

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENGEREK OTU (*ECHINUM VULGARE*) TOHUM YAĞI VE
ZEYTİNYAĞINDAN ENZİMATİK YÖNTEMLE FONKSİYONEL YAĞ
ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sena BİLGİÇ

Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği

Programı : Gıda Mühendisliği

HAZİRAN 2011

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENGEREK OTU (*ECHIMUM VULGARE*) TOHUM YAĞI VE
ZEYTİNYAĞINDAN ENZİMATİK YÖNTEMLE FONKSİYONEL YAĞ
ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Sena BİLGİÇ
(506081515)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 6 Mayıs 2011

Tezin Savunulduğu Tarih : 8 Haziran 2011

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK (İTÜ)

Diğer Jüri Üyeleri: Yrd. Doç. Dr. Dilara Nilüfer Erdil (İTÜ)

Yrd. Doç. Dr. Fatma Neşe Kök (İTÜ)

HAZİRAN 2011

Ailem'e

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, birikimleri ile beni yönlendiren tez hocam Yrd. Doç. Dr. Neşe Şahin Yeşilçubuk'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen ve tez çalışmamda da katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Necla Aran'a, çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Güldem Üstün ve Prof. Dr. Selma Türkay'a, laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Ar. Gör. Zeynep Tacer Caba, Ar. Gör. Celale Kırkın ve yüksek lisans sınıf arkadaşım Alev Yüksel başta olmak üzere İTÜ Gıda Mühendisliği'ndeki tüm hoca ve asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi beni tez çalışmam süresince de yalnız bırakmayan, maddi ve manevi her türlü desteğini esirgemeyen aileme ve özellikle bu tez kapsamında tohumların ayıklanmasında bana yardımcı olan babaannem Ayşe Bilgiç'e ve Merve İşlek'e çok teşekkür ederim. Ayrıca uzun çalışma saatlerinde bana yardımcı olan sözlüm Efkan Keleş'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız...

Mayıs 2011

Sena Bilgiç

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	ix
KISALTMALAR.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
ŞEKİL LİSTESİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZET	xv
SUMMARY.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Yapılandırılmış Yağlar	3
2.2 Zenginleştirilmiş Yağlar	5
2.1.1 Zenginleştirilmiş yağlar ile yapılan çalışmalar	6
2.3 Yapılandırılmış Yağların Üretim Yöntemleri.....	8
2.3.1 Kimyasal sentez.....	9
2.3.2 Enzimatik sentez.....	9
2.3.3 Mikrobiyal sentez	10
2.3.4 Genetik mühendisliği	10
2.4 Enzimatik Sentazde Kullanılan Lipaz Enzimleri	11
2.5 Lipaz Enzimlerinin Seçiciliği	12
2.5.1 Pozisyonel seçicilik	13
2.5.2 Stereoseçicilik	13
2.5.2 Substrat (yağ asidi) seçiciliği	13
2.6 Enzimatik Sentezlerde Lipazların Kullanımı.....	14
2.7 Yapılandırılmış Yağların Üretiminde Kullanılan Uzun Zincirli Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (UZ-ÇDYA)	17
2.7.1 Omega-3 yağ asitleri.....	18
2.7.2 Omega-6 yağ asitleri.....	19
2.7.3 Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin sağlık üzerine etkileri	19
2.8 Stearidonik Asit	21
2.8.1 Stearidonik asit kaynakları	22
2.9 Engerek Otu (<i>Echium Vulgare</i>)	25
2.9 Engerek Out Tohum Yağı ve Özellikleri.....	27
3. MATERYAL VE METOT	29
3.1 Malzeme	29
3.2 Yöntemler	29
3.2.1 <i>Echium vulgare</i> tohumlarının çıkarılması	30
3.2.2 <i>Echium vulgare</i> tohumlarından yağ eldesi	30
3.2.3 Substrat karakterizasyonu	31
3.2.4 <i>Echium vulgare</i> tohum yağından serbest yağ asitlerinin eldesi	32
3.2.5 Asidoliz reaksiyonu	32
3.2.6 Ürün analizi.....	32

3.2.7 Reaksiyon ürünlerinden serbest yağ asitlerinin uzaklaştırılması.....	35
3.2.8 Oksidatif stabilite indeksi analizi.....	36
3.2.9 Oksidasyon ürünlerinin belirlenmesi	36
3.2.10 İstatistiksel analiz.....	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1 Substratların Karakterizasyonu.....	39
4.2 Substratların Yağ Asidi Profili	39
4.3 Reaksiyon Koşullarının tepki Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu.....	41
4.3.1 Stearidonik asit katılımına reaksiyon koşullarının etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	41
4.3.2 Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması.....	44
4.3.3 Modelin doğrulanması ve gram ölçekte üretim.....	48
4.3.4 Oksidatif stabilite indeksi	50
4.3.5 Yağların oksidasyon ürünleri.....	53
5. SONUÇ	57
KAYNAKLAR.....	59

KISALTMALAR

AA	: Araşidonik Asit
ÇDYA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
DAG	: Diaçilgliserol
DGLA	: Di-Homo γ -Linolenik Asit
DHA	: Dokosahekzaenoik Asit
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
GD	: Genetiği Değiştirilmiş
GLA	: Gama-Linolenik Asit
GRAS	: Genel Olarak Güvenilir Olduğu Kabul Edilen
GSK	: Gaz Sıvı Kromatografisi
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
KLA	: Konjuge-Linolenik Asit
KO	: Kareler Ortalaması
KT	: Kareler Toplamı
KVR	: Kardiyovasküler Rahatsızlıklar
LA	: Linoleik Asit
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MAG	: Monoaçilgliserol
OZYA	: Orta Zincirli Yağ Asitleri
PA	: Palmitik Asit
PS	: Palm Stearin
RSM	: Response Surface Methodology
SD	: Serbestlik Derecesi
SDA	: Stearidonik Asit
SL	: Structured Lipid
SYA	: Serbest Yağ Asidi
TAG	: Triaçilgliserol
TOTOX	: Toplam Oksidasyon
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TYT	: Tepki Yüzey Yöntemi
UZ-ÇDYA	: Uzun Zincirli Çoklu Doymamış Yağ Asiti
YA	: Yağ Asidi
YAME	: Yağ Asidi Metil Esterleri
YY	: Yapılandırılmış Yağ

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Ticari yapılandırılmış yağların gıda ve tıbbi uygulamaları.....	4
Çizelge 2.2 : Çalışmalarda sentezlenen yapılandırılmış yağların üretiminde kullanılan yağ asitleri.....	4
Çizelge 2.3 : Seçilmiş bazı lipazların yağ asidi ve pozisyonel seçicilikleri	14
Çizelge 2.4 : Gruplara ayrılmış doymamış yağ asitleri	17
Çizelge 2.5 : Balık yağında bulunan çoklu doymamış yağ asitleriklenmesi için	23
Çizelge 2.6 : Echim türlerinin yağ miktarları	26
Çizelge 2.6 : Echim türlerinin yağ asidi profili.....	27
Çizelge 3.1 : Gaz kromatografisindeki analiz koşulları ve kolon özellikleri	32
Çizelge 3.2 : Merkezil Bileşik Deney Tasarımı için kullanılan değişkenler (faktörler) ve seviyeleri.....	34
Çizelge 4.1 : Engerek otu(<i>Echium vulgare</i>) tohum yağının yağının özellikleri	37
Çizelge 4.2 : Zeytinyağının özellikleri ve literatür ile karşılaştırılması	37
Çizelge 4.3 : Zeytinyağının sn-2 pozisyonundaki yağ asidi bileşimleri, yağ asidi kompozisyonu ve literatür değerleri.	38
Çizelge 4.4 : Engerek otu tohum yağının yağ asidi profili ve sn-2 pozisyonundaki yağ asidi kompozisyonu.....	38
Çizelge 4.5 : Tepki Yüzey Yöntemi ile geliştirilen deney tasarımı ve gözlenen tepkiler	39
Çizelge 4.6 : Modelin SDA katılımına ait regresyon katsayıları ve önem dereceleri	40
Çizelge 4.7 : SDA katılımı için ANOVA analiz sonuçları.....	41
Çizelge 4.8 : Lipozyme TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için Modde 9.0 (Umetrics, İsveç) programı ile elde edilen optimum koşullar.....	46
Çizelge 4.9 : Optimum koşullarda elde edilen YY'ninSDA içeriği.....	47
Çizelge 4.10 : Optimum koşullarda miligram ve gram düzeyinde üretilen YY'lerin yağ asidi ve sn-2 pozisyonundaki YA kompozisyonu (%mol).....	47
Çizelge 4.11 : Deneysel çalışmalarda kullanılan yağ kaynaklarının ve büyük ölçekte üretilen YY'nin indüksiyon süreleri	48

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Yapılandırılmış yağların genel yapısı; K, O ve U sırasıyla kısa, orta ve uzun zincirli yağ asitlerini göstermektedir.....	3
Şekil 2.2 : <i>sn</i> -1,3 spesifik lipaz tarafından katalizlenen, orta zincirli yağ asitleri içeren bir TAG ve uzun zincirli yağ asitleri içeren bir TAG arasında gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu (O: Orta zincirli yağ asidi (YA), U: Uzun zincirli YA).....	15
Şekil 2.3 : <i>sn</i> -1,3 spesifik lipaz tarafından katalizlenen, orta zincirli yağ asidi ile uzun zincirli yağ asitleri içeren bir TAG arasında gerçekleşen asidoliz reaksiyonu (O: Orta zincirli yağ asidi (YA), U: Uzun zincirli YA).....	5
Şekil 2.4 : Gliserol ve çoklu doymamış yağ asidi arasında (A) ve gliserol ile orta zincirli yağ asitleri içeren bir TAG arasında (B) gerçekleşen, <i>sn</i> -1,3 spesifik lipaz tarafından katalizlenen asidoliz reaksiyonları (O: Orta zincirli yağ asidi (YA), ÇDYA: Çoklu doymamış YA)	5
Şekil 2.5 : Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol	18
Şekil 2.6 : SDA'nın kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.7 : <i>Echium vulgare</i> bitkisi	25
Şekil 3.1 : Toplanan <i>Echium vulgare</i> bitkisi.....	28
Şekil 3.2 : <i>Echium vulgare</i> tohumlarının çıkarılma aşamaları.....	29
Şekil 4.1 : Reaksiyon sonuçları ile SDA katılımına ait modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki	42
Şekil 4.2 : SDA katılımının süre ve mol substrat oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	42
Şekil 4.3 : SDA katılımının süre ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği	43
Şekil 4.4 : SDA katılımının mol substrat oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	43
Şekil 4.5 : Yapılandırılmış yağın ve zeytinyağının 48 saat süre boyuncaki peroksit sayısındaki değişimi	52
Şekil 4.6 : Yapılandırılmış yağın ve zeytinyağının 48 saat süre içindeki p-anisidin değerlerindeki değişimi	54

ENGEREK OTU (*ECHIMUM VULGARE*) TOHUM YAĞI VE ZEYTİNYAĞINDAN ENZİMATİK YÖNTEMLE FONKSİYONEL YAĞ ÜRETİMİ

ÖZET

Son yıllarda sağlık üzerine yararlı etkileri bulunan, uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerini (ÇDYA) içeren yağlara olan talep artmaktadır. Bu yağ asitleri içinde en önemlileri omega-3 ve omega-6 yağ asitleridir. Söz konusu yağ asitleri açısından en zengin kaynaklar balık türleri ve çeşitli alglerdir. Ancak bu kaynakların gün geçtikçe sınırlı hale gelmesi nedeniyle omega-3 ve omega-6 yağ asitleri için alternatif kaynak arayışı üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Hayvansal kaynaklara alternatif olarak bu yağ asitleri bazı bitkilerde değişen oranlarda bulunabilmektedirler. Bitkisel kaynaklar arasında engerek otu (*Echium vulgare*) tohumu yağı α -linolenik (ALA, 18:3n-3), γ -linolenik asit (GLA, 18:3n-6) ve stearidonik asit (SDA, 18:4n-3) gibi uzun zincirli yağ asitlerini oldukça yüksek oranlarda içermektedir. Bu yağ asitleri içinde stearidonik asit, vücutta α -linolenik aside göre daha kolay ve daha yüksek oranlarda metabolize olarak eikozapentaenoik asit (EPA, 20:5n-3) ve dokosaheksaenoik aside (DHA, 22:5n-3) dönüşmektedir. Stearidonik asit reaksiyonlarda ara metabolit olması, vücutta EPA ve DHA'ya benzer etkiler göstermesi ve bazı eikosanoidlerin öncül molekülü olması nedeniyle sağlık açısından son derece önemlidir. Gama-linolenik asit ise linoleik asidin (LA, 18:2n-6) Δ 6-desaturaz ürünü olan omega-6 çoklu doymamış yağ asidi olup, oluştuktan sonra hızla di-homo γ -linolenik aside (DGLA, 20:3n-6) ve ardından da Δ 5-desaturaz enzimi ile araşidonik aside (AA, 20:4n-6) dönüşmektedir.

Engerek otu (*Echium vulgare*) Türkiye'de yaygın olarak bulunan ancak yeterince değerlendirilmeyen bir bitkidir. Akdeniz diyetinde önemli ve özel bir yere sahip olan zeytinyağının tüketimi ve üretimi ise ülkemizde son 15 yıl içerisinde artış göstermiştir. Zeytinyağı oleik asit gibi tekli doymamış yağ asitleri açısından zengin karakteristik bir yağ olmasına rağmen ÇDYA açısından yoksun bir yağdır.

Bu çalışmada, zeytinyağı ve engerek otu tohum yağı serbest yağ asitleri arasında gerçekleşen enzimatik asidoliz tepkimeleriyle ÇDYA ile zenginleştirilmiş yapılandırılmış yağların üretimi ve tepki-yüzey yöntemi (TYY) ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Optimizasyon için SDA katımlı tepki olarak seçilmiştir. Enzimatik asidoliz tepkimelerinde *Thermomyces lanuginosus*'dan elde edilen ve sn-1,3 spesifik bir lipaz enzimi olan Lipozyme® TL IM kullanılmıştır. Tepki-yüzey yönteminde seçilen farklı faktörlerin etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla, 5 seviyeli Merkezli Bileşik Deney Tasarımı (CCC) kullanılarak reaksiyon sıcaklığı (T, °C) [55-65 °C], reaksiyon süresi (t, saat) [6-9 saat] ve substrat mol oranı (Sr, yağ asitleri/triaçilgliserol, mol/mol) [4-6 mol/mol] bağımsız değişkenler (faktör) olarak seçilmiştir. Reaksiyonlar sonucunda seçilen tepki [stearidonik asit miktarı (%)] için, başarılı bir kuadratik model elde edilmiştir.

Modelden elde edilen veriler ışığında optimum koşullar sıcaklığın 55°C, reaksiyon süresinin 8,4 saat ve substrat mol oranının 6 mol/mol olduğu koşul olarak tespit

edilmiştir. Bu koşullarda model doğruluğu da test edilmiştir. Buna ek olarak, belirlenen optimum koşulda gram düzeyinde üretim gerçekleştirilerek elde edilen YY'nin karakterizasyonu yapılmıştır. Optimum koşullarda miligram ve gram düzeyinde üretilen YY'nin içerdiği SDA miktarı sırasıyla %4,90 ve %4,86 olarak bulunmuştur.

Ayrıca, miligram ve gram düzeyinde elde edilen YY'lerin sn-2 pozisyonunda en yüksek miktarda oleik asidin bulunduğu, SDA miktarının yaklaşık %6 oranında bulunduğu görülmektedir. Gram düzeyinde üretilen YY'nin oksidatif stabilite analizinde indüksiyon süresi 0,3 saat olarak belirlenmiştir. Yağların oksidasyon ürünlerinin belirlenmesi analizlerinde zeytinyağının başlangıç ve 48 saat süre sonundaki peroksit sayısı sırasıyla 4 aktif oksijen/kg yağ ve 18,1 aktif oksijen/kg yağ olarak bulunmuştur. Aynı şekilde gram düzeyinde üretilen YY'nin başlangıç ve 48 saat süre sonundaki peroksit sayısı sırasıyla 8 aktif oksijen/kg yağ ve 34 aktif oksijen/kg yağ olarak tespit edilmiştir. İkincil oksidasyon ürünlerinin ifade edildiği *p*-anisidin değerleri ise zeytinyağında başlangıç ve 48 saat süre sonunda sırasıyla 4,1/g ve 9,3/g olarak tespit edilmiştir. Gram düzeyinde üretilen YY'de ise bu değerler sırasıyla 6/g ve 18,3/ g olarak bulunmuştur. Peroksit sayısı ve *p*-anisidin değerinin toplamı olan TOTOX değeri ise tüm analiz süresince YY'de zeytinyağına oranla daha yüksek olarak hesaplanmıştır. Yapılan analizlerin ışığında YY'nin oksidatif stabilitesinin zeytinyağına göre daha düşük olduğu bu sebeple oksidatif stabilitenin artırılması için çeşitli doğal antioksidan ilaveleri yapılabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışma ile elde edilen YY'nin sağlık üzerine olumlu etkileri bilinen SDA'nın yanı sıra ALA gibi omega-3 ve LA ve GLA gibi omega-6 yağ asitlerince zenginleştirilmesi sonucunda yağ asitleri açısından daha dengeli fonksiyonel bir yağ elde edilmiştir. Elde edilen yağın doğrudan tüketimi veya salata sosu, mayonez, margarin, vb. çeşitli fonksiyonel ürünlerin bileşiminde değerli bir bileşen olarak kullanımı mümkün görülmektedir. Ayrıca, biyoteknolojik yöntemler kullanılarak katma değeri yüksek ve sağlığa yararlılığı artırılmış fonksiyonel yağların ticari ölçekte üretilmelerinin gerek ekonomimiz gerekse insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemli katkılarının olacağı düşünülmektedir.

ENZYMATIC PRODUCTION OF FUNCTIONAL LIPID FROM OLIVE OIL AND SEED OIL OF *ECHIMUM VULGARE*

SUMMARY

Demand of polyunsaturated fatty acids (PUFA) has increased during the recent years. Among these fatty acids, the most important ones are omega-3 and omega-6 fatty acids. Fish species and algae are rich sources of these fatty acids. Intense experimental researches are done to find alternative sources of omega-3 and omega-6 fatty acids due to decreasing sources. Alternatively to animal sources, these fatty acids can be found in various amounts in some plant sources. Seed oil of *Echium vulgare* which is one of these plant sources highly contains PUFA's like; α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3), γ -linolenic acid (GLA, 18:3n-6) and stearidonic acid (SDA, 18:4n-3). Among these fatty acids, SDA is converted rapidly and in high amounts into eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:5n-3) according to ALA.

Stearidonic acid is very important since it is an intermediate fatty acid in the reactions and shows similar health effects like EPA and DHA and also it is a precursor of some eicosanoids. Gamma-linolenic acid, the immediate $\Delta 6$ -desaturase product of linoleic acid (LA, 18:2n-6) is an essential omega-6 polyunsaturated fatty acid. After its formation GLA is rapidly elongated to di-homo γ -linolenic acid (DGLA, 20:3n-6) and subsequently $\Delta 5$ -desaturated to arachidonic acid (20:4n-6).

Echium vulgare is widely found throughout Turkey but it is not a plant that is used sufficiently. Production and consumption of olive oil which has a very important and very special role in the Mediterranean diet has increased in the last fifteen years. Even though olive oil is a rich source of monounsaturated fatty acids such as oleic acid, it is lacking in PUFAs.

