağ asidi içeren TAG, lipaz katalizli asidoliz reaksiyonuyla sentezlenmiştir. Daha önceki çalışmalarda orta zincirli yağ asitlerinin ince bağırsakta kısmi olarak absorblandığı bulunmuştu. Ancak, absorbsiyon mekanizması açıklanamamıştır. TAG metabolizmasını daha iyi anlaşılması için lenf lipidleri farklı sınıflara ayrıştırılmış ve her yağın yağ asidi kompozisyonu metil ester hazırlanmasından sonra GC ile analiz edilmiştir. Kaprilik asidin fosfolipidlerle reaksiyona girmediği, laurik asidin ise fosfolipidlerle birleştiği asidoliz reaksiyonu ile açıklanmıştır [14].

Laurik asitle yapılan bir diğer çalışmada LaOLa (1, 3 dilauoil 2 oleoil)'ün sentezi ve saflaştırılması için hızlı bir metod geliştirilmiştir. Triolein ve laurik asidin enzimatik transesterifikasyonu ile % 70 oranında LaOLa içeren fraksiyon elde edilmiştir. MAG ve DAG fraksiyonları ayrılarak % 99 dan yüksek saflıkta LaOLa fraksiyonu elde edilmiştir. [15].

Nieto ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada, *Mucor Miehei* lipazıyla orta ve uzun zincirli yağ asitleri içeren yapılandırılmış triaçilgliseroller sentezlenmiştir. Hindistan cevizi yağının hidroliziyle elde edilmiş olan laurik asit bu çalışmadaki substratlardan biridir. Hidroliz ürünlerinden ayrılan yağ asidi, metil esterlerine dönüştürülmüştür. Sn-2 EPA gliserol ve sn-2 DHA gliserol balık yağının hidroliziyle elde edilmiştir. İnteresterifikasyon su ceketli reaktörde gerçekleştirilmiş ve triaçilgliserol ürünleri kromatografiyle ayrıştırılmıştır. 1. ve 3. pozisyonlarında orta zincirli 2. pozisyonunda uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri içeren yapılandırılmış triaçilgliseroller elde edilmiştir [16].

Sellapsan ve Akoh tarafından yapılan bir çalışmada tristearin, oleik ve laurik asitle asidoliz reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Substrat mol oranı, zaman, sıcaklık, enzim miktarı gibi reaksiyon parametreleri incelenmiş ve reaktanların 1:4:1 (tristearin/laurik asit/oleik asit) lik substrat oranlarında uygun ergime profili elde edilmiştir. Bu ürünün 1200 g lık sentezi optimum koşullarda karıştırmalı kesikli reaktörde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen lipidin etkinliği kaplanmamış kraker ve kakao kaplı

krakerlerle karşılaştırıldı. Sentezlenen lipidin nem absorpsiyonunu engellemede kakao yağından daha etkili olduğu görülmüştür [17].

Sellapsan ve Akoh tarafından yapılan bir diğer çalışmada, hekzan varlığında tristearinin kaprik, laurik, miristik palmitik ve oleik asitlerle eşit mol oranlarında transesterifikasyonu reaksiyonu gerçekleştirilmiştir ve asetonun bu reaksiyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Aseton varlığında oleik asitin diğer yağ asitlerine oranla daha yüksek oranda birleştiği görülmüştür. Aseton konsantrasyonunun artmasıyla kaprik asit birleşiminin azaldığı görülmüştür. Ayrıca, asetonun enzimin toplam aktivitesini düşürdüğü bulunmuştur [18].

Tripalmitin ve laurik asitin reaksiyonuyla ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

2.4. Tepki Yüzey Metodolojisi (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 [19,20]. TYM ile bir seferde birden fazla değişkenin tepki üzerine olan etkisi denebilmekte, 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'ın, 1958 yılında Bradley'ın, 1958-1959 yılları arasında Hunter ve 1960 yılında ise Davies'ın TYM üzerindeki çalışmaları kullanılan teknikleri geliştirmiştir. Bu tekniklerin tümü deneyin tasarımını ve elde edilen deneysel sonuçların analizini kapsamaktadır [19,21].

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 merkezli 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 [19,21].

Merkezi 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. Merkezi 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 noktalarının sayısı Tablo 2. X da da gösterildiği gibi kullanılan ortogonal dizaynla belirlenmektedir [20].

Tablo 2.1: Merkezi bileşik deney tasarımları [20]

Bağımsız Değişken	2. Dereceden Modelde	Küp Noktaları sayısı				
			Sayı 2k	Değer α	Merkez Nokta	Toplam Nokta
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 [21].

Tepki Yüzey Metodolojisinin gıda araştırmalarında kullanımı ile ilgili ilk detaylı derleme Hill ve Hunter tarafından 1966 yılında yayınlanmıştır [22]. 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 triağılglicerollerin sentezinde 4-5 değişkenli ve yıldız noktalı merkezli bileşik deneysel tasarımlar kullanılmış ve reaksiyon koşulları optimize edilmiştir [23-24]. Koko yağından n-3 ve n-6 yağ asitlerince zengin yapılandırılmış lipidlerin üretiminde [25]; menhaden balık yağının kaprilik asit ile modifikasyonunda [26]; tripalmitinin eikosapentaenoik ve dokosahekzaenoik asitlerin etil esterleri ile interesterifikasyonunda [27] ve boraj (hodan) yağına dokosahekzaenoik asitin katılımında [28] ise 3 değişkenli ve 3 seviyeli küp tasarımına göre deneylerin tasarımı yapılmış ve reaksiyon değişkenleri optimize edilmiştir.

Bu çalışmamızda, tripalmitinden laurik asitce zenginleşmiş triağılglicerollerin 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 tripalmitin ile laurik asitin asidoliz reaksiyonu optimize edilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1. Kullanılan Hammaddeler

Bu çalışmada kullanılan tripalmitin (T 8127, % 90 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 kullanılan 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 ve tripalmitinin 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 asitleri metil esterlerinin aynı cihaz ve koşullarda yapılan analizlerinden elde edilmiş kromatogramları kullanılmıştır.

3.2.2. Tripalmitin 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 tripalmitin ve laurik asitten hazırlanmış karışım) ve

Tablo 3.1: Gaz Kromatografi Analiz Koşulları

Dedektör tipi	FID ⁽¹⁾
Dedektör sıcaklığı (°C)	280
İnjektion 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 (30 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

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 analizi yapılarak asidoliz reaksiyonunun değerlendirilmesi yapılmıştır.