In this study, production of structured lipids (SLs) enriched with PUFA by enzymatic acidolysis reactions between olive oil and fatty acids of *Echium vulgare* seed oil and also optimization of reaction conditions via response surface methodology (RSM) were aimed. SDA was selected as a response for the optimization of reaction conditions. Lipozyme® TL IM, sn-1,3 specific lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*, was used in the enzymatic acidolysis reactions. Circumscribed central composite (CCC) design with five levels was used to investigate the effects of chosen factors in RSM, and the chosen variables (factors) were: reaction temperature (T, °C) [55-65 °C], reaction time (t, hour) [6-9 hour] and substrate molar ratio (Sr, free fatty acids/triacylglycerol, mol/mol) [4-6 mol/mol]. Good quadratic model was obtained for chosen response [amount of stearidonic acid (%)] after the reactions. After the investigation of contour plots, optimal conditions were determined as 55°C of reaction temperature with 8.4 hours of reaction time and 6 mol/mol of substrate molar ratio. Further experiments were done at these optimal conditions in order to verify the models. In addition, the optimal conditions were used for gram-scale and pilot-scale synthesis and the structured lipid was characterized. SDA contents of the final structured lipid in gram scale and pilot scale were 4.90% and 4.86% ,

respectively. In addition to this, SDA content at sn-2 position of SL with gram scale and pilot scale were both approximately 6%. Besides, the induction time of the final structured lipid obtained from large scale production was determined as 0,3 by oxidative stability experiments. Initial and after 48 hours accelerated oxidation period peroxide values of olive oil were 4 meq/kg oil and 18.1 meq/kg oil in the analyses of oxidation products of oils, respectively. Similarly, Initial and after 48 hours accelerated oxidation period peroxide values of SL, produced at the gram scale, 8 meq/kg oil and 34 meq/kg oil. The p-anisidine assay is used to quantify the secondary oxidation compounds present in oils as a means to determine the past history of the oil. Initial and after 48 hours accelerated oxidation period p-anisidine value were 4.1/g ve 9.3/g, respectively. These values of SL produce at gram scale were 6/g ve 18,3/g, respectively. The TOTOX value is a combination of the peroxide value and p-anisidine value normally used to determine the total oxidative stability of the oil. The SL had higher TOTOX values than the olive oil throughout oxidation period. As a result of the whole oxidation analyses, SL had lower oxidation stability than olive oil. For that reason, it is recommended that natural antioxidants could be added to SL in order to increase the oxidation stability. By obtaining a structured lipid (SL) enriched with SDA which has positive impact on health, and with omega-3 fatty acids like LA and with omega-6 fatty acids like GLA, functional oil which is more balanced with fatty acids was obtained in this study. Direct consumption or use of these SLs in some functional foods such as margarines, salad dressings and mayonnaise as a valuable constituent is seen possible. Furthermore, production of these structured lipids at industrial scale is expected to have important and beneficial contribution to our country's economy as well as to human nutrition and health.

1. GİRİŞ

Yapılandırılmış yağlar (YY) genel anlamda gliserol molekülünün doğal haldeki yağ asitlerinin pozisyonu değiştirilmiş veya uzun zincirli çoklu doymamış (UZ-ÇDYA) veya orta zincirli yağ asitlerinin spesifik olarak yerleştirilmesi suretiyle yağ asidi profili değiştirilmiş veya yeni triağılglycerol (TAG) eldesi için sentezlenmiş TAG'lar olarak tanımlanmaktadır. Yağların yağ asidi kompozisyonlarının değiştirilerek, özelliklerinin ve besinsel değerlerinin artırılması ve yeni uygulamalar için geliştirilmiş yapılandırılmış yağların eldesi, günümüzde sıklıkla çalışılan konular arasında yer almaktadır. YY'ler kolesterolü düşürmek, bağışıklık sistemini güçlendirmek, beyin gelişimini olumlu yönde etkilemek ve kullanım açısından da fonksiyonelliği artırmak gibi amaçlarla doğal yağların veya yağ asitlerinin modifiye edilmesi veya yeniden yapılandırılmasıyla sentezlenmektedirler. Doğal TAG'lardan hidrojenasyon, interesterifikasyon, esterifikasyon, fraksinasyon, karıştırma ve genetik yolla modifiye edilerek veya sentetik olarak üretilebilen ayrıca katı veya sıvı olarak bulunan yapılandırılmış yağlar günümüzde “Yeni jenerasyon yağlar” olarak isimlendirilmektedir. Enzimatik interesterifikasyon reaksiyonları kullanılarak kakao yağı ikameleri, anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağlar, modifiye balık yağı ürünleri, kısmi açılgliseroller, margarin yağları ve çeşitli lipit ürünlerinin üretimi mümkün olabilmektedir. Son yıllarda YY'ler arasında insan sağlığına yararlı etkileri olan yağ asitleri içeren YY'ler daha fazla ön plana çıkmaktadır.

ÇDYA'nın diyet ile dışarıdan alınması insan vücudu açısından son derece önemlidir. ÇDYA'nın diyetle yer alması kardiyovasküler rahatsızlıkların (KVR) oluşum riskini azaltmakta ayrıca inflamasyon önleyici faktörler gibi hareket etmektedir. Aynı şekilde, obezite, tip 2 diyabet gibi metabolik sendromların hastalık derecesine doğru ilerleyen semptomlarını azalttığı belirlenmiştir. Bu yağ asitleri içinde en önemlileri omega-3 ve omega-6 yağ asitleridir. Söz konusu yağ asitleri açısından en zengin kaynaklar balık ve alglerdir. Ancak bu kaynakların gün geçtikçe sınırlı hale gelmesi nedeniyle alternatif kaynak arayışı üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Mevcut esansiyel yağ asidi kaynaklarına alternatif arayışı içinde farklı bitkilerin yağ asidi

profilleri incelenmekte ve yeni bitkiler zengin yağ içerikleri ile önem kazanmaktadır. Bu kaynaklardan birisi, engerek otu (*Echium vulgare*) tohum yağı olup, *Echium vulgare* yüksek α -linolenik asit (ALA, 18:3n-3), stearidonik asit (SDA, 18:4n-3), ve GLA (18:3n-6) içeriği bakımından diğer *Echium* türleri arasında öne çıkmaktadır. *Echium vulgare* % 10-12 arasında SDA, %10-12 civarında GLA ve % 30-40 oranında ALA içermektedir. SDA, ALA'nın eikosapentaenoik asit (EPA, 20:5n-3) ve dokosahekzaenoik asite (DHA, 22:6n-3) dönüşmesinde ilk metabolitidir ve ALA'ya kıyasla SDA'nın vücuttaki EPA değerini daha fazla yükselttiği belirtilmiştir. SDA'yı yüksek oranda içeren engerek otu (*Echium vulgare*) ülkemizde doğal olarak yetişmektedir ancak yağ üretimi için değerlendirilmemektedir.

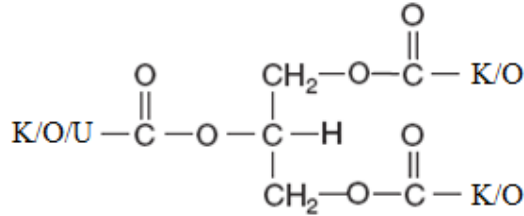
Ülkemiz açısından önemli bir yağ olan ve içermiş olduğu tokoferol, fenolik maddeler ve fitosteroller gibi pek çok biyoaktif bileşenler nedeniyle de sağlığa olumlu etkilerinin bulunduğu, özellikle kalp ve damar hastalıkları ve kanser oluşum riskini azalttığı bilinen zeytinyağı ÇDYA açısından yoksun bir yağdır.

Bu çalışma sayesinde ülkemizde ve dünyada yaygın olarak bulunan fakat yeterince yararlanılmayan bir bitki olan engerek otu (*Echium vulgare*) tohumundan yağ eldesi ve biyoteknolojik yöntemlerle engerek otu tohum yağı ve zeytinyağı kullanılarak katma değeri yüksek fonksiyonel bir yağ üretilmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmada, zeytinyağı ve engerek otu (*Echium vulgare*) tohum yağından elde edilen yağ asitleri arasında sn-1,3 spesifik lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimeleri ile başta stearidonik asit olmak üzere diğer omega-3 ve omega-6 çoklu doymamış yağ asitlerince zengin yapılandırılmış yağ eldesi amaçlanmıştır. Ayrıca stearidonik asit katılımına substrat mol oranı, süre ve sıcaklığın etkisinin araştırılması ve optimum koşulların saptanarak reaksiyon koşullarının modellenmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Yapılandırılmış Yağlar

Yapılandırılmış yağlar (YY), gliserol molekülüne UZ-ÇDYA veya orta zincirli yağ asitlerinin (OZYA) spesifik olarak yerleştirilmesi suretiyle gliserol molekülünün TAG veya yeni TAG eldesi için sentezlenen TAG'lar olarak tanımlanmaktadır (Akoh, 2005; Lai ve diğ., 2005; Osborn ve Akoh, 2002; Şahin Yeşilçubuk ve Karaali, 2008). Şekil 2.1'de yapılandırılmış yağların genel yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.1: Yapılandırılmış yağların genel yapısı (U: Uzun Zincirli YA, O: Orta Zincirli YA, K: Kısa Zincirli YA) (Akoh ve diğ., 2002).

YY'ler kimyasal veya enzimatik metotlarla üretilebilmektedir. Enzimatik interifikasyon spesifik bölgelerde istenilen yağ asitlerini bulunduran YY'lerin üretimini sağlamakta, buna karşın kimyasal prosesler rast gele YY'ler üretmektedir. YY'ler kısa, orta ve uzun zincirli yağ asitleri gibi çeşitli yağ asitleri karışımını içeren gliserol kısımları esterleşmiş TAG'lardır (Lee ve Lee, 2005). Bu sebeple YY'ler içermiş olduğu her bir yağ asidinin erime, sindirim, absorplama, metabolizma gibi özelliklerini içerebilmektedir. Bu özellikleri gıda, ilaç ve beslenme amaçlı uygulama alanlarını arttırmaktadır (Lee ve Lee, 2005).

YY'lerin hastalıkları önleme, tedavi etme ve beslenme bozukluklarına yardımcı olma özellikleri gibi medikal ve sağlık faydaları olması sebebiyle bu yağlar nutrasötik ve fonksiyonel gıdalar olarak ifade edilmektedirler (Lee ve Lee, 2005). Ticari yapılandırılmış yağ örnekleri ile gıda ve medikal alanlarındaki uygulamaları Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1: Ticari yapılandırılmış yağların gıda ve tıbbi uygulamaları (Lee ve Lee, 2005).

Marka	Yağ Asidi Bileşenleri	Uygulama Alanı	Üretici Firma
Benefat	C18:0 (yüksek miktar) ve C2:0, C4:0 veya C6:0	Kalorisi azaltılmış fırıncılık ürünleri, çikolata kaplamaları	Cultor Food Science Inc.
Betapol	C16:0 (%45)	Bebek formülleri	Loders Crocklaan
Bohenin	C18:1 ve C22:0	Çikolata ve çikolata kaplama üretiminde temperleme yardımcısı ve köpük önleyici ajan	Fuji Oil Company Ltd.
Captex	C8:0/C10:0 (%60)ve C12:0 (%30) ya da C8:0/C10:0 (%40) ve C18:2 (%40)	Farmasötikler ve kozmetik endüstrisi	Abitec Corp.
Caprenin	C8:0, C10:0 ve C22:0	Şekerleme kaplama yağı	Procter & Gamble
Impact	Yüksek-laurik asit yağı ve yüksek linoleik asit yağı ile interesterifikasyon	Travma ya da ameliyat, sepsi ya da kanser hastaları için farmasötikler	Novartis Nutrition Corp.
Laurical	C12:0 (%40) ve doymamış yağ (C18:1, C18:2 ve C18:3)	Tıbbi besin ürünleri, şekerleme kaplamaları, kahve beyazlatıcıları, dolgu yağları	Calgene Inc.
Neobee	C8:0, C10:0 ve ÇDYA (n-6 ve n-3)	Tıbbi ve besinsel içecekler	Stepan Corp.
Structo-lipid	Uzun zincirli TAG (%63) ve orta zincirli TAG (%37)	Parenteral beslenme ve hastalar için hızlı enerji kaynağı	Fresenius Kabi

Zenginleştirilmiş YY'lerin laboratuvar koşullarında üretimi kanola yağı, pirinç kepeği yağı, zeytinyağı, balık yağı, mısır yağı, aspir yağı, , fındık yağı, ayçiçeği yağı, pamuk tohumu yağı, OZTAG, triolein, trikaprin ve trikaprilin gibi farklı yağlarda bulunan fonksiyonel yağ asitleri ile gerçekleştirmiştir (Can ve Özçelik, 2005; Lee ve Lee, 2005; Osborn ve Akoh, 2002). Çizelge 2.2'de çalışmalarda sentezlenen YY'lerin üretiminde kullanılan yağlar ve yağ asitleri verilmektedir.

Çizelge 2.2: Çalışmalarda sentezlenen yapılandırılmış yağların üretiminde kullanılan yağ asitleri (Lee ve Lee, 2005).

Yağ	Yağ asitleri
Kanola yağı	Kaprilik asit, Stearik asit
Hidistancevizi yağı	Laurik asit
Mısır yağı	Konjuge linoleik asit
Pamuk tohumu yağı	Laurik asit
Menhaden yağı	KLA, γ -linolenik asit
Zeytinyağı	Kaprilik asit
Palm yağı	KLA, n-3 yağ asitleri
Palm olein	Laurik asit
Perilla yağı	Kaprilik asit
Pirinç kepeği yağı	Kaprik asit
Soya yağı	KLA, laurik asit
Zeytinyağı	Kısmi hidrojenize palm yağı
Palm yağı	Hidrojenize soya yağı
Ayçiçek yağı	KLA
Ton balığı yağı	Kaprilik asit

Fonksiyonel yağ asitlerinin kullanımı yararlı etkilere sahiptir. Lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen asidoliz reaksiyonları orijinal yağın yağ asidi kompozisyonunu, TAG yapısını, viskozitesini, hidrofobitesini, minör bileşik miktarını ve diğer fizikokimyasal özelliklerini değiştirmektedir. Örneğin, zeytinyağından elde edilen YY orijinal zeytinyağına göre daha koyu renkli olup, daha yüksek viskoziteye ve daha düşük erime noktasına sahiptir. Bu şekilde yeni olarak sentezlenen TAG'lar erime noktasını değiştirmektedir. Bu değişiklikler yağ sanayinin pazarlama stratejilerini de değiştirmektedir. Ayrıca YY'ler içecekler ya da margarinlerde kullanıldığında, YY'lerin besin ve duyuşal özellikleri orijinal yağlara göre daha iyi olmaktadır. YY'lerin oksidatif stabiliteleri ise orijinal yağlara göre daha düşük olmaktadır. Bu sebeple YY'lerin korunması için antioksidanların eklenmesi gerekmektedir (Lee ve Lee, 2005).

2.2 Zenginleştirilmiş Yağlar

Yağlar, insan sağlığı açısından faydaları bulunan bazı önemli yağ asitleri ile enzimatik yöntemler kullanılarak zenginleştirilip daha sağlıklı ve fonksiyonel hale getirilebilmektedir. Zenginleştirilmiş yağlarda bulunan EPA, DHA, konjuge linoleik asit (KLA), SDA gibi yağ asitleri gliserol molekülünde sağlık açısından daha etkili olması amacıyla spesifik pozisyonlara yerleştirilebilmektedir (Osborn ve Akoh, 2002). Zenginleştirilmiş yağlar genelde ayçiçek yağı, soya yağı, palm yağı, zeytinyağı gibi çeşitli bitkisel yağlar ve 1,3-spesifik lipazlar kullanılarak orta zincirli yağ asitlerinin asidoliziyle üretilebilmektedirler (Akoh, 2002; Hoy ve Xu, 2001; Osborne ve Akoh, 2002). Zenginleştirilmiş yağlar sağlamış oldukları ÇDYA ile insan sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. ÇDYA'nın diyetle yer alması kardiyovasküler rahatsızlıkların (KVR) oluşum riskini azaltmakta ayrıca inflamasyon önleyici faktörler gibi davranmaktadır (Ruiz-Lo'pez, ve diğ., 2009). Aynı şekilde, obezite, tip 2 diyabet gibi metabolik sendromların hastalık derecesine doğru ilerleyen semptomlarını azalttığı belirlenmiştir (Ruiz-Lo'pez, ve diğ., 2009).

Omega-3 yağ asitleri ile zenginleştirilmiş YY'lerin tüketimi, insanlarda birçok sağlık sorununu önlemede etkindir. Günümüzde insanların beslenme alışkanlıklarındaki farklılıklar sonucu omega-6 çoklu doymamış yağ asitleri tüketimi artarken, omega-3 doymamış yağ asitleri tüketimi azalmaktadır. Bu sebepten dolayı omega-3 yağ asitleri ile zenginleştirilmiş YY'lerin üretimi de artmaktadır (Şahin ve Karaali,

2002). Yapılan bir çalışmada balık yağı ve orta zincirli triaçilgliserol (OZ-TAG) ile elde edilen fonksiyonel yağ uzun zincirli triaçilgliseroller (UZ-TAG) ile karşılaştırıldığında farelerde tümör protein sentezini yavaşlattığı ve tümör büyümesini azalttığı tespit edilmiştir (Akoh, 2002).

Yapılan diğer bir çalışmada OZYA'nın bir dizi metabolik rahatsızlık sonucu meydana gelen metabolik sendrom diye adlandırılan obezite, disilipidemi, hipertansiyon, gizli şeker rahatsızlıkları üzerine etkisi araştırılmıştır. Metabolik sendromun çok karmaşık olmasına ve halen tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, diyetle birlikte alınan yağların metabolik sendromun gelişimine katkıda bulunan bir faktör olduğu bilinmektedir. Çalışma sonucunda OZYA'nın yağ depolanmasını baskıladığı ve yağ oksidasyonunu engellediği belirlenmiştir. Ayrıca tip 2 diyabet ve insülin hassaslığı bulunan hastaların iyileşmesinde rol oynadığı belirtilmiştir (Nagao ve Yanagita, 2010). Yapılandırılmış ticari yağlara örnek olarak Japonya, ABD ve Avrupa ülkelerinde yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitlerini içeren “Enova Oil” ve “Lorenzo`s Oil” yağları verilebilir. Bu yağlar yüksek (%20-65) oleik, (%15-65) linoleik ve (<%15) linolenik asit içeriğine sahip olup, soya ve kanola yağından enzimatik prosesler sonucunda üretilmiştir ve kızartma, pişirme ve salata yağı olarak kullanılmaktadır (Akoh, 2005).

2.2.1 Zenginleştirilmiş yağlar ile ilgili yapılan çalışmalar

Literatürde zenginleştirilmiş yağlar ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda omega-3, omega-6 çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleşmiş yağlar elde edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca bazı çalışmalarda bu yağ asitlerinin spesifik pozisyonda bulunması üzerine çalışılmıştır. Senanayeke ve Shahidi'nin (1999) yapmış olduğu çalışmada alg yağından elde edilen DHA boraj yağına ilave edilmiştir. Çalışmada *Candida antarctica*'dan elde edilen Novozym 35 enzimi ve hekzan kullanılarak asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 55°C'de, enzim miktarı toplam substratın % 27,4'ü olarak alındığında ve 24 saat süre sonunda maksimum DHA inkorporasyonu (% 27,4 ± 0,10) gerçekleşmiştir. Aynı koşullarda sn-2 pozisyonundaki DHA oranı ise % 28,51 (± 0,50) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen yağın aynı molekülde istenen oranlarda fonksiyonel yağ asitlerini içermesi sebebiyle kullanışlı bir yağ olduğu sonucuna varılmıştır. Başka bir çalışmada palm çekirdeği yağı ve palm olein karışımına (50:

50 hacim/hacim) boraj yağından elde edilen GLA ve LA katılımı, Lipozym® RM IM enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda maksimum inkorporasyon oranı GLA için % 33, LA için 9,4 olarak bulunmuştur. Maksimum inkorporasyonu gerçekleştirdiği koşullar 75 °C, substrat mol oranı 4,5 ve 17 saat süre sonunda elde edilmiştir. Çalışmada Lipozyme® RM IM varlığında GLA'nın LA'ya göre inkorporasyonu yüksek substrat oranından fazla etkilenmediği sonucuna varılmıştır. Ayrıca enzimin etkinliğinin sıcaklığa bağımlı olduğu tespit edilmiştir (Lumor ve Akoh, 2005).

Can ve Özçelik'in (2005) yapmış olduğu çalışmada fındık yağı ve menhaden yağ konsantresi 1:1 oranında karıştırılarak Novazyme 435 enzimi varlığında asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilerek optimum ÇDYA inkorporasyonu için deney koşulları belirlenmiştir. Optimizasyon sonucunda belirlenen koşullar 37,5 °C ve 36 sa. olarak belirlenmiştir. Bu şartlar altındaki ÇDYA inkorporasyonu % 21,5 olarak belirlenmiştir. Senanayake ve Shahidi'nin (2007) yapmış olduğu çalışmada ise fok balığı yağına *Mucor miehei*'den elde edilen Lipozyme® IM enzimi kullanılarak laurik asit (C 12:0) eklenerek modifiye bir yağ elde edilmeye çalışılmıştır. Laurik asit anne sütü yağında bulunan ve insan vücudunda monolaurine dönüşerek antiviral ve antibiyotik özellik gösteren ve enerji verici bir yağ asididir. Çalışma sonucunda 40 °C'de, 1:3 (fok balığı yağı: laurik asit) substrat mol oranında, 24 saat süre sonunda % 29,7 (±0,92) oranında maksimum laurik asit inkorporasyonu gerçekleşmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen yapılandırılmış yağ laurik asit içeriğiyle çabuk enerji verebilen ayrıca EPA ve DHA içeriğiyle esansiyel yağ asitleri sağlayan bir yağ olarak tanımlanmıştır. Diğer bir çalışmada dengeli bir omega-3/ omega-6 yağ asiti konsantrasyonuna sahip yapılandırılmış yağ elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışmada keten tohumu yağından elde edilen ALA yerfıstığı yağına *Rhizomucor miehei*'den elde edilen Lipozyme® IM enzimi kullanılarak, hekzan varlığında 1:1 omega-3/omega-6 mol oranına sahip yapılandırılmış bir yağ elde edilmiştir. İstenen özellikteki yapılandırılmış yağ eldesi için optimum reaksiyon koşulları % 3,75 enzim konsantrasyonu, 37,5 °C sıcaklık, 30,81 saat, ağırlıkça keten tohumu yağ asidi/ yerfıstığı yağı oranı 1,16 olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda omega-6 yağ asidi (C 18:2) oranı 19,21 (±1,0); omega-3 yağ asidi (C18:3) oranı 20,71 (±1,4) olarak tespit edilmiştir (Sharma, Rastogi ve Lokesh, 2009).

Jimenez ve diğ.'nin (2010) yapmış olduğu çalışmada sn-2 pozisyonunda palmitik asit (PA) açısından zengin triağılglicerol üretimi sn-2 pozisyonunda % 12,8 oranında PA bulunan palm stearin (PS) kullanılarak elde edilmiştir. Asidoliz reaksiyonu palm stearin ve PA oranı yüksek serbest yağ asitleri (SYA) (ticari PA ve PS ekstrakte elde edilen PA) arasında gerçekleşmiştir. Çalışmada solvent kullanılmadan ve düşük sıcaklıklar kullanılarak optimum koşullar elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda *Alcaligenes sp.*'den elde edilen QLC (kizelgurda immobilize olmuş) lipazı kullanılarak 65 °C'de, 3:1 SYA/PS mol oranında, solvent kullanılmayarak, 24 saat süre sonunda ve 0,75 gr. lipaz kullanılarak optimum inkorporasyon elde edilmiştir. Optimum koşullarda elde edilen yapılandırılmış yağda % 80 oranında PA elde edilmiştir. Sn-2 pozisyonundaki PA oranı da % 80 oranında bulunmuştur. Elde edilen TAG % 65-70 oranında PA içeren anne sütü yağına benzemektedir. Ayrıca sn-2 pozisyonundaki yüksek PA içeriği sebebiyle emilimi yüksek olabilmektedir.

Branco de Araújo ve diğ.'nin (2011) yapmış olduğu çalışmada soya yağı ile Brezilya sardalya yağından elde edilen SYA'lar, *Rhizomucor miehei*'den elde edilen Lipozyme® RM IM enzimi varlığında solventsiz ortamda asidoliz reaksiyonu ile yapılandırılmış yağ elde edilmiştir. En uygun omega-6/omega-3 yağ asidi oranı, sardalya SYA: soya yağı mol oranı 3:1 olduğunda, 12 saat süre sonunda, 40 °C'de substrat toplamının %10'u kadar enzim kullanıldığında elde edilmiştir. Bu şartlarda soya yağına EPA ve DHA katılımı % 9,2 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen YY aynı TAG yapısında EPA ve DHA içermesi sebebiyle modifiye olmamış soya yağına göre daha yüksek besin değerine sahip olduğu belirtilmiştir.

2.3 Yapılandırılmış Yağların Üretim Yöntemleri

YY'ler yaygın olarak kimyasal ve enzimatik yöntemler gibi yöntemlerle üretilmektedir. Bu yöntemlerden kimyasal sentezin, düşük maliyete ve uygulama kolaylığı gibi avantajları olmasına rağmen spesifik bir yöntem değildir. Bu yöntemin dezavantajı son ürünlerdeki yağ asidi dağılımının kontrolüne imkan vermemesinden kaynaklanmaktadır. Diğer bir yöntem olan enzimatik reaksiyonlar ise daha spesifik olmakla birlikte, daha ılımlı koşullarda gerçekleştirilebilir. Enzimatik yöntemler, kimyasal sentez ile üretilmeyen YY'lerin üretilmesini sağlaması sebebiyle uygulanan yöntemler arasında öncelik sağlamaktadır (Osborn ve Akoh, 2002). Bu yöntemlerin yanı sıra YY'lerin üretilmesinde mikrobiyal sentez ve genetik

mühendisliğinin çalışmaları sonucunda oluşan yöntemler kullanılabilir (Akoh ve Kim, 2008).

2.3.1 Kimyasal sentez

Kimyasal sentez ile YY eldesinde genellikle OZ-TAG'lar ve UZ-TAG'lardan oluşan karışım kullanılmakta ve bu karışımın hidrolizi gerçekleşmektedir. Ayrıca orta ve uzun zincirli yağ asitlerinin rastgele karışımının ardından transesterifikasyon ile reesterifikasyonu reaksiyonları gerçekleştirerek YY üretimi gerçekleşmektedir. Alkali metaller veya alkali metal alkalitleri tarafından katalizlen kimyasal sentezde reaksiyon koşulları yüksek sıcaklık ve susuz ortam koşullarını sağlamalıdır. Kimyasal transesterifikasyonun dezavantajları rastgele dağılmış TAG molekülleri oluşması, istenmeyen bazı ürünlerin oluşması ve sentezde kullanılan yağ asitlerinin pozisyonel spesifitesinin gerçekleşmemesi olarak sıralanabilir. Bu olay YY'lerin metabolizmasında anahtar faktördür (Akoh ve Kim, 2008; Osborn ve Akoh, 2002). Kimyasal esterifikasyonla oluşturulmuş ticari YY'lere örnek olarak "caprenin", "benefat/salatrim" örnek olarak verilebilmektedir. Capreninin gliserol kısmındaki C8:0, C10:0, ve C22:0 yağ asitleri esterleşmiştir. Hindistancevizi yağının, palm çekirdeği yağının ve kolza yağının kimyasal esterifikasyonundan oluşmaktadır (Akoh ve Kim, 2008).

Procter & Gamble firmasının ürettiği Caprenin'in, şeker barları gibi yumuşak şekerlemelerde ve meyve, fındık, kurabiye vb ürünlerin kaplanmasında kullanımı için FDA'dan (Food and Drug Administration) GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsü alınmıştır. Caprenin ile ilgili yapılmış bir çalışmada erkek bireylerin diyetleri 6 gün boyunca caprenin içermiş ve çalışmanın sonucunda bireylerin plazma kolesterol konsantrasyonunda değişiklik gözlenmemiş olup, HDL kolesterolün %14 oranında düştüğü belirtilmiştir (Akoh ve Kim, 2008).

2.3.2 Enzimatik sentez

"Yeşil kimya" ve doğal proseslerdeki yeni yaklaşım, doğal olarak bulunan bileşenlerin kullanımının çevre ve sağlık kaygıları sebebiyle arttırılmasıdır. YY'lerin enzimatik sentezinde lipazlar kullanılmaktadır. Lipazlar hidrolitik reaksiyonları iyi gerçekleştirebilme yeteneğine sahiptir. Ancak düşük su içeriğinde ve substratın suda çözünürlüğünün düşük olduğu durumlarda ortamda kullanılan organik çözümler

reaksiyonun gerçekleşmesine yardımcı olmaktadır. Bunun yanı sıra istenen özellikte YY'lerin eldesinde lipaz çeşitleri önemli rol oynamaktadır (Akoh ve diğ., 2002). Lipazlar ılımlı ortam koşullarında yüksek aktivite göstermekte ve substratlarına karşı seçicilik ve spesifiklik göstermektedir. Enzimatik asidoliz reaksiyonları ile YY üretilirken TAG'lar üzerinde istenilen pozisyonlara getirilebilmekte, ancak kimyasal reaksiyonlarda bu durum gerçekleşmemektedir. Ayrıca lipaz katalizörlüğündeki reaksiyonlarda kimyasal interesterifikasyonlarda oluşan yan ürünler de oluşmamaktadır (Carrin ve Crapiste, 2008).

2.3.3 Mikrobiyal sentez

Bazı hassas ve değerli yağların üretiminde mikroorganizmalar kullanılarak biyoreaktörlerde fermantasyon yoluyla üretilmektedir. Bu yöntemle üretilen yağlar hayvansal kaynaklardan üretilen yağlara göre daha basit bir kompozisyona sahip olmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin mikrobiyal yolla elde edilmesinde *Mortiella isabellina*, *Mortiellaalpina* ve *Cryptocodonium* gibi türlerin kullanıldığı birçok çalışmada belirtilmiştir (Gunstone, 2001).

2.3.4 Genetik mühendisliği

Yağlar genellikle fonksiyonel yağ asidi ve/veya triaçilgliserol profiline sahip bitkisel kaynakların ticari üretimi ile elde edilmektedir. Amerika ve Avrupa'nın çeşitli bölgelerinde bu şekilde çalışmalar yapılmaktadır. Ancak bu çalışmalar uzun yıllar gerektirmektedir. Ayrıca bazı türler dışında yüksek yapılı bitkiler UZ- ÇDYA üretme kapasitesinden yoksundur. Bitkilerdeki LA ve ALA gibi yağ asitlerinin AA ve EPA gibi UZ-ÇDYA'ya dönüşmesi enzimatik reaksiyonlar (desaturasyon ve açıl -CoA uzaması gibi) sonucu meydana gelir. Günümüzde gen teknolojisinin ilerlemesi ile bu yöntem kullanılarak bazı bitki tohumlarında UZ-ÇDYA üretilmesi ve depolanması üzerine son 15 yılda çalışmalar yapılmaktadır. UZ-ÇDYA'nın transgenik bitkilerden elde edilme olasılığı yağlı tohumlarda $\Delta 6$ desaturaz geninin düzenlenmesi ile SDA ve GLA miktarının artırılması için yapılan ilk girişimlerde açıklığa kavuşturulmuştur. Yapılan çalışmalarda UZ-ÇDYA'nın bitkilerde depolanması % 40 gibi yüksek oranlara çıkarılabilmektedir. Bu tip genetik modifikasyon prosedürleri kolza tohumu, soya fasulyesi ve diğer yağlı tohumlara uygulanabilmektedir. Yağlı tohumlarda özellikle UZ-ÇDYA'ların spesifik oranlarda elde edilmesi, bitkisel kaynakların özellikle balık yağına alternatif bir ürün olmasını sağlamaktadır. Bunun

yanı sıra, tüketicilerin genetiği değiştirilmiş ürünlere olan antipatisi bu yöntemin yaygınlaşmasında karşılaşılan en büyük problemdir (Gunstone, 2001; Venegas-Caleron ve diğ., 2010). Keten tohumu yağı ile ilgili yapılan bir çalışmada *Primula vialii*'dan elde edilen $\Delta 6$ -desaturaz kullanılarak SDA içeriği yüksek transgenik bir keten tohumu elde edilmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda transgenik keten tohumunun SDA içeriği % 13,4 olarak elde edilmiştir (Ruiz-Lopez ve diğ., 2009).

Lipaz enzimlerinin enzimatik esterifikasyonunu kimyasal esterifikasyondan farklı kılan başlıca avantajı enzim seçiciliğidir. Başlıca üç tür lipaz seçiciliği vardır, bunlar pozisyonel seçicilik, yağ asidi seçiciliği ve stereoseçiciliktir. Pozisyonel seçicilik ve yağ asidi seçiciliği, genellikle, sentetik TAG moleküllerinin kısmi hidrolizi ve ince tabaka kromatografisi ile ayrılması sonrasında ürünlerin ekstraksiyonu ve analizi ile belirlenmektedir. Diğer metotlar ise hidroliz süresince üretilen yağ asitlerinin gaz kromatografisi analizi için metil esterlere dönüştürülmesini içermektedir (Willis ve Marangoni, 2007).

2.4 Enzimatik Sentezde Kullanılan Lipaz Enzimleri

Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açıl hidrolaz) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bunun dışında esterifikasyon, transesterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizlemektedir. Lipazlar hayvansal, bitkisel ve doğal veya genetik olarak iyileştirilmiş mikroorganizmalardan elde edilebilir. Bunların arasından, kolay üretilmesi ve pek çok hidrolitik ve sentetik reaksiyonu katalizlemesinden dolayı en fazla kullanım alanına sahip olanı mikrobiyal kaynaklı lipazlardır. Lipaz tarafından katalizlenmiş olan reaksiyonlar doğal metabolik reaksiyonlara benzemesinden dolayı kimyasal reaksiyonlara oranla daha çevre dostu olarak tanımlanırlar. Düşük aktivasyon enerjileri sebebiyle lipazların katalizlediği reaksiyonlar daha düşük sıcaklık ve nötral pH'larda gerçekleşmektedir. Ayrıca reaksiyonların enerji gereksinimi düşüktür ve lipazların ürün ve substratlara karşı aktiviteleri çok yüksektir. Bu aktivite özellikleri sayesinde hem polar hem de polar olmayan ortamlarda kararlı olan ve aynı zamanda heterojen reaksiyon sistemlerinde yağ-su ara yüzeyinde aktif olan biyokatalizördürler (Paiva ve diğ., 2000; Marangoni, 2002). Lipazların katalizlediği reaksiyonlar ile kakao yağı ikameleri, düşük kalorili yağlar, anne sütü yağına benzer yapılandırılmış

triaçilgliseroller, margarin yağları, kısmi açilgliseroller, modifiye balık yağı ürünleri ve çeşitli lipid ürünleri üretilmektedir (Xu, 2000).

Enzimleri kimyasal reaksiyonlardan ayıran en önemli özellikleri seçicilikleridir. Lipazların seçicilik özelliği ise enzimin moleküler özellikleri, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından kontrol edilir. Lipazların yağ asidi seçiciliği, tıbbi amaçlı gıdalar için yağ üretimi ve yağın besin değerini arttırmak için yağ asitleri ile zenginleştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Lipazların spesifikliğı pozisyon, substrat (yağ asidi) ve stereoseçicilik olarak üç temel grupta toplanmaktadır (Akoh ve diğ., 2002; Hou, 2002; Paiva ve diğ., 2000).

2.5 Lipaz Enzimlerinin Seçiciliğı

Lipaz enzimlerinin seçiciliğinden yağların sağlığa faydalı olan yağ asitleri ile zenginleştirilmesinde yararlanılmaktadır Lipazların bu özelliğı interesterifikasyon reaksiyonlarında kimyasal katalistlere göre büyük üstünlük sağlamaktadır (Marangoni, 2002). Lipazların seçiciliğı gliserol yapısına istenen yağ asitlerinin bulunmasını sağlamakta veya istenen yağ asitlerinin spesifik pozisyonlarından ayrılmasını sağlayarak yağ asitlerinin konsantrasyonuna yardımcı olmaktadır. Sn-2 pozisyonunda uzun zincirli yağ asidinin yerleştirilmesi bu yağ asidinin emilimini artırmakta ve dolayısıyla bu yağ asidinden vücut tarafından daha fazla yararlanılmaktadır. Yapılan çalışmalara göre balık yağının EPA ve DHA içeriğı *Pseudomonas* lipazı kullanıldığında %80 ve %90 oranında arttırılabilmektedir. Lipazların çoğı spesifik olmayan veya sn -1,3 spesifik enzimleridir. Sn-1,3 spesifik lipazlar sn-2 pozisyonundaki yağ asitlerinin tutulmasını sağlarken sn-1,3 pozisyonundaki yağ asitlerini değıştirirler. Lipazların seçiciliğı reaksiyon türüne ve şartlarına göre değışmektedir. Yulaf tohumu lipazı gibi bazı lipazlar sn-3 pozisyonundaki yağ asitlerinin hidrolizinde sn-1 ve sn-2 pozisyonlarına göre çok daha seçici olup bu pozisyonu çok daha hızlı hidrolize etmektedir. *Candida parapsilosis* sn-2 pozisyonuna göre daha az seçicidir. Lipaz enzimlerinin “pozisyonel seçiciliğı”, “substrat (yağ asidi) seçiciliğı” ve “stereoseçiciliğı” gibi üç çeşit seçiciliğı mevcuttur (Akoh ve diğ., 2002).

2.5.1 Pozisyonel seçicilik

Pozisyonel seçicilik, lipaz enzimlerinin TAG molekülünün sn-1,3 pozisyonlarındaki ester bağlarına olan seçiciliği şeklindedir. Bu durum, sterik engellemeden ötürü lipazların TAG molekülünün sn-2 pozisyonuna etki edememesinden kaynaklanmaktadır. Sterik engelleme sn-2 pozisyonunda yer alan yağ asidinin lipaz enziminin aktif bölgesine girmesini önlemektedir. 1,3- spesifik lipazların kullanıldığı bir interesterifikasyon reaksiyonunda ilk olarak TAG, 1,2- ve 2,3-diaçilgliseroller (DAG), ve serbest yağ asitlerinin olduğu bir karışım üretilmektedir. Uzun süreli reaksiyonlardan sonra ise açıl göçü ve TAG molekülünün orta pozisyonunda yer alan yağ asitlerinin rastgele dağılımına izin veren 1,3-DAG oluşumu gerçekleşebilmektedir. *Aspergillus niger*, *M. miehei*, *Rhizopus arrhizus*, ve *Rhizopus delemar* lipazları sn-1,3 pozisyonlarına spesifik lipazlara örnektir (Willis ve Marangoni, 2007).

2.5.2 Stereoseçicilik

Triaçilgliserollerde, sn-1 ve sn-3 pozisyonları sterik olarak farklıdır. Çok az lipaz sn-1 ve sn-3 pozisyonlarındaki başlıca esterleri ayırdedebilir. Stereoseçici lipazların kullanıldığı reaksiyonlarda, sn-1 ve sn-3 pozisyonları farklı hızlarda hidrolizlenir. Stereoseçicilik lipaz kaynağı ve açıl gruplar ile belirlenir ve ara yüzeydeki yağ yoğunluğuna da bağlı olabilir. Ayrıca substrat konsantrasyonundaki artış da sterik engelden dolayı seçiciliği azaltabilmektedir. Öte yandan, zincir uzunluğundaki farklılıklar lipazların seçiciliğini etkilemektedir. Örneğin, *Pseudomonas* ve domuz pankreatik lipazları, sadece belirli açıl gruplarını hidroliz ederek stereoseçicilik göstermektedir (Maragani, 2002).

2.5.3 Substrat (Yağ Asidi) Seçiciliği

Lipazlar belirli yağ asitlerine, ya da daha genel olarak, bir yağ asidi sınıfına karşı seçici olabilirler. Bu tür lipazlar seçici olduğu yağ asitlerinin gliserit esterlerini hidrolize ederler (Paiva ve diğ., 2000). Lipazlar ayrıca yağ asidi uzunluğuna karşı da seçicilik göstermekte, uzun, kısa veya orta zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerine karşı seçici olabilmektedir. Yağ asidi seçiciliği gösteren lipazlardan olan *Penicillium roquefortii* lipazı ve prematür bebeklerdeki gastrik lipazı kısa zincirli yağ asidine karşı seçici olan lipazlardır. Ayrıca *G. candidum* lipazı ise *cis*-9-doymamış yağ

asidine karşı seçicilik özelliği olan bir lipazdır (Hou, 2002). Domuz pankreatik lipazı kısa zincirli yağ asitlerine karşı seçici iken, *Penicillium cyclopium* ise uzun zincirli yağ asitlerine seçici davranmaktadır. Ayrıca, *A. niger* ve *Aspergillus delemar* lipazları ise hem orta hem de kısa zincirli yağ asitlerine karşı seçicidir. Lipazların yağ asidi seçiciliği, tıbbi gıdalar için yapılandırılmış yağ üretmek, ve yağların besinsel özelliklerini geliştirmek amacıyla spesifik yağ asitleri ile zenginleştirmek için kullanılmaktadır. Bazı lipazların sahip olduğu yağ asidi seçiciliği kısa zincirli yağ asitlerinin süt aroması olarak kullanılmak üzere üretiminde ve balık yağlarının EPA ve DHA gibi yağ asitlerince konsantrasyonunun arttırılmasında ticari ölçekte kullanılmaktadır (Maragoni, 2002; Willis ve Marangoni, 2007). Yapılandırılmış yağların üretiminde kullanılan bazı lipazların substrat ve pozisyonel (regio) seçicilikleri Çizelge 2.3’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.3: Seçilmiş bazı lipazların yağ asidi ve pozisyonel seçicikleri (Yeşilçubuk, 2007).