3.2.3. Asidoliz ürünlerinin analizi

Asidoliz reaksiyonu ürün karışımından alınmış numuneler hemen 90-100 °C’ lik su banyosunda 15 dakika ısıtılmıştır. Böylece lipaz enziminin inaktive edilmesi sağlanarak reaksiyon tamamıyla sonlandırılmıştır. Bilindiği üzere, asidoliz reaksiyonunun ana ürünü tripalmitinin triaçilgliserollerinden türemiş yeni bir yağ asiti profiline sahip triaçilgliseroller (TAG) dir. Bu TAG’ ler ortamda reaksiyona girmemiş laurik asit ile tripalmitinden açığa çıkmış yağ asitleri (YA) ile birlikte

bulunurlar. Yeni oluşmuş bu TAG'lerin analizlerinin yapılabilmesi için ortamda bulunan serbest 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 sağlanmıştır. 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 asidi bileşimleri ve tripalmitine katılan laurik asitin yüzdesi belirlenmiştir.

3.2.4.Deneysel Tasarımda Kullanılacak Değişkenlerin ve Değişken Seviye Değerlerinin Belirlenmesi

Enzimatik olarak tripalmitinden 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 süresi, substrat oranı, enzim miktarı ve reaksiyon sıcaklığı en önemli değişkenlerdir. 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 süresi ve yüksek enzim miktarlarında yüksek ürün verimi elde edilir, ancak ekonomiklik ve uygulanabilirlik açısından kısa reaksiyon süresi ve daha az miktarda enzimle çalışmak tercih sebebidir. Yüksek sıcaklıkta çalışmak reaksiyon hızını arttırmakta ise de 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 arttırır. Bütün bu faktörler ürün verimini ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu birlikte etkilemektedir. 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 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 taşımaktadır. 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rnlerinin analizi ise Bölüm 3.2.3. de açıklanan deneysel prosedüre göre yapılmıştır. Deneysel sonuçların istatiksels 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 (Responce surface) grafikleri değerlendirilerek reaksiyon koşulları optimize edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

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

Çalışmamızın birinci bölümünde, tripalmitin ve laurik asitin yağ asitleri bileşimleri saptandıktan sonra, tripalmitinin laurik asit ile asidoliz reaksiyonlarında, sabit sıcaklıkta (50 °C da), reaksiyon parametrelerinin (enzim miktarının, tripalmitin: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, tripalmitin 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, tripalmitin ve laurik asitin bileşimleri Bölüm 3.2.1. de sunulan koşullarda gaz kromatografik yöntemle belirlenmiştir. Tablo 4.1 de laurik asitin ve tripalmitinin yağ asitleri bileşimi birlikte verilmiştir.

Tablo 4.1: Laurik Asitin ve Tripalmitinin Yağ Asitleri Bileşimi

Yağ asiti	Yağ Asiti Bileşimi (%)	
	Tripalmitin	Laurik Asit
12:0	0,07	99,45
14:0	0,44	0,07
16:0	96,51	0,11
18:2	-	0,07
18:1	-	0,16
18:0	2,92	-

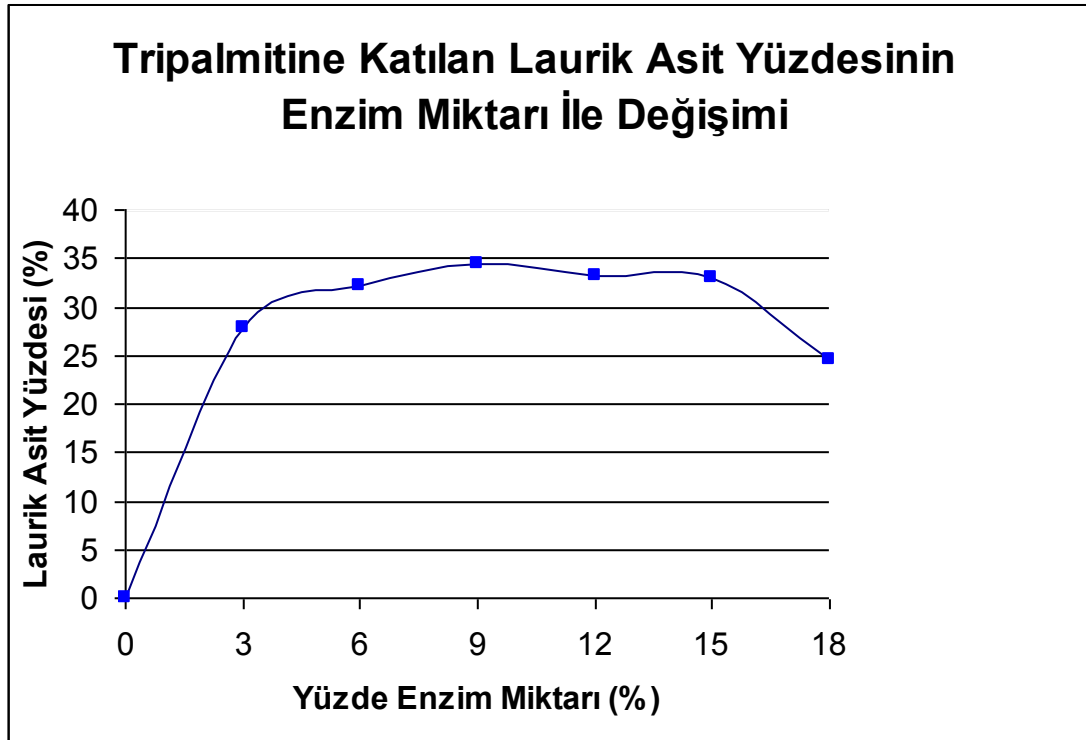
Tablo 4.1 den görüldüğü üzere, tripalmitin yağ asitleri % 96,5 palmitik asit içermektedir. Bileşiminde palmitik asit yanında % 3 stearik ve az miktarlarda laurik ve miristik asitler bulunmaktadır. Laurik asit ise % 99,5 saflıktadır.