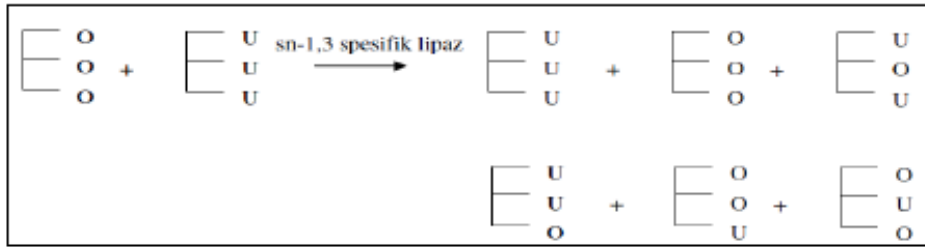
Lipaz Kaynağı	Yağ Asidi Seçiciliği	Pozisyonel Seçicilik (sn)
Mikroorganizmalar		
<i>Aspergillus niger</i>	K, O, U	1, 3>>2
<i>Rhizomucor miehei</i>	K>O, U	1, 3>>2
<i>Penicillium roqueforti</i>	K, O >>2	1,3
<i>Pseudomonas sp</i>	K, O, U	1, 3>2
Bitkiler		
Kolza (<i>Brassica napus</i>)	K>O, U	1, 3>2
Papaya (<i>Carica papaya</i>)		
Hayvansal dokular		3
Domuz pankreası	K>O, U	

Substrat mol oranının seçimi aynı zamanda saflaştırma maliyeti ve serbest yağ asitlerinin ya da açıl vericilerin buharlaştırma ve/veya distilasyon ile ayrılması ile de ilişkilidir. Bu nedenle, uygun bir substrat mol oranı seçmek gerekmektedir (Yang ve diğ., 2003a).

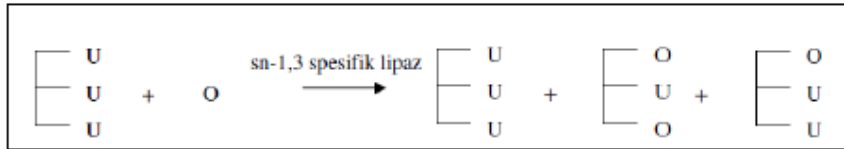
2.6 Enzimatik Sentezlerde Lipazların Kullanımı

Doğal kaynakların kullanıldığı prosesler, çevresel ve sağlıksal kaygılardan ötürü günümüzde oldukça tercih edilmektedir. Yapılandırılmış yağların enzimatik sentezi ile lipit modifikasyonu giderek önem kazanan bir konudur. Oldukça ılımlı reaksiyon koşullarında gerçekleşen enzimatik interesterifikasyon, kimyasal interesterifikasyona göre daha az çevresel kirliliğe yol açmaktadır. Transesterifikasyon, asidoliz ve

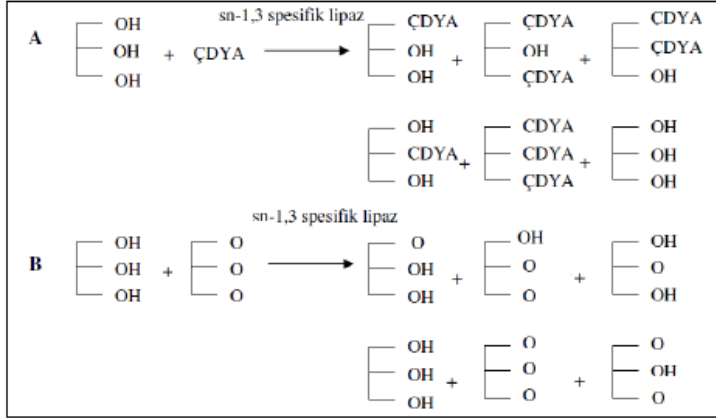
alkoliz reaksiyonları gibi interesterifikasyon reaksiyonları ticari olarak tercih edilen reaksiyonlardır (Bornscheuer ve diğ., 2003). YY'lerin üretiminde lipaz kullanılarak üretilmesinde birçok metot bulunmaktadır. Metotların seçimi kullanılacak olan substratın çeşidine ve üretilmek istenen YY'nin özelliklerine göre seçilmektedir. Transesterifikasyon açıl gruplarının iki ester arasındaki değişimi ile gerçekleşirken, asidoliz bir açıl grubunun, bir asit ve bir ester arasındaki transferi şeklinde gerçekleşmektedir. Alkoliz ise bir alkol ve bir ester arasında gerçekleşen esterleşme reaksiyonudur (Marangoni, 2002). Aşağıda yer alan Şekil 2.2, Şekil 2.3 ve Şekil 2.4'de sırasıyla transesterifikasyon, asidoliz ve alkoliz reaksiyonları gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Orta zincirli yağ asitlerini içeren TAG ile uzun zincirli yağ asitlerini içeren TAG arasındaki sn-1,3 seçici lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonları (U: Uzun Zincirli Yağ Asidi, O: Orta Zincirli Yağ Asidi) (Marangoni, 2002).



Şekil 2.3: Uzun zincirli yağ asitlerini içeren TAG ile orta zincirli yağ asidi arasındaki sn-1,3 seçici lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen asidoliz reaksiyonları (U: Uzun Zincirli Yağ Asidi, O: Orta Zincirli Yağ Asidi) (Marangoni,2002).



Şekil 2.4: (A) Gliserol ve çoklu doymamış yağ asidi arasında (B) Gliserol ve orta zincirli yağ asidi içeren TAG arasında sn-1,3 seçici lipaz katalizörülüğünde gerçekleşen alkoliz reaksiyonu (ÇDYA: Çoklu Doymamış Yağ Asidi, O: Orta Zincirli Yağ Asidi) (Marangoni, 2002).

Lipaz kullanılarak gerçekleştirilen interesterifikasyon reaksiyonlarını sıcaklık, süre ve substrat mol oranı reaksiyonun verimliliğini etkilemektedir. Lipaz aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden birisi de sıcaklıktır. Genellikle, artan sıcaklık miktarı interesterifikasyon hızını da arttırmakta; ancak çok yüksek sıcaklıklarda, enzim denatürasyonu nedeniyle reaksiyon hızı azalmaktadır. Reaksiyon sıcaklığını arttırmak açıl katılımını arttırabilir, ancak bu katılım aşırı açıl göçüne sebep olabilmektedir (Yang ve diğ., 2005). Açıl göçü, lipazların kullanıldığı asidoliz reaksiyonlarının sıkça rastlanan yan reaksiyonları olarak tanımlanmaktadır. Açıl göçüne ortamda bulunan diaçilgliserollerin (DAG) varlığının neden olduğu belirtilmektedir (Yang ve diğ., 2003b). Diğer bir ifadeyle açıl göçü sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında bulunan yağ asitlerinin sn-2 pozisyonuna göç etmesi olarak ifade edilmektedir (Yang ve diğ., 2003a; Foresti ve Ferreira, 2010).

Enzimatik reaksiyonlardaki diğer bir parametre ise süredir. Yüksek katılım oranını sağlamak ve üretim masraflarını minimize etmek için gerekli olan en kısa reaksiyon süresini belirlemek önemlidir (Senanayake ve Shahidi, 1999). Çünkü uzun reaksiyon süreleri, açıl göçünü de beraberinde getirmektedir (Jennings ve Akoh, 1999). Bu nedenle, açıl göçünün en düşük oranda gerçekleşmesi için genellikle reaksiyon süreleri kısaltılmaktadır (Marangoni, 2002). Substrat mol oranı ise reaksiyon koşulları arasında belirlenmesi gereken bir diğer parametredir. Yüksek substrat mol oranı, ekonomik açıdan maliyeti arttırması sebebiyle dezavantaj sağlamaktadır.

Ayrıca aşırı substrat mol oranı reaksiyon dengesini ürün yönünde ilerleterek açıl katılımlarını arttıracaktır (Yang ve diğ., 2003a). Bazı lipazlar için, açıl verici olan serbest yağ asitlerinin yüksek konsantrasyonda olmasının asidoliz reaksiyonlarındaki lipaz aktivitesinde bir düşüşe neden olabileceği bildirilmiştir. Buna sebep olarak asidoliz reaksiyonlarında ortamda bulunacak olan fazla miktardaki serbest yağ asitleri nedeniyle lipaz enzimlerinin katalitik bölgesinde bulunan kapağın (“lid”) açılması gösterilebilir. Bu durum, bazı lipazların asidoliz reaksiyonlarındaki düşük aktivite göstermesini açıklamaktadır (Yang ve diğ., 2003b).

2.7 Yapılandırılmış Yağların Üretiminde Kullanılan Uzun Zincirli Çoklu Doymamış Yağ Asitleri (UZ-ÇDYA)

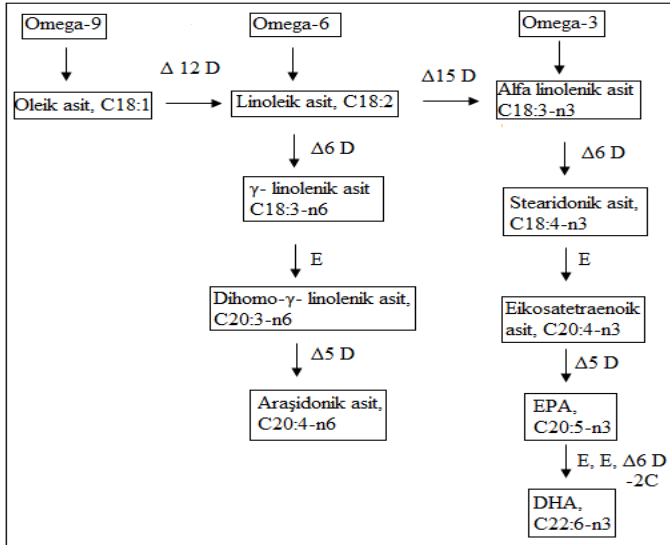
Çoklu doymamış yağ asitlerinden omega-3 ve omega-6 ailesi üyesi yağ asitlerinin tüketimi son derecede önemlidir. Yapılandırılmış yağların sentezinde çeşitli yağ asitleri kullanılmaktadır. Spesifik yağ asitlerinin tüm özelliklerinden yararlanılarak istenilen amaca yönelik yapılandırılmış yağlar tüketilebilmektedir. YY’lerde bulunan yağ asitlerinin TAG molekülündeki yeri YY’nin fonksiyonel ve fiziksel özelliklerini, metabolizmasını ve sağlık üzerindeki yararlarını belirlemektedir. (Akoh ve Kim, 2008). Çizelge 2.4’de çoklu doymamış yağ asitlerinin yaygın ismi, gösterimi ve sistematik ismi verilmektedir.

Çizelge 2.4: Gruplara ayrılmış doymamış yağ asitleri (Lobb ve Chow, 2008).

Grup	Sistematik İsim	Gösterim	Yaygın İsim
Omega-3	9,12,15 Octadecatrienoic	18:3(n-3)	α - linolenik
	6,9,12,15-Octadecatetraenoik	18:4(n-3)	Stearidonik veya moroktik
	5,8,11,14,17-Eikosapentaenoik	20:5(n-3)	
	4,7,10,13,16,19-Dokosahekzaenoik	22:6(n-3)	
	6,9,12,15,18,21-Tetrakosahekzanenoik	24:6(n-3)	Nisinik
Omega-6	9,12-Octadecadienoik	18:2(n-6)	Linoleik
	6,9,12-Octadekatenoik	18:3(n-6)	γ - linolenik
	8,11,14-Eikosatrienoik	20:3(n-6)	Dihomo- γ -linolenik
	5,8,11,14- Eikosatetraenoic	20:4(n-6)	Araşidonik
	7,10,13,16-Dokosatetraenoik	22:4(n-6)	Adrenik

2.7.1 Omega- 3 yağ asitleri

Omega- 3 yağ asitleri, iki ya da daha fazla çift bağ içeren, 18 veya daha fazla sayıdaki karbon atomundan oluşan bir yapıya sahiptir. Başlıca önemli omega-3 yağ asitleri arasında α -linolenik asit (ALA, C18:3n-3), stearidonik asit (SDA, C18:4n-3), eikosapentaenoik asit (EPA, C20:5n-3) ve dokosahekzaenoik asit (DHA, C22:5n-3) yer almaktadır (Gebauer ve diğ., 2005). ALA, bitkilerde oleik asitten $\Delta 12$ ve $\Delta 15$ desaturaz enzimi ile oluşmaktadır. Linoleik asit, araşidonik asit ve diğer omega-6 açıl türlerinin üretilmesinde öncü metabolit olarak yer almaktadır. Bitki yapraklarında bol miktarda bulunmasına rağmen tohum yağlarında az miktarda bulunmaktadır. ALA hayvansal dokularda omega-3 yağ asidi üretiminin metabolik öncüsü olarak rol almaktadır (Watkins ve German, 2002). Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol Şekil 2.4 'de görülmektedir.



Şekil 2.5: Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol (Scrimgeour ve Harwood, 2007).

Şekil 2.5'de görüleceği gibi, ALA vücutta EPA ve DHA'ya metabolize olmaktadır. ALA, EPA ve DHA'nın vücutta çeşitli hücrel farklılaşmayı ve büyümeyi etkileyen genlerin ekspresyonunu etkiledikleri; gen transkripsiyonu esnasında sinyal iletiminde görev aldıkları; eikosanoid adı verilen ve birçok hücrel fonksiyonu etkileyen metabolitleri oluşturdukları bilinmektedir (Gebauer ve diğ., 2005). ALA eksikliğinde büyüme geriliği, pullu dermatit, cilt geçirgenliğinin artması, karaciğer yağlanması, böbrek hasarları ve üreme bozuklukları gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca,

yeni doğan, çocuk ve yetişkinler için omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin alınması önerilen günlük alım miktarı 0,5-1,6 g arasındadır (Chapkin, 2008).

2.7.2 Omega- 6 yağ asitleri

Omega-6 yağ asitleri grubundan LA (18:2n-6), ALA ile birlikte bitkilerde çoklu doymamış yağ asidi üretiminde birincil metabolittir. Tohum yağları LA bakımından oldukça zengindir (Watkins ve German, 2002). Soya, mısır ve ayçiçek yağında %50 oranında, küspe yağında ise %70'den fazladır (Scrimgeour ve Harwood, 2007). Yeni doğan, çocuk ve yetişkinler için omega-6 çoklu doymamış yağ asitlerinin alınması önerilen günlük alım miktarı 4,4-17 g arasındadır (Chapkin, 2008). ALA ve LA vücutta sentezlenemeyen, bu nedenle diyetle alınması gereken yağ asitleridir. Bu yağ asitleri “esansiyel yağ asitleri” olarak isimlendirilmektedir. Şekil 2.6'dan da görüleceği üzere, LA vücutta araşidonik aside (AA) metabolize olmaktadır (Chapkin, 2008; Gebauer ve diğ., 2005). Gama-linolenik asit (GLA) (18:3n-6) bir diğer önemli omega-6 yağ asitlerindendir. Sağlıklı vücutta GLA, LA'nın Δ6-desaturazla oluşturduğu ürünü olup, vücutta oluştuktan sonra hızla dihomogama-linolenik aside (DGLA, 20:3n-6) dönüşmektedir. Vücut GLA'yı iltihapla savaşabilen ve kanamayı azaltan eikosanoidleri üretmek için kullanmaktadır. GLA diyabet, kardiyovasküler rahatsızlıklar, egzama, yüksek tansiyon, kanser, sikleroz, şizofreni, osteoporoz, cilt hastalıkları, alerji, enflamatuvar hastalıklar ve romatit artrit gibi rahatsızlıklarda olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir (Senanayake ve Shahidi, 1999; Clough, 2001; Lumor ve Akoh, 2005).

Günümüzde γ-linolenik asitin (GLA) besin ve tıbbi açıdan değerinin anlaşılması; bu asitin kaynaklarından saflaştırılması, zenginleştirilmesi üzerine olan çalışmaları hızlandırmıştır. Bu amaçla; GLA içeren yağlara, değişik yöntemler uygulanarak GLA'ca zengin ürünler elde edilmeye çalışılmaktadır (Akova ve Üstün; 2002).

2.7.3 Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin sağlık üzerine etkileri

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre omega-3 ve omega-6 ÇDYA'nın kalp damar rahatsızlıkları, diyabet, bağışıklık sistemi rahatsızlıklarına ve büyüme ve gelişme üzerine olan olumlu etkileri ispatlanmıştır. Omega-3 yağ asitlerinin romatit artrit, astım, sedef hastalığı ve olası ağır depresyon gibi enflamatuvar bozukluklarına etkisi belirlenmiştir (Coupland, 2008). Bu gelişmeler ışığında Amerikan Kalp Vakfı'nın

tavsiyesine göre günlük doymamış yağ asidi oranının 300 mg olması gerektiği belirtilmektedir. Kalp rahatsızlığı belirlenmiş kişilerde ise bu oran günlük 1 g olarak önerilmiştir (Coupland, 2008).

Koroner kalp hastalıklarının oluşumunda ilk basamak, damarda plak oluşumudur. Bu plaklar, plazma kolesterolünün artması, “yüksek yoğunluklu lipoprotein”lerin (HDL) azalması, “düşük yoğunluklu lipoprotein”lerin (LDL) artması sonucu oluşmaktadır (Karupaiah ve diğ., 2005). Omega-3 yağ asitleri EPA’ya dönüşerek kan basıncı ile ilgili fizyolojik bazı fonksiyonları düzenlemektedirler. Damarsal tepki, tuz su dengesi, renin salımı ve kan reolojisi gibi özellikler bu yağ asitlerinin vücuda alımı ile düzenlenmektedir. EPA ve DHA aritmiyi (düzensiz kalp atışı) engelleyerek, plazma trigliseritlerini, tansiyonu düşürerek ve trombosit agregasyonunu düşürerek, damarsal aktiviteyi geliştirerek ve inflamasyonu (iltihaplanma) azaltarak kardiyovasküler rahatsızlıklara yararlı etki gösterebilmektedir (Breslow, 2006; Sacks and Katan, 2002; Geleijnse ve diğ., 2002; Harris ve diğ., 2008; Park, 2007). Yapılan çalışmalara göre omega-3 tüketen orta yaş grubu insanlarda kalp damar hastalıklarının görülme oranlarında ve kalp hastalıkları nedeniyle ölüm oranlarında azalma tespit edildiği bildirilmektedir. (Ackman, 2008; Kelley ve Vemuri, 2008; Chapkin, 2008; Gebauer ve diğ., 2005).

Diyabet hastalığında ise hormonlardaki bozukluk sebebiyle yağ asidi metabolizması değişmektedir ve sonucunda dislipidemi (kan yağı oranlarının ozulması) ortaya çıkmaktadır. Ayrıca çoklu doymamış yağ asitlerinin sentezinde etkin olan desaturaz enziminin üretimi de azalmaktadır (Bhathena, 2008). Omega-3 yağ asitleri; plazma trigliseritlerini ve LDL miktarını azaltma ve HDL miktarını artırma özelliğine sahiptir. Bu özelliklerinden ötürü diyabet hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır (Bhathena, 2008; Kahveci, 2005). Yapılan çalışmalar EPA ve DHA’nın kalp ve damar hastalıkları ile obezitenin yanısıra tip 2 diyabet hastalığını önlemede rol oynadığını göstermektedir (Venegas-Caleron ve diğ., 2010; Nettleton ve Katz, 2005). Buna rağmen diyabetli hastalarda lipid metabolizmasının düzenlenmesi için kullanılan fazla miktarda balık yağı insulin ve karbonhidrat dengesini bozucu etkisi sebebiyle dikkatli kullanılmalıdır (Bhathena, 2008; Kahveci, 2005).

Omega-3 ve omega-6 yağ asitleri insanların normal beyin ve retina gelişimleri için önemli rol oynamakta ve beyindeki yapısal yağlarda en yaygın bulunan bileşen olmaktadır. Fetüsün ihtiyacı olan omega-3 ve omega-6 yağ asitleri, anne karnında

plasenta yoluyla sağlanmakta olup yeterli miktarda omega-3 ve omega-6 yağ asidi tüketmeyen annelerin bebeklerinde neonatal (doğumdan sonraki ilk dört hafta) gelişim ve baş çevresi büyüklüğü beklenen seviyelerin altında kalmaktadır. ALA'nın ürünü olan DHA beyin gelişimi için gerekliyken, LA'nın ürünü olan AA neonatal büyüme için gereklidir (Hamosh, 2008). Omega-3 serisinden olan DHA retina ve beyin hücrelerinde yüksek oranda bulunmakta olup, DHA'nın hücre membranı fonksiyonları, sinir sisteminin gelişimi, fotoreseptör farklılaşması, görme pigmenti olan rodopsinin aktivasyonu, oksidatif strese karşı korunma, çeşitli enzimlerin aktivasyonu ve iyon kanallarının fonksiyonu üzerine önemli etkilerinin bulunduğu bildirilmektedir (Lapillonne ve Jensen, 2009; Brenna ve diğ., 2009). ÇDYA ile yapılan çalışmalarda tüketilen omega-3 ve omega-6 yağ asitleri oranının bu yağ asitlerinin sağlığa etkisi üzerinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Omega-3 yağ asitlerinden ALA vücutta EPA ya dönüşerek eikosanoidlerin öncül metaboliti olurlar. Aynı şekilde omega-6 yağ asitlerinden LA vücutta uğradığı reaksiyonlar sonucu eikasanoidlerin bir diğer öncü metaboliti olan AA'ya dönüşür. Omega-6 yağ asitlerinin vücuda fazla alınması AA asitin artmasına ve dolayısıyla AA'dan meydana gelen prostaglantinler, tromboksanlar ve lökotrienler gibi eikasanoidlerin vücutta fazla miktarda üretilmesine neden olmaktadır. Bu maddelerin vücutta çoğalması damar içinde kanın pıhtılaşmasına, alerjik problemlere ve inflamatuvar rahatsızlıklara neden olmaktadır. Ayrıca, kanın damar içinde pıhtılaşması ile çeşitli KVR oluşumunu tetiklemektedir. Bu sebeple omega-6/ omega-3 ÇDYA'nın tüketim oranı son derece önemlidir. Yapılan çeşitli bilimsel çalışmaların sonucunda bu oranın 1-4 (omega-6/ omega-3) arasında olması tavsiye edilmektedir (Gomez Candela, Bermejo Lopez, Loria Kohen, 2011; Simopoulos, 2006).

2.8 Stearidonik Asit

Stearidonik asit (SDA) (all-cis-6,9,12,15-oktadekatetraenoik asit) (C18:4n-3) omega-3 ailesine ait çoklu doymamış bir yağ asididir. Yapısında 18 karbon atomu ve 4 çift bağ bulunmaktadır (Gustone, 2001). SDA, EPA ve DHA'nın metabolik biyosentezinde ALA $\Delta 6$ desaturaz enzimi vasıtasıyla oluşan ara metabolittir. İlk olarak 1960'larda bitkilerde varlığı tespit edilmiş olan SDA'nın günümüzde önemi giderek artmaktadır (Coupland, 2008). Şekil 2.6'da stearidonik asidin kimyasal yapısı gösterilmektedir.

çalışmaya göre SDA'nın balık yağına alternatif bir kaynak olduğu ve kardiyovasküler rahatsızlıklar üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Mevcut epidemiyolojik ve deneysel çalışmaların sonucunda SDA'nın göğüs, kolon ve prostat kanseri riskini azalttığını göstermektedir (Gebauer ve diğ., 2005). Yapılan bir başka çalışmada kanser hücrelerinin oleik asit, ALA ve SDA inkorporasyonu ve hücrelerdeki metabolik aktivite incelenmiştir. NIH-3T3 olarak adlandırılan kanser hücreleri 4 günlük periyot sonunda ALA karşısında az miktarda artış göstermiş ancak SDA varlığında yoğun bir şekilde inhibisyona uğramıştır (Guil-Guerrero, 2007).

Yapılan çalışmalarda kronik iltihaplanmanın önlenmesinde EPA'nın büyük önemi olduğu ispatlanmıştır (Camuesco ve diğ., 2006). SDA'nın vücutta EPA'ya dönüşerek iltihaplanmalara sebep olan metabolitlerin üretilmesini engellediği belirlenmiştir (Coupland, 2008).

2.8.1 Stearidonik asit kaynakları

SDA soğuk su balıklarının yağında, mikrobiyal yağlarda, bazı bitki tohumlarında, genetiği değiştirilmiş bitkilerde bulunmaktadır (Coupland, 2008; Guil-Guerrero ve diğ., 2001).

Soğuk su balıkları

SDA, soğuk su balıklarının toplam yağ asitlerinin yaklaşık % 4'ü oranında bulunmaktadır. Çizelge 2.5'de soğuk su balıklarının içermiş olduğu ÇDY profilleri verilmektedir.

Çizelge 2.5: Balık yağında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri (Coupland ve Hebard, 2002; Guil-Guerrero., 2007).

Yağ Asidi	Ringa Balığı	Sardalya	Ton Balığı	Herring	Uskumru	Somon
18:4 n-3	2,1	4,7	0,8	3,0	1,3	1,4
20:3 n-3	0,2					2,0
24:4 n-3	1,7	0,5	2,0	0,7	4,0	2,0
20:5 n-3	16,7	7,4	6,9	9,0	11,5	3,2
22:5 n-3	1,9	0,6	2,2	0,6	1,8	5,1
22:6 n-3	7,0	5,2	19,7	4,0	15,1	5,2

Çizelge 2.5'den görüldüğü üzere soğuk su balıkları EPA ve DHA içeriği bakımından zengin olsa da SDA bakımından zengin bir içeriğe sahip değildir. Bu sebeple soğuk su balıkları SDA kaynağı olarak değil EPA ve DHA kaynağı olarak görülmektedirler

(Harris ve diğ., 2008; Guil-Guerrero., 2007). Bunun yanısıra SDA kaynağı ve hatta omega-3 kaynağı olarak balıklarla ilgili sorunlar artmaktadır. Günümüzde mevsimsel farklılıklar, çevre kirliliği, dünya balık stoklarının giderek azalması, vejeteryan tüketimin artması, ekonomik sebeplerden dolayı tüketicilerin tercihi edememesi gibi nedenlerden dolayı balık tüketimi azalmaktadır. Bu sebeple omega-3 yağ asitleri bakımından zengin bitkisel kaynaklara eğilim artmaktadır. Günümüzde balık yağına alternatif kaynak arayışı ve yeni ürünlerin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır (Coupland, 2008; Miller, 2008; Guil-Guerrero., 2007).

Algler

Mikro ve makro algler içermiş oldukları SDA oranına göre, kayde değer oranda palmitik asit ve EPA içermektedir. Mikroalglerden *Isochrysis* %26 SDA içeriği ile en iyi SDA kaynağıdır. Makroalglerden ise *Scytosiphon lomentarius* ve *Micelophycus* türleri yüksek SDA içeriğine (sırasıyla, %18,8 ve %20,1) sahiptir. Ancak makroalglerde bulunan SDA miktarı yüksek olmasına rağmen sahip oldukları yağ miktarının çok düşük olması sebebiyle iyi birer SDA kaynağı olarak görülmemektedirler (Guil-Guerrero, 2007).

Yağlı tohumlar

SDA'nın bulunduğu az sayıda aile bulunmaktadır. Bu aileler; *Aracauriaceae*, *Boraginaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cannabaceae*, *Primulaceae*, *Saxifragaceae* ve *Loasaceae*'dir. (Guil-Guerrero., 2007). SDA, *Boraginaceae* ailesine ait *Echium* türleri, (*E. vulgare* L.), kenevir tohumu (*Cannabis sativa* L., *Cannabaceae*) (%2-%3 oranında) ve frenk üzümü tohumunda (*Ribes nigrum* L., *Grossulariaceae*) (2% oranında) bulunmaktadır (Berti ve diğ., 2007; Stolyhwo ve Mol, 2007).

SDA frenk üzümü (*Ribes nigrum*) tohumunda az miktarda bulunmaktadır. SDA, frenk üzümü suyu üretiminde yan ürün olarak elde edilen frenk üzümü tohumundan elde edilmektedir. Frenk üzümü tohumu %2-4 arasında SDA içermektedir (Coupland, 2008; Stolyhwo ve Mol, 2007).

Kapalı tohumlar arasında SDA kaynağı olarak *Boraginaceae* en uygun aile olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucu bu aileye ait türlerin birkaçının tohumlarının ekstraksiyona uygun olduğu tespit edilmiştir. SDA, doğada bulunan bitki tohumlarının yanı sıra genetiği değiştirilmiş bitkiler yolu ile de elde

edilebilmektedir. Genetiği değiştirilmiş (GD) tohumlar düşük maliyetle SDA kaynağı olmalarına rağmen, GD ürünlerin tüketici talebiyle ilgili ciddi problemleri bulunmaktadır. Bu sebeple olarak *Echium vulgare* gibi SDA içeren bitki tohumları iyi bir kaynak olmaktadır (Berti ve diğ., 2007; Coupland, 2008). Tohumlu bitkilerden özellikle engerek otu türleri zengin SDA içeriği, hızlı gelişimi, çoğu yerde yetişebilmesi ve yenilenebilir bir kaynak olması bakımından günümüzde en çok ilgi duyulan ve araştırılan bitkilerdendir (Guil-Guerrero, 2007).

2.9 Engerek Otu (*Echium vulgare*)

Hodangiller (*Boraginaceae*) ailesine ait olan *Echium* cinsi bitki, ülkemizde “engerek otu” olarak bilinmektedir. *Boraginaceae* dünyada tropikal ve ılıman bölgelerde bulunan 100 cins ve 2000 türden oluşan bir aile olup, bu aileye mensup bitkiler tek yıllık, iki yıllık ve çok yıllık otlar, nadiren çalı ve ağaçlardır ve tipik olarak kalın trikomlar ile kaplıdır (Özcan, 2008). Türden türe farklılık göstermekle birlikte, engerek otu genel olarak 70 ile 120 cm arasında bir boya sahiptir (Berti ve diğ., 2007). Avrupa’da yetişen 30 farklı türden en fazla bilinen iki tanesi *E. vulgare* ve *E. lycopsis* olan engerek otu, başta Madeira, Kanarya ve Asor adaları olmak üzere Akdeniz Bölgesi dahilinde yaygın olarak bulunmaktadır (Url-1). Engerek otu (*E. vulgare*) Türkiye’de doğal olarak yetişmektedir. Habitatı orman altları, buğday, nohut, tek yıllık yem bitkileri ve ayçiçeği tarlalarıdır. Bu sebeple istilacı bitki olarak da tanımlanmaktadır (Yıldırım ve Ekin, 2003). Çevre ve Orman Bakanlığı verilerine göre engerek otu Kırklareli, Edirne, İstanbul, Bursa, Bolu, Kastamonu, Sinop, Samsun, Giresun, Erzurum, Çorum ve Ankara’da yaygın olarak bulunmaktadır. Çeşitli bölgelerde yetişen engerek otunun 9 farklı türü olduğu da belirtilmektedir. Bu bitki üzerine Orta Anadolu Bölgesi’nde yapılan bir çalışmada 9 türün tamamının da varlığı saptanmıştır. Bunlardan *E. italicum* L. ve *E. vulgare* L. daha yaygın olmak üzere Afyon, Edirne, Ankara, Çankırı, Eskişehir, Isparta, Konya, Kırşehir, Nevşehir, Niğde, Sivas ve Yozgat illerindeki tarım alanlarında engerek otu varlığı tespit edilmiştir (Yıldırım ve Ekin, 2003). Trakya Bölgesi’nde yaygın olarak bulunan *E. vulgare*, Hodangiller ailesinden diğer dört tür ile birlikte bu bölgede, arıcılıkta sahip olduğu potansiyel il ön plana çıkmaktadır (Sıralı ve Deveci, 2002). Şekil 2.7’de *Echium vulgare* bitkisi gösterilmektedir.



Şekil 2.7: *Echium vulgare* bitkisi.

Engerek otu geçmişten bugüne halk arasında çeşitli şekillerde kullanılmıştır. Özellikle atlara ve domuzlara karşı zehirli etkiye sahip olduğu bilinen bitkinin yapraklarının ele sürülmesi, çiğnenmesi veya çayının içilmesi akrep, yılan ve böcek gibi zehirli hayvanların insanlara yaklaşmasını önlemiş ve bu hayvanların ısırıklarını tedavi etmek için kullanılmıştır. Bitkinin kökü ise, kaynatılarak veya direkt olarak tüketildiğinde kalp çarpıntısı ve heyecanına iyi geldiği, üzüntü ve bunalımı gidermede yardımcı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, halk arasında, diüretik ve sakinleştirici olarak bilinmesi ile birlikte, baş ağrısının, sinirlilik halinin ve iltihaplanmaların tedavisinde de kullanılmıştır (Url-2).

Engerek otu yağı sahip olduğu omega-3 ve omega-6 oranıyla diğer bitki yağlarına göre benzersiz bir yağdır. Engerek otu yağı, ilaç sanayinde ekzama gibi cilt rahatsızlıklarının tedavisinde ve diğer bazı cilt rahatsızlıklarının tedavisinde kullanıma potansiyeline sahiptir. Ayrıca kozmetik ve kişisel bakım sanayinde de kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda engerek otu yağının topikal uygulaması sonucu cilt kırısklıklarını azalttığı, cildi güneş ışığının zararlı etkilerinden koruduğu ve nemlendirdiği tespit edilmiştir. Amerika’da piyasada engerek otu yağı içeren krem ve bakım ürünleri bulunmaktadır. Dünya çapında yabani bir bitki olarak bilinen engerek otunun Avrupa ve İngiltere’de tarımı yapılmaktadır (Berti ve diğ., 2007). Engerek otu yağı, bazı kanser türleri, kalp rahatsızlıkları, hipertrigliseridemi, cilt rahatsızlıkları gibi balık yağındaki ÇDYA tedavisinde etkili olduğu hastalıklarda etkin olması sebebiyle balık yağına alternatif bir yağ olarak da öngörülmektedir (Coupland, 2008).

2.10 Engerek Otu (*Echium vulgare*) Tohum Yağı ve Özellikleri

Echium bitkisinin tohumundan elde edilen yağ özellikle çoklu doymamış yağ asitlerince zengin, çok değerli bir yağıdır. *Echium* türlerinin yağ miktarları birbirinden farklılık göstermektedir ve literatürde farklı türler arasında, bitki tohumunun yağ oranının, *E. fastuosum*'dan *E. plantagineum*'a, % 7,10'dan % 23,65'e kadar değiştiği belirtilmektedir. Çizelge 2.6'da farklı *Echium* türlerinin yağ içerikleri gösterilmiştir

Çizelge 2.6: Farklı *Echium* türlerinin yağ miktarları (Guil-Guerrero ve diğ., 2001).

Echium türleri	Yağ miktarı, %
<i>E. plantagineum</i>	23,65
<i>E. giganteum</i>	11,99
<i>E. aculeatum</i>	17,07
<i>E. triste</i>	19,88
<i>E. leucophaeum</i>	17,82
<i>E. wildpretii</i>	17,21
<i>E. simplex</i>	10,04
<i>E. virescens</i>	10,89
<i>E. vulgare</i>	15,26
<i>E. sventenii</i>	7,25
<i>E. fastuosum</i>	13,68
<i>E. nervosum</i>	20,47
<i>E. candicans</i>	10,51
<i>E. acanthocarpum</i>	15,07
<i>E. onosmifolium</i>	18,65
<i>E. callithyrsum</i>	17,83
<i>E. hierrense</i>	20,42
<i>E. auberianum</i>	17,31
<i>E. decaisnei</i>	13,38
<i>E. strictum</i>	17,83

Echium vulgare ise doğada yabani olarak yetişen bir tür olup, yağ içeriği yaklaşık olarak %20'dir. *Echium* cinsi bitkilerin tohum yağlarının yağ asidi kompozisyonları Çizelge 2.7'de verilmektedir. Çizelge 2.7'den de görüldüğü üzere, *Echium vulgare* yüksek oranda ALA, SDA ve GLA içeriği bakımından öne çıkmaktadır. *Echium vulgare* içermiş olduğu çoklu doymamış yağ asitleri bakımından hayvansal kaynakalara alternatif bitkisel bir kaymak olarak görülmektedir (Guil-Guerrero ve diğ., 2001).

Çizelge 2.7: *Echium* türlerinin yağ asidi profili (Guil-Guerrero, 2007; Guil-Guerrero ve diğ., 2001).

Engerek türleri	Yağ asidi, %						
	16:0	18:0	18:1n-9	18:2n-6 (LA)	18:3n-6 (GLA)	18:3n-3 (ALA)	18:4n-3 (SDA)
<i>E. asperrimus</i>	7,7	2,8	14,7	16,3	9,6	35,3	11,1
<i>E. boissieri</i>	5,5	2,3	14,7	8,6	5,5	47,1	14,3
<i>E. creticum</i>	5,6	3,0	8,2	14,3	9,7	42,7	14,7
<i>E. italicum</i>	8,0	3,0	17,0	11,0	8,0	39,0	12,0
<i>E. lusitanicum</i>	6,7	2,5	16,4	16,4	10,9	33,3	12,3
<i>E. plantagineum</i>	7,0	4,0	17,0	15,0	10,0	34,0	13,0
<i>E. rubrum</i>	8,0	2,0	8,0	20,0	14,0	34,0	15,0
<i>E. russicum</i>	5,7	2,4	14,4	22,6	15,8	26,6	10,6
<i>E. sabulicola</i>	5,5	2,4	8,0	16,3	10,9	40,4	14,7
<i>E. fastuosum</i>	7,5	3,0	9,7	16,2	23,8	25,5	10,9
<i>E. flavum</i>	6,3	2,1	21,1	24,2	8,4	32,2	3,1
<i>E. humile</i>	7,3	3,9	17,2	24,4	7,9	31,2	5,9
<i>E. vulgare</i>	7,4	2,5	11,1	21,2	11,7	34,1	9,7

Echium vulgare'nin yağ asidi kompozisyonu yetiştiği bölgeye göre değişiklik göstermekle birlikte; % 10-12 arasında SDA, %10-12 civarında GLA ve % 30-40 oranında ALA, % 20-25 arasında LA içermektedir (Czaplicki ve diğ., 2009).

Echium bitkisinin farklı türlerinin tohumları GLA ve ALA bakımında zengin olmakla beraber, bu bitkiye olan ilginin artmasının asıl sebeplerinden biri de tohum yağının yüksek oranda stearidonik asit içermesinden kaynaklanmaktadır. Günümüzde SDA içeriği yüksek tohum kaynaklı tek yağ *Boraginaceae* ailesine ait *Echium* cinsi bitkiden elde edilen yağdır (Ruiz-Lopez ve diğ., 2009).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Malzeme

Tez çalışmasında kullanılan, ülkemizde engerek otu olarak bilinen, Zeytinburnu Belediyesi Tıbbi Bitkiler Bahçesi ve Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü tarafından *Echium vulgare* olarak tanımlanan engerek otu bitkisi Edirne'nin farklı bölgelerindeki doğal ortamından toplanmıştır. *Echium vulgare* toplandıktan sonra kurutularak tohumları çıkarılana kadar oda şartlarında bekletilmiştir. Zeytinyağı yerel marketlerden, immobilize 1,3 spesifik lipaz enzimi olan Lipozyme® TL IM Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Danimarka) firmasının Türkiye temsilcisi olan Novozyme Türkiye tarafından temin edilmiştir. Ürün spesifikasyonunda Lipozyme® TL IM enziminin aktivitesi 250 IUN/g olarak belirtilmiştir. İnce tabaka kromatografisinde (TLC) kullanılan 20x20 cm boyutundaki, yüzeyi silikajel G ile kaplı cam plakalar a Merck (Whitehouse, NJ) firmasından, kullanılan çözüenler ise J.T. Baker (Phillipsburg, NJ) firmasından satın alınmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm çözelti ve kimyasallar kromatografik ve/veya analitik saflıktadır. Şekil 3.1'de *Echium vulgare* bitkisi gösterilmektedir.



Şekil 3.1: Toplanan *Echium vulgare* bitkileri.

3.2 Yöntemler

Deneysel çalışmada öncelikle *Echium vulgare* tohumlarından yağ eldesi ve elde edilen yağın karakterizasyonu için asit sayısı, kırılma indisi, sabunlaşma sayısı ve

yağ asidi kompozisyonu tayinleri yapılmıştır. Daha sonra ise asidoliz reaksiyonları ile yapılandırılmış yağ eldesi ve bu yağın karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 *Echium vulgare* tohumlarının çıkarılması

Echium vulgare bitkisinin tohumları ana gövdeden ayrılan saplar üzerinde, dikensi tüyler ile kaplı mızrak şeklinde yapraklar arasında, ufak kesecikler içerisinde bulunmaktadır. Bitki kurutulduktan sonra, üç köşeli karakteristik bir yapıya sahip olan tohumlar ayrılmış ve yağı ekstrakte edilmeden önce $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Şekil 3.2'de tohumlarının ayrılması aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 3.2: *Echium vulgare* tohumlarının çıkarılma aşamaları.