4.2.Tripalmitin ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Enzim Miktarının Etkisi

Çalışmamızın bu ilk bölümünde, tripalmitinin laurik asit ile asidoliz reaksiyonunda enzim miktarının ürün TAG' larına katılan laurik asit miktarına olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, bir seri tripalmitin ile laurik asitin asidoliz reaksiyonları yürütülmüştür. Bu reaksiyonlarda, tripalmitin: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 kromatografisi 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: Tripalmitinin Laurik Asit ile Asidolizinde, Ürün Yağ Asitleri Bileşiminin Enzim Miktarı ile Değişimi (50° C; Tripalmitin:Laurik Asit mol oranı, 1:3; 6 saat)

Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (%)						
	TAG	TAG	TAG	TAG	TAG	TAG	TAG
	Orijinal	%3	%6	%9	%12	%15	%18
12:0	0,07	27,90	32,17	34,52	33,24	33,00	24,51
14:0	0,44	0,43	0,36	0,34	0,37	0,37	0,32
16:0	96,51	66,36	63,66	61,66	62,70	62,71	72,38
18:2	-	1,17	1,11	0,40	0,80	0,32	0,10
18:1	-	2,15	0,95	1,15	0,81	0,92	0,49
18:0	2,92	1,98	1,76	1,93	2,10	2,68	2,22



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

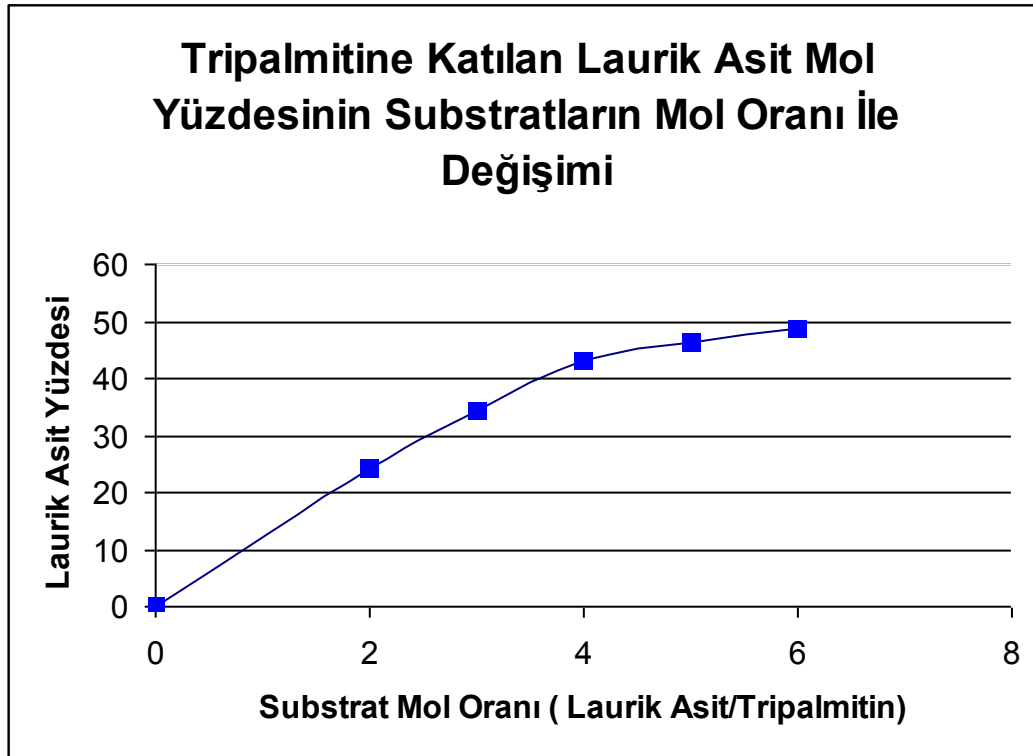
Şekil 4.1' den görüldüğü üzere, %3 enzim miktarı ile çalışıldığında, başlangıç TAG moleküllerinin yağ asitleri bileşiminde laurik asit % 0,07 iken ürün TAG' larının laurik asit içeriği % 27,90 olarak belirlenmiştir. Enzim miktarının %6 ya yükseltilmesiyle tripalmitine katılan laurik asit % 32 lere çıkmış, enzimin %9-15 arasında kullanımı ile ürün bileşimindeki laurik asit miktarı önce % 35 lere yükselmiş, daha sonra % 33 lerde pratik olarak sabit kalmıştır. Reaksiyon ortamında % 15 den daha fazla enzim bulunması durumunda ise ürün TAG' larındaki laurik asit yüzdelерinde bir miktar düşme de gözlenmiştir. % 21 enzim ortamında çalışıldığında ise tekrarlı sonuçlar alınamamıştır. 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 değeri %3 ve en yüksek çalışma değeri %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.

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

Çalışmamızın bu bölümünde, tripalmitinin laurik asit ile asidoliz reaksiyonunda substratların mol oranının ürün TAG' larına katılan laurik asit miktarına olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, ikinci seri tripalmitin ile laurik asitin asidoliz reaksiyonları yürütülmüştür. Bu reaksiyonlarda, birinci seri deneyler sonucunda saptanan maksimum laurik asit katılımı veren enzim miktarı (%9) ile çalışılmıştır. Tripalmitin (TP):laurik Asit (LaA) 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 asidi 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: Tripalmitinin Laurik Asit ile Asidolizinde, Ürün Yağ Asitleri Bileşiminin Tripalmitin:Laurik Asit mol oranı ile Değişimi (50°C; Enzim miktarı %9; 6 saat)

Yağ Asitleri	TAG' ların Yağ Asitleri Bileşimi (%)					
	TAG Orijinal	TAG 1:2	TAG 1:3	TAG 1:4	TAG 1:5	TAG 1:6
12:0	0,07	24,26	34,52	43,02	46,42	48,73
14:0	0,44	0,36	0,34	0,38	0,41	0,33
16:0	96,51	72,41	61,66	53,93	50,85	47,87
18:2	-	0,08	0,40	0,17	0,10	0,89
18:1	-	0,71	1,15	0,90	0,81	1,12
18:0	2,92	2,19	1,93	1,60	1,41	1,07



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

Şekil 4.2 den, TP:LA mol oranının arttırılmasıyla ürün TAG moleküllerindeki laurik asit miktarlarının arttığı, özellikle 1:4 mol oranından sonra laurik katılımının %40 ların üzerine çıktığı görülmektedir. TP:LA mol oranının 1:5 e yükseltilmesiyle üründe laurik asit yüzdesi 46 lara erişmiştir. Mol oranının daha 1:6 ya çıkarılmasıyla TAG moleküllerinin laurik asit içeriğinin artışı beklenen kadar olmamış, % 49 larda kalmıştır. Bu deneysel verilerden, asidoliz reaksiyonlarında TP: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.

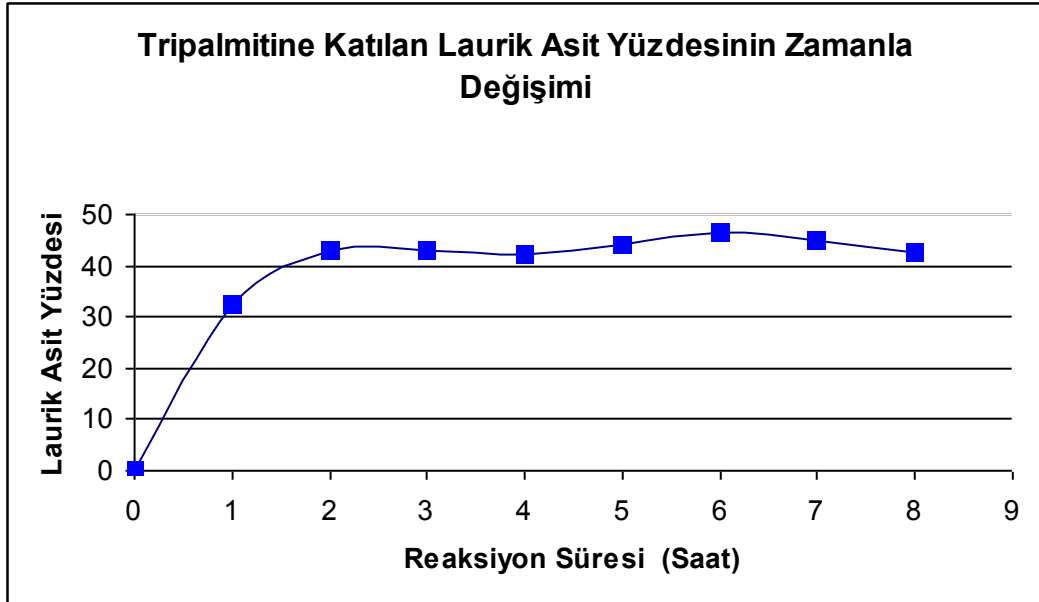
4.4.Tripalmitin ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Reaksiyon Süresinin Etkisi

Çalışmamızın birinci bölümünün son kısmında, reaksiyon süresinin tripalmitin ile laurik asitin asidoliz reaksiyonuna olan etkisi incelenmeye alınmıştır. Üçüncü seri asidoliz reaksiyonlarında, daha önce gerçekleştirilmiş 2 seri deneylerde enzim miktarı ve TP:LA mol oranı için saptanmış merkez seviye değerleri kullanılmıştır. Asidoliz reaksiyonları % 9 enzim varlığında, 1:5 TP: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.-3.saatlerde laurik asit içeriği % 33-43 olan TAG lar elde edilmektedir. 5. saatte TAG bileşiminde laurik yüzdesi 44 lere yükselmekte ve 6. saatte % 46 in üstünde laurik asit içeren TAG ürünleri oluşmaktadır. TAG lardaki laurik asit miktarı 7. saatten sonra tedrici olarak azalmaktadır. Deneyler esnasında paralel deneylerde tekrarlı sonuçların ancak 4 saatten sonra alınabilmesi bize reaksiyon sisteminde dengenin 4 saatte kurulabildiğini göstermiştir. Bu yüzden ilk saatlere ait deney sayısı 5 e çıkarılmış ve tabloda 1-3 saate ait bileşim değerleri birbirlerine yakın sonuçların ortalaması olarak verilmiştir. Bu nedenle reaksiyon süresinin reaksiyonda etkin olduğu aralık 4-8 saat olarak seçilmiştir. Bu zaman aralığında, reaksiyon süresi için 3 seviye değeri de 4, 6 ve 8 saat olarak belirlenmiştir.

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

Yağ Asitleri	TAG' ların Yağ Asitleri Bileşimi (%)								
	TAG Orişinal	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	0,07	32,54	43,10	43,09	42,14	44,12	46,42	44,77	42,45
14:0	0,44	0,33	0,49	0,32	0,34	0,31	0,41	0,30	0,33
16:0	96,51	63,91	52,74	53,80	54,95	52,79	50,85	52,63	55,09
18:2	-	0,06	0,46	0,12	0,66	0,17	0,10	0,07	0,03
18:1	-	1,29	1,82	1,01	0,45	1,06	0,81	0,29	0,19
18:0	2,92	1,87	1,39	1,66	1,46	1,55	1,41	1,94	1,90



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

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

Çalışmanın ikinci bölümünde, tripalmitin ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda reaksiyon parametrelerin (bağımsız değişkenlerin) bağımlı değişken olan tepkiye (tripalmitine katılan laurik asit miktarına, %LA'a) olan etkileri Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM) ile incelenmiştir. Böylece, laurik asitin tripalmitine 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 seçilen deney tasarımında kullanılan değişkenler ve onların ön denemelerle belirlenmiş 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
TP:LA mol oranı (mol/mol)	1:4	1:5	1:6
Reaksiyon süresi (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. 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 4.6: Yüzey merkezli küp deney tasarımında belirlenen deney tasarım noktaları

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

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	TP:LA, 1:4		TP:LA, 1:6	
	4 saat	8 saat	4 saat	8 saat
12:0	26,61	28,15	28,38	32,78
14:0	0,34	0,50	0,38	0,33
16:0	70,16	68,47	68,76	64,07
18:2	0,10	0,19	0,15	0,27
18:1	0,48	0,46	0,24	0,25
18:0	2,31	2,23	2,09	2,31

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

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	TP:LA, 1:4		TP:LA, 1:6	
	4 saat	8 saat	4 saat	8 saat
12:0	37,41	38,87	40,78	40,20
14:0	0,28	0,32	0,30	0,33
16:0	59,29	58,40	56,56	57,34
18:2	0,28	0,04	0,30	0,03
18:1	0,74	0,27	0,32	0,19
18:0	1,99	1,71	1,73	1,90

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

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	TP:LA, 1:5		TP:LA, 1:4:	TP:LA, 1:6
	%3 Enzim	%15 Enzim	%9 Enzim	%9 Enzim
12:0	29,11	39,48	43,02	48,73
14:0	0,47	0,30	0,38	0,33
16:0	66,82	57,86	53,93	47,87
18:2	0,47	0,30	0,17	0,89
18:1	0,75	0,42	0,90	1,12
18:0	2,39	1,63	1,60	1,07

Tablo 4.10: Tripalmitin ile laurik asitin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerin yağ asitleri bileşimleri (TP: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	42,14	42,45	45,68	47,00	46,42
14:0	0,34	0,33	0,32	0,35	0,41
16:0	54,95	55,09	52,32	50,03	50,85
18:2	0,66	0,03	0,11	0,31	0,10
18:1	0,45	0,19	0,78	1,05	0,81
18:0	1,46	1,90	0,79	1,26	1,41