3.2.2 *Echium vulgare* tohumlarından yağ eldesi

Engerek otu tohumundan yağ eldesi için geleneksel Soxhlet ekstraksiyon yöntemi kullanılmış ve ekstraksiyon heksan varlığında gerçekleştirilmiştir. Öğütülen engerek otu tohumlarından 15 gr tartılmış ve Soxhlet ekstraksiyonu ile 6 saat süre ekstraksiyona tabii tutulmuştur. Daha sonra çözgen döner buharlaştırıcıda kuruluğa kadar uçurulmuştur (Bolat, 2009). Elde edilen yağ kahverengi şişelere aktarılarak derin dondurucuda $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Yağ miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ yağ} = \frac{\text{Yağ ağırlığı}}{\text{Örnek ağırlığı}} * 100 \quad (3.1)$$

Burada;

Yağ ağırlığı= Ekstraksiyon sonucu elde edilen yağın ağırlığı (g)

Örnek ağırlığı= Ekstraksiyonda kullanılan tohum ağırlığı (g)

3.2.3 Substrat karakterizasyonu

Asitlik tayini

Echium vulgare tohum yağlarında ve zeytinyağında asitlik tayini “TS EN ISO 660 Hayvansal ve Bitkisel Katı ve Sıvı Yağlar – Asit Sayısı ve Asitlik Tayini standardına” göre yapılmıştır. Bu yöntemle göre numune titrasyondan önce nötralize edilmiş etanol-dietil eter çözeltisi içinde çözülür ve 0,1 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ile titre edilir (TSE, 2010).

Serbest yağ asitliği %ağırlık cinsinden aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$V \times c \times \frac{M}{1000} \times \frac{100}{m} = \frac{V \times c \times M}{10 \times m} \quad (3.2)$$

Burada:

V = Etanollü potasyum hidroksit sarfiyatı (ml)

c = Ayarlı etanollü potasyum hidroksit çözeltisinin derişimi (N),

M = Oleik asidin molekül ağırlığı (282)

m = Numune miktarı (g)

Kırılma indisi tayini

Engerek otu tohumlarından elde edilen yağın kırılma indisi Abbe refraktometresi ile (Veb Carl Zeiss Jena, Model G) oda sıcaklığında ölçülmüştür.

Sabunlaşma sayısı tayini

Echium vulgare yağı ve zeytinyağında sabunlaşma sayısı tayini “AOAC 920.160 Katı ve Sıvı Yağların Sabunlaşma Sayısı Resmi Metodu”na göre yapılmıştır. Alkollü potasyum hidroksit eklenen numune geri soğutucu altında tamamen sabunlaşana kadar kaynatılır ve daha sonra HCl ile titre edilir (AOAC, 2000). Sabunlaşma sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanır:

$$\text{Sabunlaşma sayısı} = \frac{28,05 \times (B - S)}{\text{numune, g}} \quad (3.3)$$

B = Tanık için harcanan 0,5 N HCl miktarı (ml)

S = Örnek için harcanan 0,5 N HCl miktarı (ml)

3.2.4 *Echium vulgare* tohum yağından serbest yağ asitlerinin eldesi

Engerek otu yağından serbest yağ asitlerinin (SYA) eldesinde Senanayake ve Shahidi (1999)'nin uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde göre 25 g yağ, 5,75 g KOH, 11 ml su ve 66 ml % 95'lik sulu etanol (hacim/hacim) karışımı kullanılarak 1 saat boyunca 60 °C'de geri soğutucu altında sabunlaştırılmıştır. Süre sonunda karışıma 50 ml distile su eklenmiş ve ortamdan sabunlaşmayan maddelerin uzaklaştırılması için, karışıma ayırma hunisinde iki kez 100 ml hekzan ilave edilmiştir. Sabunlaşan kısmı içeren sulu fraksiyon 3 N HCl ile pH=1 olana dek asitlendirilmiştir. Daha sonra karışım ayırma hunisine alınmış ve açığa çıkan yağ asitleri 50 ml hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Hekzan fazı susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra döner buharlaştırıcıda 40°C'deki su banyosunda uzaklaştırılmıştır. Elde edilen engerek otu SYA kullanımına kadar -18°C'de saklanmıştır.

3.2.5 Asidoliz reaksiyonu

Zeytinyağı ile engerek otu yağı serbest yağ asitleri arasında gerçekleştirilen asidoliz tepkimeleri 100 ml'lik balonlarda gerçekleştirilmiş olup, tepkimede kullanılan karışım 5 ml hekzan, çeşitli substrat oranlarında zeytinyağı ve engerek otu SYA'larını içermiştir. Substrat mol oranı (yağ asitleri/ zeytinyağı) 4:1-6:1 arasında, reaksiyon sıcaklığı 55-65°C arasında; reaksiyon süresi 6-9 saat aralığında ve kullanılan toplam substrat miktarının %10'u kadar Lipozyme® TL IM ilavesiyle asidoliz tepkimeleri gerçekleştirilmiş ve stearidonik asidin zeytinyağına katılma oranları belirlenmiştir. Tepkimelerin tamamı 200 rpm çalkalama hızına ayarlanmış olan çalkalamalı su banyosunda 2'şer paralel olacak şekilde yürütülmüş ve hesaplamalarda elde edilen sonuçların ortalama değerleri alınmıştır.

3.2.6 Ürün Analizi

İnce tabaka kromatografisi ile analiz

Asidoliz reaksiyonu sonunda elde edilen ürünler susuz sodyum sülfat kolondan geçirilerek içerdikleri enzim ve nemin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Daha sonra ürünler azot gazı altında konsantre edilmiştir. Silikajel kaplı TLC plakaları 110 °C'deki etüvde 1 saat boyunca şartlandırılmıştır. 50 µL reaksiyon ürünü Silikajel kaplı 20x20 cm boyutundaki TLC plakalarına uygulanmış ve plakalar, petrol eteri:

dietil eter: asetik asit (80:20:0,5 hacimce) çözgen sisteminin yer aldığı tanka yerleştirilmiştir. Plaka çözgen sistemiyle geliştirildikten sonra plakalar üzerine 2,7-diklorofloresinin metanoldeki % 0,2'lik çözeltisi püskürtülmüş ve görünür hale gelen triaçilgliserol (TAG) bandı plakadan kazınarak tüplere alınmıştır (Şahin Yeşilçubuk ve Karaali, 2008).

Yağ asidi metil esterlerinin hazırlanması

TLC plakalarından kazınan TAG bantlarını içeren test tüplerine metanol ile hazırlanmış %6'luk HCl çözeltisinden 3 ml ve C17:0 iç standardından (10 mg/ml) 40 µl ilave edilerek, tüpler 1 dakika süreyle tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. Daha sonra, karışımı içeren tüpler 75°C'deki etüvde 2 saat bekletilerek yağ asitlerinin metillenmesi sağlanmıştır. Süre bitiminde etüvden alınan tüpler üzerine iki kez 2 ml hekzan ve 0,1 M KCl çözeltisi eklenerek yağ asidi metil esterleri (YAME) ekstrakte edilmiştir. YAME susuz sodyum sülfat kolondan geçirilerek içerdiği nem uzaklaştırılmış ve içerdiği hekzan miktarı 0,5 ml oluncaya kadar azot gazı altında uçurulmuştur (Jennings ve Akoh, 1999).

Yağ asitlerinin gaz-sıvı kromatografisi ile analizi

Metillendirme işlemini takiben tepkimelerde kullanılan substratların ve reaksiyon ürünlerinin yağ asidi kompozisyonları kapiler gaz-sıvı kromatografisi (GSK) yöntemi ile AOAC 969.33 metodunu kullanarak belirlenmiştir. Bu amaçla, Thermoquest marka Trace GC 2000 model GSK kullanılmış olup, analizde 30 m uzunluğa sahip kapiler ZB wax (Bellaforte, PA) kolonu kullanılmıştır. GSK cihazının koşulları ve kullanılan kolonun özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1: Gaz kromatografisi cihazında uygulanan koşullar ve kolon özellikleri.

Dedektör tipi ve sıcaklığı	Alev iyonizasyon dedektörü, 260°C
Enjektör sıcaklığı	Dağıtım mod, 250°C Dağıtım akış hızı: 116 ml/dk. Dağıtım oranı: 77
Helyum akış hızı	1,5 ml/dak
Fırın sıcaklığı (Programlı çalışma)	1. aşama 150°C (3 dk) 2. aşama 5°C/dk ile 225 °C 3. aşama 225°C (5 dk)
Kolon tipi	30 m uzunluğunda, 0.25 mm iç çaplı 0.25 µm film kalınlığında kapiler kolon
Enjeksiyon miktarı	2 µl

Analiz sonuçları yağ asidi metil esterlerinin % mol miktarları olarak belirlenmiş ve bunun için C 17:0 iç standardı kullanılarak bilgisayar programı yardımıyla hesaplamalar yapılmıştır.

Yağ asitlerinin sn-2 pozisyonel analizi

Asidoliz tepkimeleriyle üretilen yapılandırılmış yağların sn-2 pozisyonunda bulunan yağ asitlerinin kompozisyonunun belirlenmesi için ilk olarak, TLC plakalarından kazınan TAG bantları üzerine 2 ml Tris tamponu (1,0 M), 0,5 ml safra tuzu çözeltisi (% 0,05) ve 2 ml kalsiyum klorür çözeltisi eklenerek 2 dakika süreyle tüp karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra, karışımı içeren test tüplerine 40 mg pankreatik lipaz enzimi eklenip 40°C'deki su banyosunda 3 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan alınan tüpler 2 dakika tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. Reaksiyonun sonlandırılması için tüplerdeki karışıma 1 ml HCl (6 N) eklenerek 4 ml dietil eter ile ekstrakte edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası test tüplerindeki üst faz alınarak sodyum sülfat kolondan geçirilmiş, hacminin 1/3'üne kadar azot gazı altında konsantre edilmiştir. Tüplerde kalan karışım TLC plakalarına spotlanarak hekzan: dietil eter: formik asit (60:40:1,6, hacimce) çözgen sistemiyle geliştirilmiştir. Sonraki aşamada, TLC plakaları üzerine 2,7-diklorofloresinin metanoldeki % 0,2'lik çözeltisi püskürtülerek 2-monoağılglicerol (2-MAG) bantları görünür hale getirilmiştir. 2-MAG bandın TLC ile ayırımında standart olarak 2-monoolein kullanılmıştır. 2-MAG bantları spatül yardımıyla plakalardan kazınarak test tüplerine aktarılmış ve daha önce belirtilen yöntem ile yağ asidi metil esterleri hazırlanıp, GSK ile analizlenmiştir (Pina-Rodriguez ve Akoh, 2009).

Tepki-yüzey yöntemi ile deneysel tasarım

Zeytinyağı ve engerek otu tohum yağı serbest yağ asitleri kullanılarak ÇDYA ile zenginleştirilmiş yapılandırılmış yağların üretiminde kullanılan enzimatik asidoliz reaksiyonları üzerinde “substrat mol oranı” (yağ asitleri/ zeytinyağı), “reaksiyon sıcaklığı”, “reaksiyon süresi”nin etkisinin incelenmesi amacıyla tepki-yüzey yönteminden yararlanılmıştır. Tepki olarak ise stearidonik katılımı (% mol) seçilmiştir. Bağımsız değişkenlerin değer aralıklarının seçiminde hem ön deneme sonuçlarından hem de literatürde verilen değerlerden yararlanılmıştır. Bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve değerleri Çizelge 3.2'de verilmektedir.

Çizelge 3.2: Merkezil Bileşik Deney Tasarımı için kullanılan değişkenler (faktörler) ve seviyeleri.

Bağımsız değişkenler	Semboller	Kullanılan seviyeler				
		- α	-1	0	+1	+ α
Reaksiyon sıcaklığı (°C)	T	51,5	55	60	65	68,4
Reaksiyon süresi (saat)	t	5	6	7,5	9	10
Substrat mol oranı (mol/mol)	Sr	3,3	4	5	6	6,7

Ürünün gram düzeyinde üretimi

Tepki Yüzey Yöntemi ile elde edilen izdüşüm grafikleri yardımıyla belirlenen ve elde edilen modelin doğruluğunun incelendiği koşullarda yapılandırılmış yağların büyük ölçekte üretimi (yaklaşık 40 kat arttırılarak) gerçekleştirilmiştir. Buna göre, reaksiyonlar 250 ml'lik cam balon kullanılarak çalkalamalı su banyosunda (Memmert, Almanya) reaksiyon sıcaklığı 55°C, reaksiyon süresi 8,4 saat ve substrat mol oranı 6 mol/mol olan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. Büyük ölçekte üretim için kullanılan zeytinyağı miktarı 250 mg'dan 9,44 gr'a yükseltilmiş; kullanılan engerek otu tohumu yağı SYA miktarı ile enzim ve hekzan miktarları da zeytinyağı miktarı ile orantılı olacak şekilde arttırılmıştır.

3.2.7 Reaksiyon ürünlerinden serbest yağ asitlerinin uzaklaştırılması

Yapılandırılmış yağların büyük ölçekte üretiminden sonra elde edilen reaksiyon karışımından serbest yağların uzaklaştırılması için Lee ve diğ. (2004)'in uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle göre, enzimatik reaksiyon sonrasında susuz sodyum sülfat kolondan geçirilen reaksiyon karışımında bulunan hekzan döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, reaksiyon karışımına % 20'lik etanol ile hazırlanan 0,5 N KOH çözeltisinden 60 ml ve 110 ml hekzan eklenmiş ve ayırma hunisine aktarılmıştır. Faz ayrımı gerçekleşikten sonra üst faz (hekzan fazı) bir beherde toplanarak içerisine 3-4 damla fenolfitalein eklenmiş ve % 20'lik etanol ile hazırlanan 0,5 N KOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Karışımın rengi pembeye döndükten sonra doymuş tuz çözeltisinden 30 ml karışıma eklenmiştir. Ayırma hunisine aktarılan karışım kuvvetlice çalkalanmış ve faz ayrımı için beklenmiştir. Üst faz (hekzan fazı) susuz sodyum sülfat kolonundan geçirilerek içerdiği hekzan döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmıştır. Elde edilen yağ -18°C'de saklanmıştır.

3.2.8 Oksidatif stabilite (OSI) analizi

Enzimatik deneylerde substrat olarak kullanılan engerek otu tohumu yağı, zeytinyağı ve gram ölçekte elde edilen yapılandırılmış yağın oksidatif stabiliteleri Metrohm 743 Rancimat Cihazı (Herisau, İsviçre) ile belirlenmiştir. Oksidatif stabilitesi ölçülecek olan yağlardan 3'er gr tartılmış ve hava akış hızı 20 l/sa, sıcaklık 100 °C olarak ayarlanmış ve elde edilen sonuçlar indüksiyon süresi (saat) olarak belirtilmiştir (Lee ve diğ., 2004).

3.2.9. Oksidasyon ürünlerinin belirlenmesi

Enzimatik deneylerde substrat olarak kullanılan zeytinyağı ve gram ölçekte elde edilen YY'nin oksidasyon ürünlerinin belirlenmesi için Akoh ve Moussta (2001)'in uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle göre yağlar, 0., 24. ve 48. saat sonunda peroksit sayısı, *p*-anisidin değerleri ve toplam oksidasyon (TOTOX) değerleri belirlenecek şekilde deney tüplerine tartılmıştır. Tüpler 50 °C'de 48 saat süre ile karanlıkta çalkalamalı su banyosunda (N-Biotek, Kore) oksidasyona maruz bırakılmıştır.

Peroksit sayısı, AOCS Cd 8-53 nolu asetik asit kloroform metodu kullanılarak, *p*-anisidin değeri ise AOCS Cd 18-90 nolu spektrofotometrik yöntem kullanılarak belirlenmiştir. TOTOX değeri Shahidi ve Wanasundra (2002)'nin daha önce belirttiği aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{TOTOX} = 2 \times (\text{PD}) + (p\text{-AD}) \quad (3.4)$$

3.2.10 İstatistiksel analiz

Modde 9.0 (Umetrics, İsveç) programı yardımıyla oluşturulan deney tasarımına göre gerçekleştirilen enzimatik asidoliz reaksiyonlarından elde edilen veriler kullanılarak kuadratik (ikinci derece) modelin oluşturulması sağlanmıştır. Enzimatik reaksiyonlar sonucunda elde edilen tepki (stearidonik asit, % mol) için geliştirilen modelde aşağıda yer alan ikinci derece polinom denklem kullanılmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.5)$$

Eşitikte yer alan

Y: Tepki

β_0 : Kesişim terimi

β_i : Lineer (birinci derece) regresyon katsayısı

β_{ii} : Kuadratik (ikinci derece) regresyon katsayısı

β_{ij} : Etkileşim regresyon katsayısı

X_i ve X_j : Bağımsız değişkenler, olarak simgelenmektedir.

Bağımsız değişkenler ile tepkiler arasındaki ilişkiyi tahminlemek için varyans analizi (ANOVA) ile elde edilen modelin deneylerden elde edilen verilere uygunluğu R^2 ve Q^2 değerleri ile tespit edilmiştir (Rao ve diğ., 2002; Yang ve diğ., 2003a; Lumor ve Akoh, 2005; Chopra ve diğ. 2009; Chen ve diğ., 2010).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Substratların Karakterizasyonu

Substrat olarak kullanılan engerek otu (*Echium vulgare*) tohumu yağının ve zeytinyağının analizlenen özellikleri Çizelge 4.1 ve 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1: Engerek otu (*Echium vulgare*) tohum yağının özellikleri.

Özellik	<i>E. vulgare</i> yağı
Asit sayısı, mg KOH	2,80 ± 0,2
Serbest yağ asitliği (%)	1,40± 0,2
Kırılma indisi	1,481± 0,2
Sabunlaşma sayısı, mg KOH	180,3 ± 0,5

Çizelge 4.2: Zeytinyağının özellikleri ve literatür ile karşılaştırılması.

Özellik	Zeytinyağı ¹	Zeytinyağı ²
Asit sayısı, mg KOH	1,68 ± 0,2	≤ 2
Serbest asitlik (% en çok, oleik asit cinsinden)	0,84 ± 0,1	≤ 1,0
Sabunlaşma sayısı, mg KOH	190 ± 0,2	182-193

¹Deneylerde kullanılan zeytinyağı

²Url-3

Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere asidoliz reaksiyonunda kullanılan zeytinyağının özellikleri Türk Gıda Kodeksi “Zeytinyağı ve Prina Yağları” tebliğinde verilen özelliklere uygun bulunmuştur.

4.2 Substratların yağ asidi profili

Substrat yağlar olan zeytinyağı ve engerek otu tohum yağının GSK kullanılarak belirlenen yağ asidi bileşimleri ve sn-2 pozisyonundaki yağ asidi dağılımları Çizelge 4.3 ve 4.4’de gösterilmiştir. Çizelge 4.3’de verilen zeytinyağının yağ asidi kompozisyonu Türk Gıda Kodeksi “Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği”nde belirtilen değerler ile karşılaştırıldığında, deneysel çalışmalarda kullanılan zeytinyağının yağ asidi bileşenlerinin hem Türk Gıda Kodeksi’nde hem de literatürde yer alan değerler ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3: Zeytinyağının sn-2 pozisyonundaki yağ asidi bileşimleri, yağ asidi kompozisyonu ve literatür değerleri.

Yağ Asidi	YA Bileşimi			Sn-2 pozisyonundaki YA Bileşimi
	Zeytinyağı ¹	Zeytinyağı ²	Zeytinyağı ³	Zeytinyağı ¹
C 16:0	16,6	7,5-20	12,1	0,8
C 18:0	2,7	0,5-5,0	3,1	0,2
C 18:1	68,6	55-83	71,3	91,1
C 18:2	11,0	3,5-21	10,6	7,4
C 18:3 n3	0,6	≤ 1	0,7	0,5
C 18:3 n6	-	-		-
C 18:4 n3	-	-		-
C 20:0	0,4	≤ 0,6	0,4	-

¹Deneylerde kullanılan zeytinyağı

²Url-3

³Firestone, 2005

Çizelge 4.4’de engerek otu yağının yağ asidi kompozisyonu ve sn-2 pozisyonundaki yağ asidi profili verilmiştir. Çizelgeye göre analiz sonucu elde edilen engerek otu yağ asidi profili literatürdeki değere yakın olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4: Engerek otu tohum yağının yağ asidi profili ve sn-2 pozisyonundaki yağ asidi bileşimi.