Tripalmitin ile laurik asitin asidoliz reaksiyonunda amacımız tripalmitine 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	Enzim miktarı	TO:LA mol	Süre	Tepki
1	3	1:4	4	26,61
2	3	1:4	8	28,15
3	3	1:6	4	28,38
4	3	1:6	8	32,78
5	15	1:4	4	37,41
6	15	1:4	8	38,87
7	15	1:6	4	40,78
8	15	1:6	8	40,20
9	3	1:5	6	29,11
10	15	1:5	6	39,48
11	9	1:4	6	43,02
12	9	1:6	6	48,73
13	9	1:5	4	42,14
14	9	1:5	8	42,45
15	9	1:5	6	45,68
16	9	1:5	6	47,00
17	9	1:5	6	46,42

4.6.Farklı Reaksiyon Koşullarının Tripalmitin ile Laurik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Etkilerinin İstatiksel Açıdan Değerlendirilmesi

Tablo 4.11 deki verilen bağımsız değişkenler değerlerine karşılık elde edilen tepki değerlerinin istatiksel 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.

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

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 etkilerin tahminleri ve katsayıları Tablo 4.12’de ve varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.13’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 değeri	p değeri	-95,%	+95,%	Katsayı
Ortalama/Intersept	45,3715	0,619933	73,1879	0,000000	43,9056	46,8375	45,3715
Enzim miktar(L)	10,3420	0,916288	11,2868	0,000010	8,1753	12,5087	5,1710
Enzim miktar(Q)	-20,6604	1,770214	-11,6711	0,000008	-24,8463	-16,4745	-10,3302
Mol oranı(L)	3,3620	0,916288	3,6692	0,007973	1,1953	5,5287	1,6810
Mol oranı(Q)	2,4996	1,770214	1,4120	0,200819	-1,6863	6,6855	1,2498
Süre(L)	1,4260	0,916288	1,5563	0,163596	-0,7407	3,5927	0,7130
Süre(Q)	-4,6604	1,770214	-2,6327	0,033780	-8,8463	-0,4745	-2,3302
EnzimMiktarı*Mol Oranı	-0,4250	1,024441	-0,4149	0,690663	-2,8474	1,9974	-0,2125
Enzim Miktarı*Süre	-1,2650	1,024441	-1,2348	0,256735	-3,6874	1,1574	-0,6325
Mol Oranı*Süre	0,2050	1,024441	0,2001	0,847085	-2,2174	2,6274	0,1025

^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, “E”, “M” ve “S”’dir. “E” enzim miktarını, “M” Laurik asit / Tripalmitin mol oranını ve “S” ise reaksiyon süresini ifade etmektedir.

$$\% \text{ Laurik Asit Birleşimi} = 45,37 + 5,17 \cdot E - 10,33 \cdot E^2 + 1,68 \cdot M + 1,25 \cdot M^2 + 0,71 \cdot S - 2,35 \cdot S^2 - 0,21 \cdot E \cdot M - 0,63 \cdot E \cdot S + 0,10 \cdot M \cdot S$$

Tablo 4.13: Varyans analizi sonuçları

Faktör	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F Değeri	P Değeri
Enzim miktar(L)	267,3924	1	267,3924	127,3928	0,00001
Enzim miktar(Q)	285,911	1	285,911	136,2156	0,000008
Mol Oran(L)	28,2576	1	28,2576	13,4627	0,007973
Mol Oran(Q)	4,1849	1	4,1849	1,9938	0,200819
Süre(L)	5,0837	1	5,0837	2,422	0,163596
Süre(Q)	14,548	1	14,548	6,9311	0,03378
Enzim Miktarı*Mol Oranı	0,3612	1	0,3612	0,1721	0,690663
Enzim Miktarı*Süre	3,2004	1	3,2004	1,5248	0,256735
Mol Oranı*Süre	0,0841	1	0,0841	0,04	0,847085
Hata	14,6927	7	2,099		
Kareler Toplamı	822,2055	16			

^a : $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı

^b : $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

L : Lineer

Q : Kuadratik

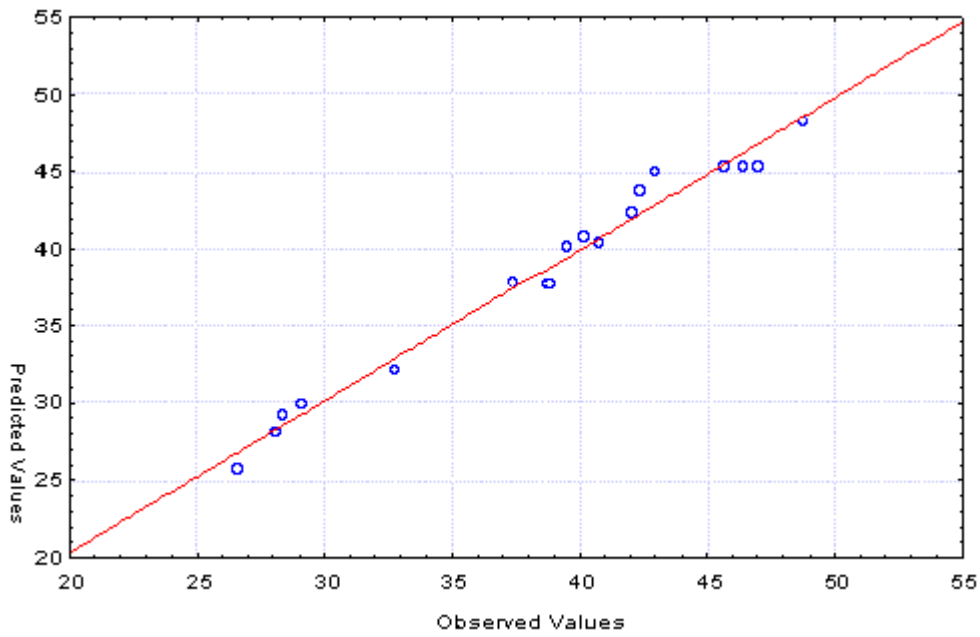
Varyans analizinin sonuçları incelendiğinde, enzim miktarının lineer etkisi $p < 0,01$ düzeyinde, yine enzim miktarının kuadratik etkisinin $p < 0,05$ düzeyinde, mol oranının lineer etkisi de $p < 0,01$ düzeyinde ve sürenin kuadratik etkisinin $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Buna karşılık diğer etkilerin istatistiksel açıdan önemli olmadığı görülmüştür.

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

Tablo 4.14: Tepki Yüzey Metodolijisine Göre Asidoliz Reaksiyonunda Kullanılan Değişkenlerin Sahip Olduğu Kritik Değerler

Değişkenler	Gözlenen (Minimum)	Kritik	Gözlenen (Maksimum)
Enzim miktarı	3	10,52302	15
Substrat mol oranı	4	4,3448	6
Süre	4	6,20826	8

Daha önce elde edilmiş olan model denklemden yararlanarak, gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki ise Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4: Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Tahmin Edilen ve Reaksiyonda Gözlenen Tepki Değerleri

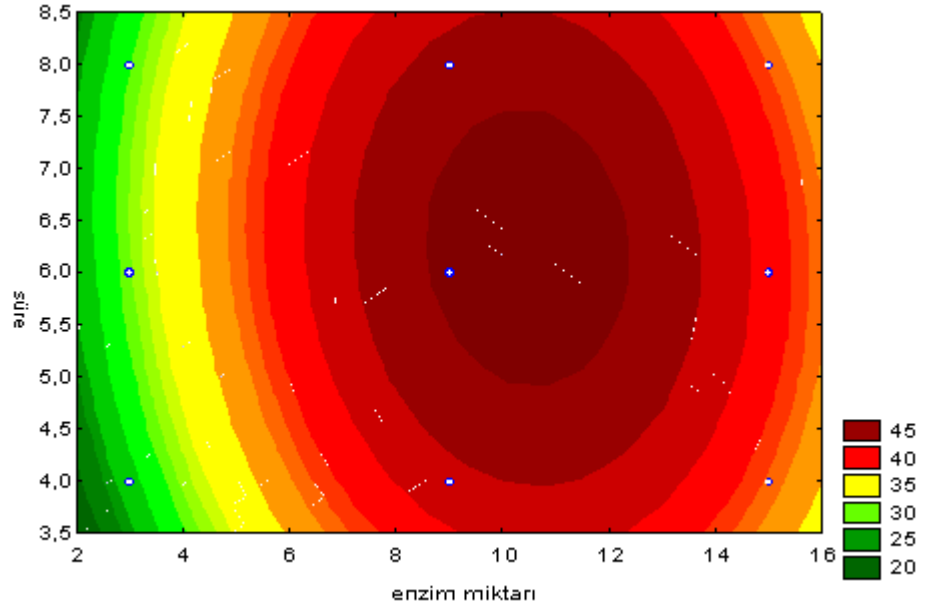
Faktörlerin model denklemde yerine konması ile elde edilen tepki değeriyle, deney sonucunda elde edilen tepki değerleri arasında lineer bir ilişki söz konusudur. Bu durum oluşturulan modelin reaksiyon parametreleri arasındaki gerçek ilişkileri gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Tepki yüzey metodolojisine göre, elde edilen maksimum tepki değeri % 45,51 olarak bulunmuştur.

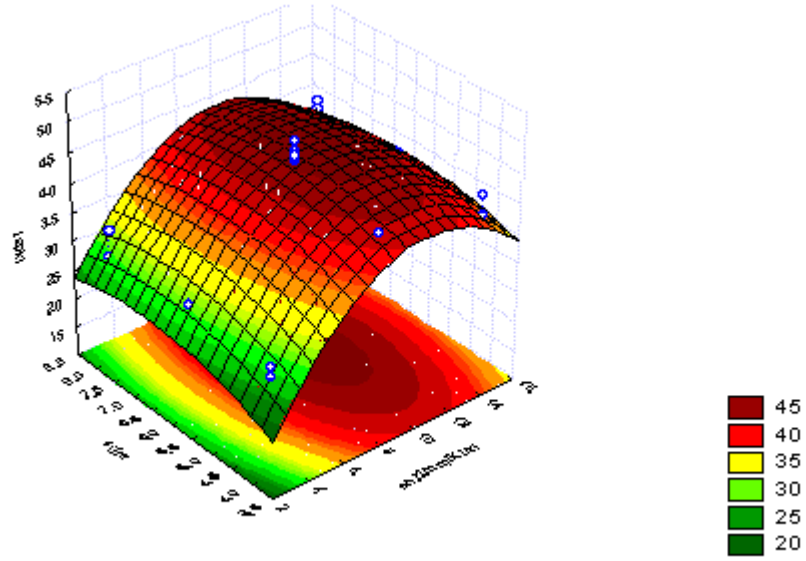
4.7.Tepki Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması

Tripalmitinin laurik asit ile enzimatik asidoliz sonucu laurik asit birleşim yüzdesinin enzim miktarı ve sıcaklığa göre değişimini gösteren izdüşüm ve tepki-yüzey

grafikleri Şekil 4.5. ve 4.6. da 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. Şekil 4.5. incelendiğinde grafiğin ortasında bulunan koyu kırmızı alan en yüksek laurik asit birleşiminin olduğu alanı göstermektedir. Şekildende anlaşıldığı üzere % 8,5 ile % 12 arasındaki enzim miktarıyla, 5 saat ile 7 saat arası reaksiyon süresinde en yüksek tepki değeri elde edilir. Reaksiyon süresinin % 8,5 - % 12 arası enzim miktarında 7 saatten daha fazla devam ettirilmesi reaksiyona hiçbir şekilde katkı yapmamaktadır.

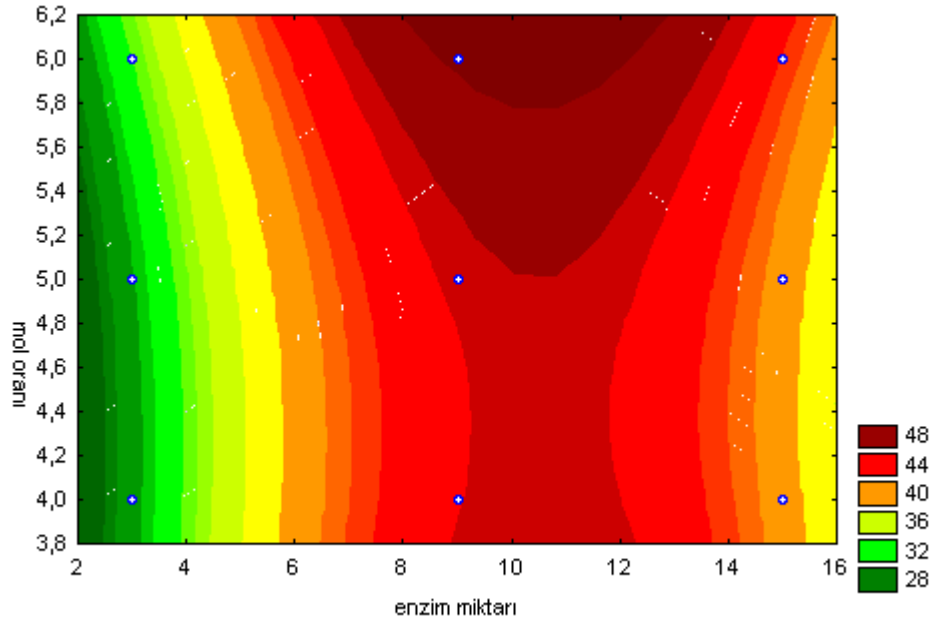


Şekil 4.5: Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Enzim Miktarı ve Sürenin Asidoliz Reaksiyonu Üzerine Etkisi