Yağ Asidi	YA Bileşimi		Sn-2 pozisyonundaki YA Bileşimi	
	Engerek otu tohum yağı ¹	Engerek otu tohum yağı ²	Engerek otu tohum yağı ³	Engerek otu tohum yağı ⁴
C 16:0	7,9	7,7	1,5	1,3
C 18:0	4,8	4,2	1,5	0,6
C 18:1	16,2	16,	10,1	10,1
C 18:2	15,3	15,5	20,1	25,4
C 18:3 n3	32,8	31,7	22,8	19,0
C18:3 n6	10,2	10,7	18,5	18,5
C 18:4 n3	12,2	12,6	25,5	25,1
C 20:0	0,45	-	-	-

¹Deneylerde kullanılan engerek otu tohum yağı

²Czaplicki ve diğ., 2009

³Analiz sonucu

⁴Rincón-Cervera ve Guil-Guerrero, 2010

4.3 Reaksiyon Koşullarının Tepki Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Zeytinyağı ve engerek otu YA'ları arasında gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimeleri sonucunda ÇDYA ile zenginleştirilmiş yapılandırılmış fonksiyonel yağ üretimi hedeflenmiştir. Reaksiyon koşullarının optimizasyonu, seçilen reaksiyon parametreleri olan reaksiyon sıcaklığı (T, °C), reaksiyon süresi (t, saat) ve substrat mol oranı (Sr, mol/mol) ile Tepki Yüzey Yöntemi (TYT) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney tasarımı doğrultusunda elde edilen reaksiyon koşullarının enzimatik reaksiyon üzerindeki etkisi incelenmiştir.

4.3.1 Stearidonik asit katılımına reaksiyon koşullarının etkilerinin istatistiksel açıdan yorumlanması

Modde 9.0 (Umetrics, İsveç) programı kullanılarak enzimatik reaksiyonlardan elde edilen veriler analizlenerek tepkiye ait bir model oluşturulmuş; varyans analizi yapılarak, elde edilen veriler ile oluşturulan modelin uygunluğu incelenmiştir. Modde 9.0 programı yardımıyla geliştirilen 3 faktörlü, 5 seviyeli Merkezil Birleşik Deney Tasarımı ve deney noktalarında gözlenen tepki değerleri (SDA katılımı, % mol) Çizelge 4.5'de yer almaktadır.

Çizelge 4.5: Tepki Yüzey Yöntemi ile geliştirilen deney tasarımı ve gözlenen tepkiler.

Deney	Bağımsız değişkenler			Tepki
	T (°C)	t (saat)	Sr (mol/mol)	SDA (% mol)
1	55	6	4	3,3
2	55	6	6	4,8
3	65	6	4	2,1
4	65	6	6	2,2
5	55	9	4	3,8
6	55	9	6	4,9
7	65	9	4	3,7
8	65	9	6	4,2
9	60	7,5	3,3	3,0
10	60	7,5	6,7	4,1
11	51,6	7,5	5	4,1
12	68,4	7,5	5	3,4
13	60	5,0	5	2,6
14	60	10	5	4,3
15	60	7,5	5	4,4
16	60	7,5	5	4,5

Çizelge 4.5: (devam) Tepki Yüzey Yöntemi ile geliştirilen deney tasarımı ve gözlenen tepkiler.

Deneyler	Bağımsız değişkenler		Tepki	
	T (°C)	t (saat)	Sr (mol/mol)	SDA (% mol)
17	60	7,5	5	4,5

En uygun kuadratik model elde edilerek $p<0.05$ önem düzeyinde önemsiz olan birinci derece ve ikinci derece terimler ile etkileşim terimleri elimine edilerek modele dahil edilmemiştir (Lumor ve Akoh, 2005; Chen ve diğ., 2010). Elde edilen modelin gözlenen tepkiye (SDA katılımı) ait regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P -değeri) istatistiksel olarak hesaplanmış ve aşağıda Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6: Modelin SDA katılımına ait regresyon katsayıları ve önem dereceleri.

Bağımsız değişkenler	Regresyon katsayıları (β)	P -değeri (önem derecesi)
Kesişim/Sabit	4,47	<0,0001
Lineer (1. derece)		
T	-0,39	0,0011
t	0,46	0,0004
Sr	0,35	0,0023
Kuadratik (2. derece)		
t*t	-0,27	0,008
Sr*Sr	-0,22	0,011
T*T	-0,21	0,024
Etkileşim		
T*t	0,31	0,011
Sr*T	-0,22	0,040

Çizelge 4.9’da yer alan değerler incelendiğinde, $p<0.05$ önem düzeyinde, birinci derece terimler olan sıcaklık, süre ve substrat mol oranının SDA katılımına etkisinin istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca, birinci derece terimlerden olan sıcaklığın SDA katılımını negatif yönde etkilediği gözlenmektedir. SDA katılımına etki eden ikinci derece terimlerin SDA katılımına negatif etkisi olduğu görülmektedir. Etkileşim terimlerinden “sıcaklık-süre” teriminin SDA katılımına etkisinin istatistiksel olarak ($p<0.05$) önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir., SDA katılımı için oluşturulan denklem aşağıda verilmektedir:

$$\text{SDA katılımı} = 4,47 - 0,39T + 0,46t + 0,35Sr - 0,27t^2 - 0,22Sr^2 - 0,21T^2 + 0,31T*t - 0,22 Sr*T \quad (4.1)$$

Denkleimde yer alan “T” reaksiyon sıcaklığını, “t” reaksiyon süresini ve “Sr” ise substrat mol oranını göstermektedir. Elde edilen modelin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) ile irdelenmiş olup; sonuçlar Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

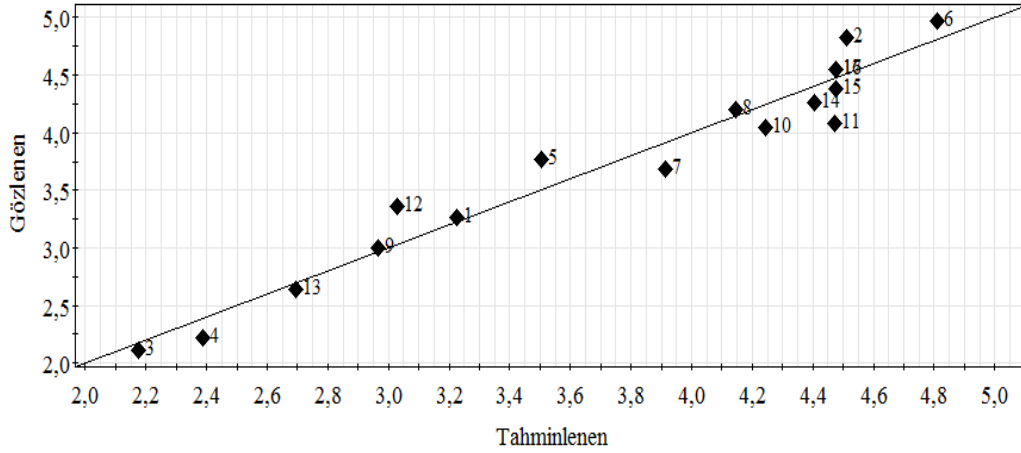
Çizelge 4.7: SDA katılımı için ANOVA analizi sonuçları.

SDA katılımı	SD	KT	KO	F değeri	P- değeri
Toplam	17	252,50	14,85		
Sabit	1	240,30	240,30		
Toplam düzeltilen	16	12,12	0,76		
Regresyon	9	11,56	1,28	14,07	0,001
Hata	7	0,64	0,09		
Model yetersizliği	5	0,62	0,12	12,11	0,078
Tekrar hatası	2	0,02	0,01		

SD: Serbestlik derecesi; KT: Kareler toplamı; KO: Kareler ortalaması; P: Olasılık değeri

Varyans analizi sonuçlarına göre, SDA katılımı için elde edilen modelin F değerleri (F_{model}) ile F_{Tablo} değerinin karşılaştırılması ile modelin tahminleme için uygunluğu ölçülmüştür. Buna göre, $p < 0,05$ önem düzeyinde, (F_{model}) (14,07) değerinin F_{Tablo} ($F_{9,7}$) (3,69) değerinden büyük olduğu; dolayısıyla elde edilen modelin tahminleme için uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca, modelin elde edilen verilere uygunluğu model yetersizliği (lack of fit) ile tespit edilmektedir. Model yetersizliği, modelin deneysel bölgelerde bulunan ve regresyonda yer almayan noktalardaki verileri göstermedeki başarısızlığının bir ölçütüdür. SDA katılımı için elde edilen modelin model yetersizliğinin P-değeri (0,078) $> 0,05$ olduğundan, SDA katılımına ait modelin verilerle uyumlu olduğu saptanmıştır (Rao ve diğ., 2002; Lumor ve Akoh, 2005; Sahin ve diğ., 2005a; Chopra ve diğ., 2009).

Varyans analizi sonuçları incelendiğinde, SDA katılımı için geliştirilen modele ait model katsayısı (R^2) 0,94, düzeltilmiş model katsayısı $R^2_{\text{düz}}$ 0,88 ve modelin tahminleme gücü (Q^2) ise 0,44 ($> 0,25$) olarak bulunmuştur. Ayrıca, modellerden tahminlenen değerler ile enzimatik asidoliz reaksiyonları sonucu elde edilen veriler arasındaki ilişki Şekil 4.1’deki grafikte gösterilmiştir.

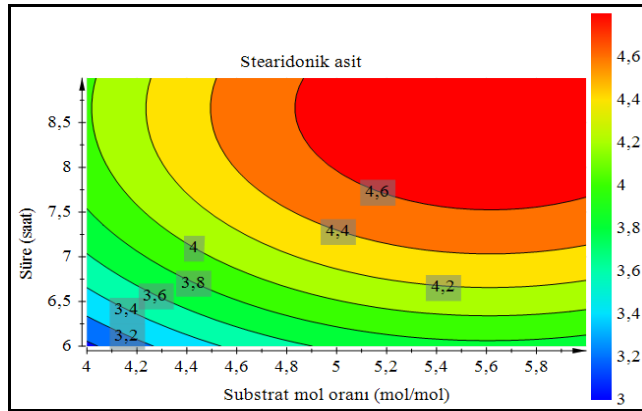


Şekil 4.1: Reaksiyon sonuçları ile SDA katılımına ait modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki.

Şekil 4.1’deki grafikte görüldüğü gibi, deney sonucunda gözlenen değerler ile modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki yüksek oranda lineerlik göstermektedir. Bu aynı zamanda, modelin, büyük oranda, reaksiyon parametreleri ile tepki (SDA katılım oranı) arasındaki gerçek ilişkiyi temsil ettiğinin bir göstergesidir (Yang ve diğ., 2003a).

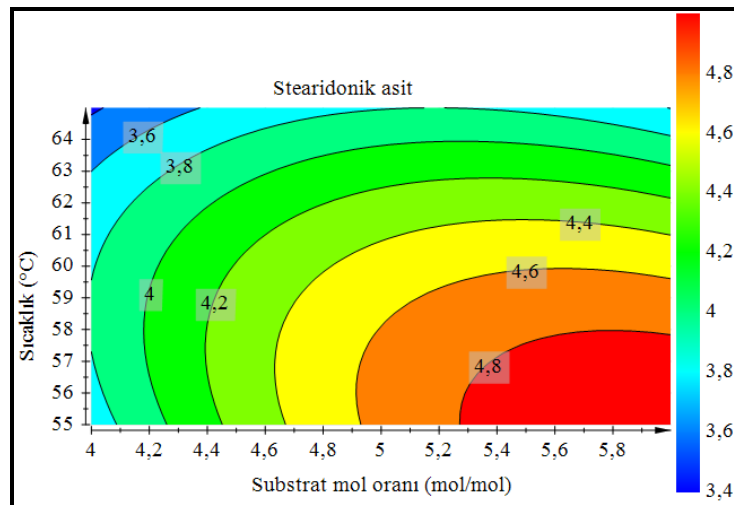
4.3.2 Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması

Enzimatik reaksiyonlar sonucunda elde edilen ürünlerin reaksiyon parametreleri ile olan ilişkisi tepki-yüzey grafikleriyle de incelenmiştir. Şekil 4.2’de süre ve substrat mol oranının SDA katılımına olan etkisini gösteren ve “maksimum tepki” olarak tanımlanan izdüşüm grafiği yer almaktadır. Bu grafiğe göre, reaksiyon süresi ve substrat mol oranı arttıkça SDA katılımının da arttığı görülmektedir.



Şekil 4.2: SDA katılımına mol substrat oranı ve sürenin etkisini gösteren izdüşüm grafiği.

Şekil 4.3'den de görüleceği gibi, reaksiyon süresi 8-9 saat aralığında, sıcaklık ise 63°C'den düşük olduğunda SDA katılım miktarı maksimuma ulaşmaktadır. Şekil 4.4'de yer alan grafikte ise substrat mol oranı ve sıcaklığın SDA katılımı üzerindeki etkisi gösterilmektedir.



45

Zeytinyağına SDA katılımını gösteren izdüşüm grafiklerinden çıkarılan sonuçlara göre substrat mol oranının ve zamanın artması SDA katılım oranını da arttırmaktadır. Substrat mol oranındaki artışın katılım oranını arttırması literatürde yer alan diğer çalışmalarda da gözlenmektedir. Uygun reaksiyon süresinin belirlenmesi proses maliyeti açısından son derece önemlidir. (Yang ve diğ., 2003a; Lumor ve Akoh, 2005; Sharma, Rastogi ve Lokesh, 2009). Can ve Özçelik (2005)'in yapmış olduğu çalışmada fındık yağının omega-3 ÇDYA ile zenginleştirilmesi çalışmasında substrat mol oranı artışının omega-3 ÇDYA katılımını arttırdığını belirlemişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada Lipozym® RM IM enzimi kullanılarak palmitik-stearik asit (PSA) karışımı ayçiçek yağına (SO) eklenmiş ve substrat mol oranı, sıcaklık, enzim miktarı ve süre gibi parametrelerin inkorporasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir (Carrin ve Crapiste, 2008). Bu çalışma sonucunda PSA/SO substrat mol oranı maksimum seviye olan 5:1'in üzerindeki substrat mol oranlarında, PA ve SA karışımının ayçiçek yağına katılım oranında artış gözlenmiştir. Bu duruma sebep olarak, substratlardaki serbest yağ asitleri konsantrasyonundaki farklılık ve enzimin substratta bulunan herhangi bir spesifik yağ asidine karşı spesifitesinin olmaması ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Çalışmada en yüksek katılım oranı, substrat mol oranı 6:1, sıcaklık 50-60 °C, süre 24-48 saat olarak belirlenmiştir (Carrin ve Crapiste, 2008).

Ancak bunula beraber Jennings ve Akoh (2000)'un pirinç kepeği yağına kaprik asit ilave ederek yapmış olduğu çalışmada aşırı substrat mol oranının, lipazın ortamda bulunan fazla miktardaki yağ asitlerini uzaklaştırmaya çalışırken aktif bölgesini doyumluğa ulaştırarak lipazın inhibisyonuna sebep olduğuna ve ürün miktarını etkilediğine dikkat çekmiştir. Bu sebeple reaksiyon süresi ve substrat mol oranı ayarlanarak optimum bir koşul elde edilmesi önerilmiştir. Çalışmada reaksiyon süresindeki artışın SDA katılımını arttırdığı görülmektedir. Reaksiyon süresinin artışı ile yağ asidi katılımının artması üzerine literatürde çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Literatürde yer alan ve Lipozyme® TL IM enziminin kullanıldığı çalışmalarda reaksiyon süresi arttırıldığında omega-3 yağ asitleri katılımında artış gözlenmiştir (Yang ve diğ., 2003a; Sahin ve diğ., 2005a; Can ve Özçelik, 2005). *C. antarctica* lipazının biyokatalizör olarak kullanıldığı ve hodan yağına DHA katılımı ile ilgili yapılan bir çalışmada ise katılımının 24 saate kadar arttığı belirlenmiştir (Senanayake and Shahidi, 1999). Ancak hodan yağına EPA ve kaprik asit ilavesi ile

ilgili yapılan diğ er bir çalışmada optimum katılım oranı olarak 40 saat belirtilmiştir (Akoh ve Moussata, 1998). Yapılan bir başka çalışmada, ay ı ek yağına palmitik ve stearik asit karışımının katılım oranının üç farklı sıcaklıkta(40, 50 ve 60  C) süre ile birlikte arttığı gözlenmiştir (Carrin ve Crapiste, 2008). Çalışmada optimum katılım miktarı 60  C’de ve 48 saat süre sonunda elde edilmiştir. Bu çalışmaya benzer olarak Kim ve diğ. (2001)’nin yapmış olduğı çalışmada Novozym 435 varlığında trikapriline konjuge linoleik asit (KLA) ilavesi yapılmıştır. Bu çalışmada da trikapriline/KLA oranı 1:3 olduğı durumda en yüksek KLA inkorporasyonu gerçekleşmiştir. Daha yüksek (1:5) substrat mol oranında açıl migrasyonun gerçekleşmesi ile katılım oranının düştüğü belirtilmiştir. Ayrıca Novozym 435 enzimi varlığında en yüksek KLA katılımı 10 saat reaksiyon süresi sonunda gerçekleşmiştir. Artan süre ile katılım oranının arttığı belirlenmiştir. (Kim ve diğ., 2001). Enzimatik modifikasyon reaksiyonlarının izlenmesinde ve yüksek verim elde edilmesinde rol oynayan optimum koşulların belirlenmesi ve prosesin tüm giderlerinin azaltılması için zaman parametresi son derecede önemlidir. Reaksiyon süresi enzim stabilitesini, enzimin substrata olan ilgisini ve ortamdaki diğ er rakip reaksiyonların baskınlığını etkilemektedir. Enzimlerin ısıya karşı dayanıklılıkları enzimlerin endüstriyel kullanımında bozunmalarını önlemek amacıyla dikkat edilen en temel faktördür (Carrin ve Crapiste, 2008; Senanayake ve Shahidi, 1999).

 z düşüm grafiklerinde reaksiyon sıcaklığındaki artış SDA katılım oranını arttırmakla birlikte, 55  C’den yüksek sıcaklıklarda SDA katılımının azaldığı gözlenmektedir. Can ve  z elik (2005)’in uzun zincirli omega-3 ÇDYA’nin fındık yağına katılımını inceledikleri çalışmada optimum sıcaklığa kadar sıcaklık artışı meydana geldiğinde omega-3 ÇDYA katılımında artış gözlenmiş ancak optimum noktanın üzerinde sıcaklık artışı ile katılım oranında düşüş olduğı gerçekleşmiştir. Yapılan diğ er bir çalışmada soya yağına kaprilik asit katılımının gerçekleştiğı deneylerde mol oranı, sıcaklık, süre ve lipaz enzimi miktarının etkisi incelenmiştir (Shuang, Jiang-Ke ve Yun-Jun, 2009)  alışma sonucunda sıcaklığın substrat çözünürlüğünü arttırdığı ve sıcaklık artışı ile katılım oranının arttığı belirlenmiştir. Ayrıca yüksek sıcaklıkların lipaz aktivitesi ve stabilitesini etkilediğı belirtilerek, söz konusu çalışma için optimum sıcaklık 35,8  C olarak ifade edilmiştir (Shuang, Jiang-Ke ve Yun-Jun, 2009).

Literatürde belirtilen katılım miktarlarının düşük olmasına sebep olarak, termodinamik bir proses olan açıl göçünün (“acyl migration”) sıcaklık artışına bağlı

olarak artması gösterilmektedir (Yang ve diğ., 2005). Enzim aktivitesi ve açıl göçü sıcaklığın maksimum orana ulaşana kadar artması ile artmaktadır. Bu olayın sebebi hidrojen bağlarının ve diğer zayıf etkileşimlerin sıcaklık hassasiyetlerinin enzimi üç boyutlu şekilde tutmayı sağlamasından kaynaklanmaktadır. Enzimatik modifikasyon reaksiyonlarında sıcaklığın artması sadece enzim aktivitesini değil, azalan substrat viskozitesi ile substrat ve enzim etkileşimini de arttırmaktadır (Senanayake ve Shahidi, 1999; Can ve Özçelik, 2005). Buna ek olarak, enzim ile reaktanlar arasındaki üretken çarpışmaların hızının yüksek sıcaklıklarda arttığı, dolayısıyla reaksiyon hızının arttığı, ancak daha yüksek sıcaklıklarda ise enzim inaktivasyon hızının enzim ve substratlar arasındaki üretken çarpışmaların hızını geçmesi sonucunda katılım oranında düşüş gözlemlendiği belirtilmektedir (Maduko, Akoh & Park, 2007).

Hedeflenen SDA (%5) katılımı için Modde 9.0 (Umetrics, İsveç) programı yardımıyla elde edilen optimum koşullar Çizelge 4.8’de belirtilmiştir. Çizelge 4.8’de verilen tüm deney noktalarından elde edilen veriler değerlendirilecek olunursa, en yüksek SDA katılım miktarı olan %5 değerini, 55 °C sıcaklık, 8,4 saat ve 6 mol/mol substrat mol oranında gerçekleşen reaksiyonlar sonucu elde edildiği görülmüştür.