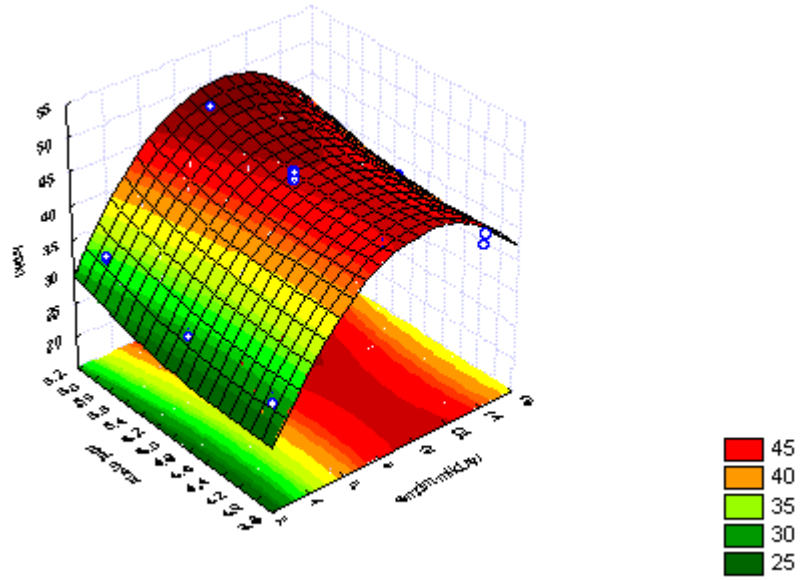


Şekil 4.6: Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Enzim Miktarı ve Sürenin Asidoliz Reaksiyonu Üzerine Etkisi (Üç Boyutlu Gösterim)

Şekil 4.7. ve 4.8. de sabit reaksiyon süresinde enzim miktarıyla, substrat mol oranı (LA:TP) nın yüzde laurik asit birleşimi üzerindeki etkisi görülmektedir. Şekiller incelendiğinde en yüksek tepki değerinin % 8,5 - % 12 enzim miktarıyla, 5,8 – 6,2 substrat mol oranında elde edildiği görülmektedir.

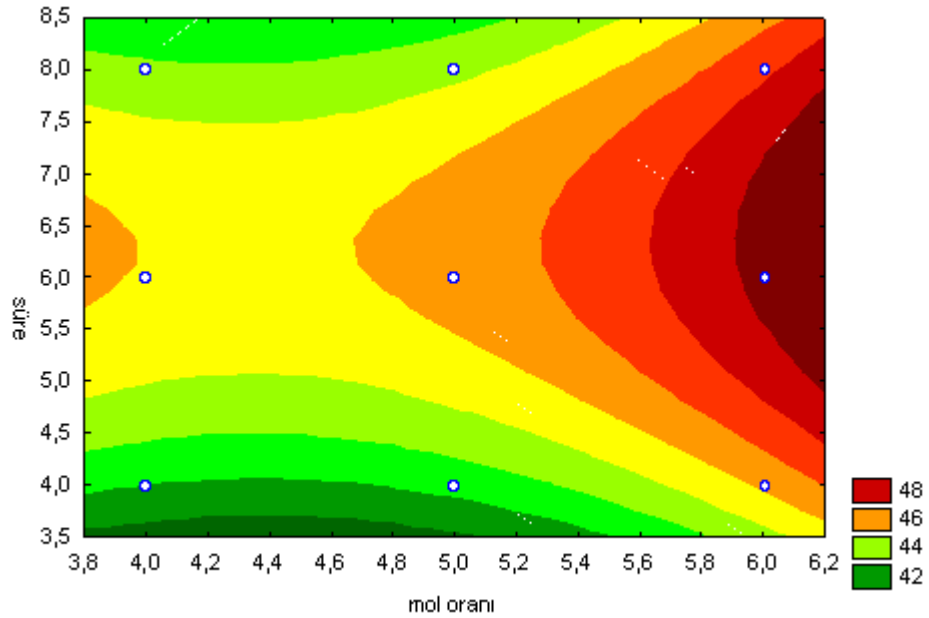


Şekil 4.7: Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Enzim Miktarı ve Mol Oranının Asidoliz Reaksiyonu Üzerine Etkisi

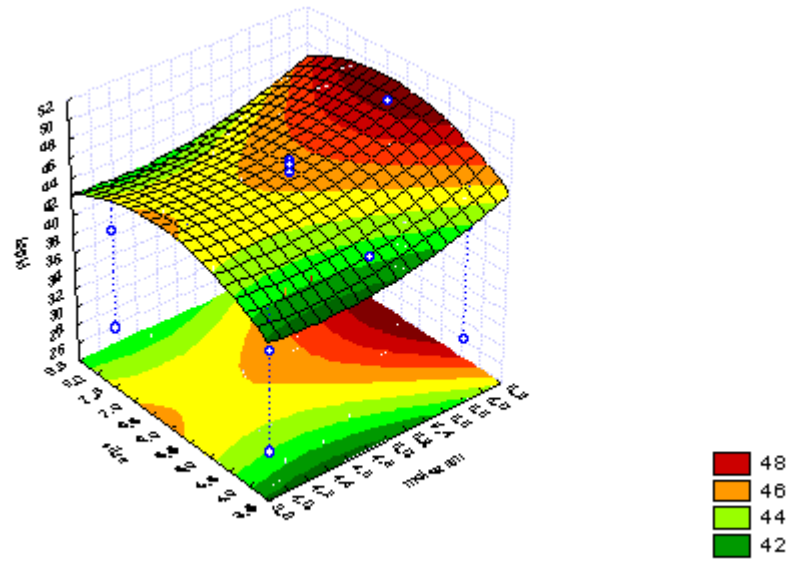


Şekil 4.8: Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Enzim Miktarı ve Mol Oranının Asidoliz Reaksiyonu Üzerine Etkisi (Üç Boyutlu Gösterim)

Şekil 4.9. ile 4.10 da sabit enzim miktarında substrat mol oranıyla, reaksiyon süresinin reaksiyon üzerindeki etkileri görülmektedir. Şekiller incelendiğinde sabit enzim miktarında en yüksek tepki değerinin 6 – 6,2 substrat mol oranıyla (LA:TP), 5 – 7,5 reaksiyon süresinde elde edildiği görülmektedir.



Şekil 4.9: Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Süre ve Mol Oranının Asidoliz Reaksiyonu Üzerine Etkisi



Şekil 4.10: Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Süre ve Mol Oranının Asidoliz Reaksiyonu Üzerine Etkisi (Üç Boyutlu Gösterim)

5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, tripalmitinden 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, tripalmitin ile laurik asitin 1,3-spesifik *Mucor miehei* orijinli Lipozyme IM ticari lipazı varlığında asidoliz reaksiyonu sistematik olarak incelenmiştir.

Deneyisel çalışmamızın birinci bölümünde, tripalmitinin laurik asit ile asidoliz reaksiyonunda, sabit sıcaklıkta (50 °C da), enzim miktarının, laurik asit:tripalmitin 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, tripalmitin: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 tripalmitine 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 tripalmitin: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 tripalmitin ve laurik asitleri karışımları kullanılmıştır. Ürün TAG lerindeki laurik asit yüzdesinin substratların mol oranı ile değişim eğrisinden, % 40-50 laurik asit içerikli ürünlerin

tripalmitin: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 tripalmitin: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 % 42 lere ulaştığını, 6 saatte maksimum % 46 değerine vardığını ve reaksiyon süresinin daha fazla arttırılmasıyla azalmaya başladığını göstermiştir. Bu verilerden, %42 nin 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 çalışma ile 1. ve 3. pozisyonlarında laurik asit 2. pozisyonunda palmitik asit içeren triačilgliserol yüksek oranda elde edilmiştir. Bilindiđi üzere anne sütünün % 30 unu palmitik asit oluşturur. Bunun % 70 i de 2. pozisyonda bulunmaktadır. Laurik asitte, anne sütünde bulunan, antimikrobiyal ve antivirütik özelliği bulunan orta zincirli bir yağ asididir. Bu çalışmada hem anne sütü benzeri, hem de düşük kalorili besinsel ve sağlıksal önemi olan bir ürün elde edilmiştir.

KAYNAKLAR:

- [1] **Fat Substitutes**, 2005, <http://216.185.112.2/presenter.jhtml?identifier=4633>
- [2] **Tsang, G. A look at Fat Substitutes**, 2005, <http://www.healthcastle.com/fat.shtml>
- [3] **Dietary fat**, 2005, <http://www.annecollins.com/dietary-fat/fat-substitutes-olestra.htm>
- [4] **Segal, M.**, 1990. Fat Substitutes: A Taste of the Future, <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/fats.html>
- [5] **Dunford, N. T.**, 2002. Utilisation of Biotechnology for the Development of Functional and Bioactive Lipid-Based Products, Business Briefing: Innovative Food Ingredients.
- [6] **Xu, X.**, 2000. Production of Specific-Structured triacylglycerols by Lipase-Catalysed Reactions: a Review, *Eur.J.Lipid Sci. Technol.*, 287-303.
- [7] **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.
- [8] **Kuo, M., T., Gardner, H., W.**, 2002. *Lipid Biotechnology*, Marcel Dekker Press, New York
- [9] **Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., Murata, A., Komemushi, S., Tominaga, Y.**, 2001. Use of Thermostable *Fusarium Heterosporum* Lipase for Production of Structured Lipid Containing Oleic and Palmitic Acids in Organic Solvent-Free System, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 78, 167-172.
- [10] **Yang, T., K., Frukilde, M., B., Xu, X., B.**, 2003. Applications of Immobilized *Thermomyces Lanuginosa* Lipase in Interesterification, *Journal of American Oil Chemists' Society*, 80, 881-887.

- [11] **Designer Lipids by Biotransformation Using Lipase from Papaya Latex**, 2005, <http://www.cisa.es/aliens/13thplm/abs/b66.htm>
- [12] **Chandler, I., C., Quinlan, P., T., McNeill, G., P.**, 1998. Lipase Catalyzed Synthesis of Chiral Triglycerides, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **75**, 1513-1518.
- [13] **Gandhi, N., N., Mukherjee, K., D.**, 2001. Reactivity of Medium Chain Substrates in the Interesterification of Tripalmitin Catalyzed by Papaya Latex, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **78**, 965-968.
- [14] **Mu, H., L., Hoy, C., E.**, 2002. Distribution of Medium-Chain FA in Different Lipid Classes After Administration of Specific Structured TAG in Rats, *Lipids*, **37**, 329-331
- [15] **Miura, S., Ogawa, A., Konishi, H.**, 1999. A Rapid Method for Enzymatic Synthesis and Purification of the Structured Triacylglycerol, 1, 3-dilauroyl-2-oleoyl-glycerol, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **76**, 927-931.
- [16] **Nieto, S., Sanhueza, J., Valenzuela, A.**, 1999. Synthesis of Structured Triacylglycerols Containing Medium-Chain and Long-Chain Fatty Acids by Interesterification with a Stereospecific Lipase from *Mucor Miehei*, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **50**, 199-202.
- [17] **Sellapsan, 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.
- [18] **Sellapsan, S., Akoh, C., C.**, 2002. Lipase Catalyzed Synthesis of Structured Lipids in Polar Solvents, *Journal of Food Lipids*, **9**, 239-246.
- [19] **Cornell, J. A.**, 1990. *How to Apply Response Surface Methodology*, Quality Press, Wisconsin, USA
- [20] **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

- [21] **Demirkol, S.**, 2004. Soya Yağının Enzimatik Alkolizi ile Yağ Asidi Metil Esterleri Üretiminin Optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [22] **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.
- [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] **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.
- [25] **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.
- [26] **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.
- [27] **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.
- [28] **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.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İstanbul’da doğdu. 1998 yılında Bahçelievler Lisesi’nden mezun oldu. Aynı yıl İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümüne girdi ve 2003 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2003 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programına başladı ve halen aynı programda öğrencidir.