Çizelge 4.8: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için Modde 9.0 (Umetrics, İsveç) programı ile elde edilen optimum koşullar.

Deney No	Sr (mol/mol)	T (°C)	t (saat)	Tahminlenen SDA katılımı, % mol
1	5,8	56,2	7,2	4,90
2	5,9	55,0	7,8	5,0
3	6,05	55,0	7,9	5,0
4	6,0	55,0	7,8	5,0
5	5,9	55,6	8,1	5,0
6	6,0	55,0	8,4	4,95
7	5,5	58,0	8,1	4,80

4.3.3 Modelin doğrulanması ve gram ölçekte üretim

Çalışmada elde edilen YY ile modelin doğruluğunun araştırılması için, intersterifikasyon reaksiyonları test tüplerinde optimum koşullarda gerçekleştirilmiş ve elde edilen YY’nin YA bileşimi belirlenmiştir. Modelin doğrulanmasında Modde 9.0 programının vermiş olduğu ve Çizelge 4.8’de belirlenen şartlar birbirine çok yakın olduğundan doğrulama reaksiyonları için iki koşul seçilerek reaksiyonlar

gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.9’da reaksiyon sonucu elde edilen SDA katılım oranları ile program tarafından tahminlenen SDA katılım oranları verilmektedir.

Çizelge 4.9: Optimum koşullarda elde edilen YY’nin SDA içeriği (% mol).

Deney No	Sr (mol/mol)	T (°C)	t (saat)	Tahminlenen SDA katılımı, % mol	Elde edilen SDA katılımı, % mol
2	5,9	55	7,8	5,0	4,86
6	6,0	55	8,4	4,95	4,90

Çizelge 9’dan da görüleceği üzere, enzimatik reaksiyonlar sonucunda elde edilen SDA katılım miktarları ile modelden tahminlenen SDA katılım miktarlarının birbirine yakın olduğu görülmektedir.

Buna ilaveten, reaksiyon sıcaklığının 55 °C, reaksiyon süresinin 8,4 saat ve substrat mol oranının 6 mol/mol olduğu koşul seçilerek gram ölçekte üretim yapılmıştır. Gram düzeyinde üretim için substrat miktarları mg düzeyine göre yaklaşık 40 kat arttırılarak enzimatik asidoliz reaksiyonları 250 ml’lik balonda gerçekleştirilmiştir.

Mg düzeyinde ve gram düzeyinde yapılan enzimatik reaksiyonlar sonucu elde edilen YY’lerin yağ asidi kompozisyonu ve sn-2 pozisyonundaki yağ asidi bileşimleri Çizelge 4.10’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10: Optimum koşullarda miligram ve gram düzeyinde üretilen YY’lerin yağ asidi ve sn-2 pozisyonundaki YA kompozisyonu (% mol)*.

	Miligram düzeyi		Gram düzeyi	
Yağ Asidi	TAG	Sn-2	TAG	Sn-2
C 16:0	10,99	2,09	11,71	2,05
C 18:0	3,43	2,0	3,05	2,04
C 18:1	42,17	58,62	42,65	58,46
C 18:2	13,7	10,10	13,56	10,24
C 18:3-n3	20,65	15,56	20,27	15,58
C 18:3-n6	3,79	5,45	3,51	5,50
C 18:4-n3	4,90	6,18	4,86	6,13
C 20:0	0,33	-	0,33	-
ΣDoymuş YA	14,7	4,1	15	4,0
ΣDoymamış YA	85,2	95,9	84,8	95,9
ω6/ω3	0,6	0,7	0,6	0,7

*: T: 55 °C, t: 8,4 s., Sr: 6:1 mol/mol

Çizelge 4.14’de görüldüğü üzere optimum koşullarda gerçekleşen mg ve g ölçekte elde edilen YY’lerin içerdiği SDA miktarı sırasıyla % 4,90 ve % 4,86 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen YY’lerin SDA miktarının modelden tahminlenen değerlere

yakın olduğu görülmektedir. Elde edilen YY'ların zeytinyağında bulunmayan ve asidoliz reaksiyonları sonucunda yapısına katılan SDA yanında esansiyel omega-3 yağ asitlerinden ALA, ve omega-6 yağ asitlerinden GLA ile de zenginleştiği ve esansiyel omega-6 yağ asitlerinden olan LA'nın miktarının arttığı görülmektedir.

Ayrıca, mg düzeyinde ve gram düzeyinde elde edilen YY'lerin sn-2 pozisyonunda en yüksek miktarda oleik asidin bulunduğu, SDA miktarının yaklaşık % 6 oranında bulunduğu görülmektedir.

Aynı zamanda, her iki durumda da elde edilen yapılandırılmış yağların omega-6/omega-3 YA oranları incelendiğinde, 0,6 oranının önerilen değere göre çok daha iyi oranda olduğu görülmektedir.

4.3.4 Oksidatif stabilite indeksi (OSI)

Enzimatik reaksiyonlarda substrat olarak kullanılan zeytinyağı, engerek otu tohumu yağı ve büyük ölçekte üretilen yapılandırılmış yağın oksidatif stabilitelerine ait Ransimat cihazı ile elde edilen indüksiyon süreleri Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11: Deneyisel çalışmalarda kullanılan yağ kaynaklarının ve büyük ölçekte üretilen YY'nin indüksiyon süreleri.

Yağ Çeşidi	İndüksiyon Süresi (saat)
Zeytinyağı	10,9
Engerek otu tohumu yağı	3,5
YY	0,3

Oksidatif stabilite özellikle doymamış yağ içeren yenilebilir yağların ve gıda maddelerinin kalitesinin belirlenmesindeki en önemli faktördür (Martin ve diğ., 2010). Gıdalarda yer alan çeşitli yağ bileşenlerinin oksidasyonu gıdaların besinsel değerini düşürmekte, istenmeyen koku ve tat oluşumuna neden olmakta ve gıdaların raf ömrünü azaltmaktadır (Bartee ve diğ., 2007).

Bu çalışmada büyük ölçekte üretimi gerçekleştirilen YY'nin, zeytinyağı ve engerek otu yağına göre daha düşük oksidatif stabiliteye sahip olması, YY'nin bileşiminde yüksek oranda oleik asit, ALA, SDA, GLA ve LA gibi çoklu doymamış yağ asitlerinin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü, YY'lerdeki TAG'ların yağ asidi kompozisyonu, gliserol molekülündeki pozisyonel dağılımı ve bu iki faktörün birbiri ile etkileşimi YY'lerin oksidatif stabilitesini etkileyen önemli parametrelerdir (Martin ve diğ., 2010).

Literatürde mevcut olan birçok çalışmada, başlangıç yağ kaynağı ile karşılaştırılan YY'lerin oksidatif stabilitelerinde azalma olduğu belirtilmiştir (Martin ve diğ., 2010). Seriburi ve Akoh (1998)'un, plastik yağ üretimi için domuz yağı ve yüksek-oleik asit içeren ayçiçek yağının kullanıldığı enzimatik reaksiyonlar sonucunda, %84,7 oranında oleik asit içeren yüksek-oleik asitli ayçiçek yağının, %40,9 oleik asit ve %23,7 palmitik asit (sn-2 pozisyonunda %63,4 palmitik asit) içeren domuz yağından daha yüksek oksidatif stabiliteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, domuz yağı ve yüksek-oleik asit içeren ayçiçek yağı içeren fiziksel yağ karışımının YY karışımından daha stabil olduğu, interesterifikasyon reaksiyonunun fiziksel yağ karışımının oksidatif stabilitesini düşürdüğü belirtilmiştir. Bunun nedeni, SYA tayininden artakalan sabun ve/veya ürün karışımının saflaştırılması esnasında tokoferollerin de uzaklaştırılması ile açıklanmaktadır.

Yapılan diğer bir çalışmada ise aspir yağına KLA ilavesi ile yapılandırılmış yağ elde edilerek oksidatif stabilite açısından değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre YY'nin aspir yağına göre daha düşük oksidatif stabiliteye sahip olduğu belirlenmiştir. YY'nin içermiş olduğu KLA miktarının yükselmesi YY'nin oksidatif stabilitesinin düşmesine neden olduğu belirtilmiştir. Bunun nedeni olarak konjuge çift bağların, konjuge olmayan çift bağlara göre otooksidasyona daha yatkın olması gösterilmektedir. Ayrıca enzimatik reaksiyon süresince aspir yağının başlangıç tokoferol içeriğinin 59,7 mg/100 g yağ'dan % 85 oranında azalmasının, oksidatif stabilitenin azalmasına da sebep olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada ayrıca düşük oksidatif stabiliteyi arttırmak için farklı oranlarda (100, 200 ve 300 ppm) biberiye ekstraktları ilave edilmiştir. Sonuç olarak biberiye ekstraktları oksidatif stabiliteyi arttırmış ve en yüksek oksidatif stabilitenin 300 ppm biberiye ekstraktı ilavesinde elde edildiği belirtilmiştir (Lee ve diğ., 2004).

Nielsen ve diğ. (2006) yapmış oldu bir çalışmada domuz yağı ve soya yağından elde edilen yağ asitleri kullanılarak anne sütü benzeri yapılandırılmış yağ elde edilmiştir. Bu çalışmada YY, ticari anne sütüne benzer yağ, standart domuz yağı ve L06 ve L07 olarak adlandırılmış bitkisel yağlar ile oksidatif stabiliteleri açısından kıyaslanmıştır. Bu çalışmaya göre oksidatif stabilite en yüksek bitkisel yağlar ve ticari anne sütüne benzer yağda olmuş, bunu domuz yağı ile yapılandırılmış yağ takip etmiştir. Yapılandırılmış yağın diğer yağlarla kıyaslandığında, düşük oksidatif stabiliteye sahip olmasının sebebi yüksek linoleik içeriğinden ve düşük antioksidan içeriğinden

kaynaklandığı belirtilmiştir. Domuz yağının oksidatif stabilitesinin düşük olması ise kesim ve parçalama işlemleri sırasında oluşan peroksitlerin ortamdaki uzaklaştırılamamış olmasından kaynaklanabileceği şeklinde açıklanmıştır.

Maduko ve diğ.'nin (2008) yapmış olduğu çalışmada ise hindistancevizi, aspir ve soya fasülyesi yağı karışımı (B1) ve hindistancevizi, aspir, soya fasülyesi ve balık yağı içeren karışımın (BFO) yağ kaynağı olarak kullanıldığı enzimatik reaksiyonlar ile anne sütü yağına benzer YY üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan oksidatif stabilite analizleri sonucunda yüksek oranda doymuş yağ içeren hindistancevizi yağının diğer yağlar içinde en yüksek, balık yağının ise yüksek miktarda doymamış yağ içeriğinden ötürü en düşük oksidatif stabiliteye sahip olduğu tespit edilmiştir. B1 ve BFO yağ karışımlarından enzimatik yöntemle elde edilen YY'nin oksidatif stabiliteyi yağ kaynakları olan B1 ve BFO'ya göre düşük bulunmuştur. Elde edilen YY'nin düşük stabiliteye olması, kısa-yollu distilasyon işlemi sırasında tokoferol ve fosfolipitlerin de uzaklaştırılması ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Ancak, YY'lere eklenen tokoferollerin YY oksidatif stabilitesini arttırdığı ve yağ kaynakları olan B1 ve BFO ile kıyaslanabilir düzeylerde oksidatif stabiliteye sahip olduğu gözlenmiştir.

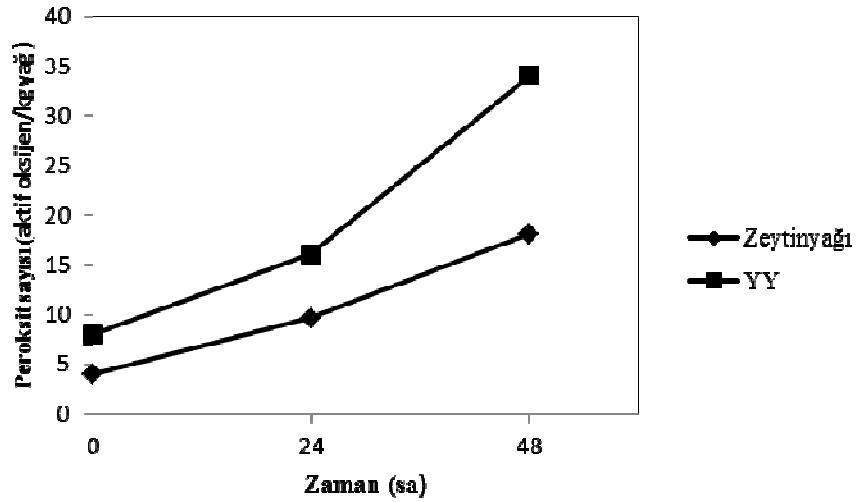
Yüksek oranda doymamış yağ asitleri içeren yapılandırılmış yağlar veya bu yağları içeren gıda maddeleri depolama süresince bozulabilir ve ayrıca oksidasyonun varlığını gösteren kötü tat ve koku oluşumuna neden olabilir (Martin ve diğ., 2010). Literatürde var olan birçok çalışma, saflaştırma işleminden sonra ve enzimatik reaksiyon sırasında tokoferoller gibi doğal antioksidanların uzaklaştırılmasından ötürü YY'lerin oksidatif stabilitesinin azaldığını göstermektedir (Jennings ve Akoh, 2009; Lee ve diğ., 2004; Nielsen ve diğ., 2006; Seriburi ve Akoh, 1998). Üretilen YY'ler gıda ürünlerinde kullanılacağı için bu gıdaların kabul edilebilir duyuşal özellikte olması bakımından, YY'lerin geleneksel yağlarla kıyaslandıklarında kabul edilebilir duyuşal kalite ve oksidatif stabiliteye sahip olmaları önemlidir. Bu nedenle ürün formülasyonlarına antioksidanların eklenmesi önerilmektedir (Lee ve diğ., 2004; Nielsen ve diğ., 2004; Nielsen ve diğ., 2006). Bu çalışma sonucunda da üretim ve saflaştırma sırasında antioksidanların uzaklaştırılmış olmasından dolayı yüksek oksidatif stabiliteye sahip yağ eldesi için ileriki çalışmalarda yağa antioksidan ilavesinin yapılması önerilmektedir.

4.3.5 Yağların oksidasyon ürünleri

Oksidatif stabilite indüksiyon zamanının, peroksit sayısının ve *p*-anisidin değerinin belirlenmesi ve TOTOX değerinin hesaplanması ile ifade edilir (Akoh ve Moussata, 2001; Maduko, Park ve Akoh, 2008; Lee, Shin, Lee ve Lee; 2004; Pina-Rodriguez ve Akoh, 2009).

Peroksit sayısı

Zeytinyağı ve YY'nin peroksit sayısındaki değişimler Şekil 4.5'de verilmektedir.



Şekil 4.5: Yapılandırılmış yağın ve zeytinyağın 48 saat süre içindeki peroksit sayısındaki değişimi.

Şekilde de görüldüğü gibi zeytinyağının başlangıç (4 aktif oksijen/kg yağ) ve 48 saat süre sonunda elde edilen peroksit sayısı (18,1 aktif oksijen/kg yağ) YY'e göre çok düşüktür. Oksidasyon sürecinde peroksit sayısındaki ndeki en düşük artış zeytinyağında tespit edilmiştir. Bu durumun sebebi yapılandırılmış yağın aksine zeytinyağında bulunan düşük oranlardaki doymamış yağ asitlerinden kaynaklanmaktadır.

YY'nin başlangıç peroksit sayısı zeytinyağının başlangıç değerinden % 50 oranında daha fazla olduğu belirlenmiştir. Yüksek oranlardaki başlangıç peroksit sayısı birincil oksidasyon ürünlerinin yüksek olduğuna işaret etmektedir. Yüksek oranlardaki birincil oksidasyon ürünleri oksidasyon prosesinin daha hızlı

ilerlemesine sebep olmaktadır. YY'ın içermiş olduğu ÇDYA peroksit sayısında en fazla artışa neden olmuştur (Martin, Reglero and Señoráns, 2010).

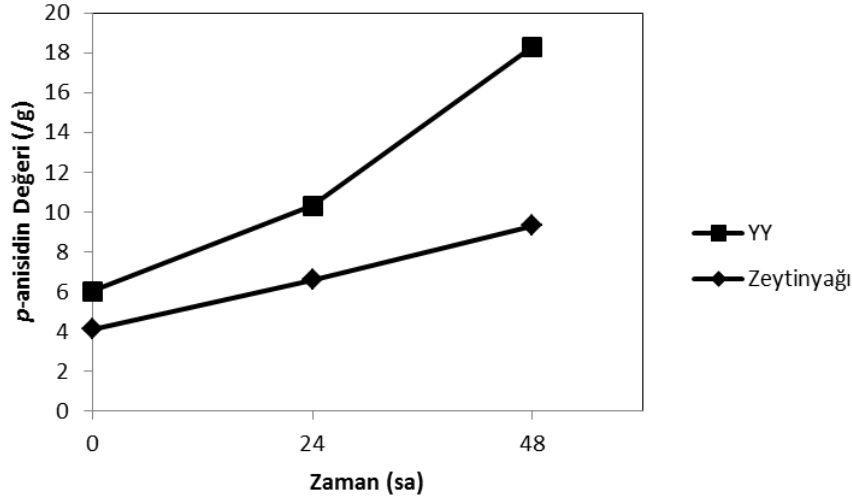
Ayrıca, zeytinyağında yağ oksidasyonunu içermiş olduğu tokoferoller, karatenoidler, fenolik bileşikler gibi çeşitli antioksidanlar sayesinde geciktirilebilmekte ya da önlenebilmektedir. Fenolik bileşiklerin tokoferollere göre oksidasyonu önlemede daha etkili oldukları belirtilmektedir. Bu nedenle tokoferollerin ya da fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması YY'da oksidatif bozulmalara sebep olmaktadır (Lee, Akoh, Chung and Kim, 2006). Literatürde yapılmış birçok çalışmada YY'nin oksidatif stabilitelerinde başlangıç yağların oksidatif stabilitelerine göre azalma olduğu tespit edilmiştir.

Nielsen, Xu, Timm-Heinrich ve Jacobsen (2004)'in yapmış olduğu çalışmada balık yağına kaprilik asit ilavesiyle elde edilen YY'nin oksidatif stabilitesinin düşük olduğu belirtilmiştir. Ayrıca kanola yağına kaprilik asit ve balık yağına kaprilik asit ilavesiyle elde edilen yapılandırılmış yağların her ikisinin de peroksit sayılarının başlangıç yağlarına göre yüksek olduğu tespit edilmiştir (Akoh and Moussata, 2001).

Turan, Karabulut ve Vural (2007)'in soya yağına kaprilik asit ilavesi ile elde ettiği YY'nin peroksit sayısı başlangıç yağına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda enzimatik sentezin ve deasidifikasyon için kullanılan alkali işlemlerinin doğal antioksidanlara zarar verdiği ve böylece yüksek peroksit sayısı sebep olduğu belirtilmiştir. Lee, Shin, Lee ve Lee (2004)'nin aspir yağına konjuge linoleik asit (KLA) ilavesi ile elde ettiği YY'nin 20 gün süre ile oksidatif stabilitesi belirlenmiştir. Çalışma sonucunda YY'nin başlangıç peroksit sayısının ve diğer tüm günlerdeki peroksit sayısının başlangıç yağına göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aspir yağının oksidasyona daha dayanıklı olduğu ve daha düşük peroksit sayısına sahip olduğu belirlenmiştir. Aspir yağı ile aspir yağından elde edilen YY arasındaki peroksit sayısındaki farkın farklı tokoferol içeriği ve YY'nin TAG yapısına eklenen KLA miktarı ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir. Yakın zamanlarda yapılan çalışmalarda aspir yağı, hindistancevizi yağı, soya yağı ve balık yağından üretilen YY'nin (Maduko, Park ve Akoh, 2008), pirinç kepeği yağına kaprilik asit ilavesiyle elde edilen YY'nin (Jennings ve Akoh, 2009) ve zeytinyağına omega-3 ÇDYA ilavesi ile üretilen YY'nin (Kahveci, Can ve Özçelik, 2009) oksidatif stabiliteleri başlangıç yağlarına oranla yüksek olarak tespit edilmiştir.

***p*-anisidin değeri**

p-anisidin değeri yağlarda bulunan karbonil bileşiklerinin belirlendiği ve yağın geçmişi ile ilgili bilgi veren bir analizdir (Shahidi ve Wanasundra, 2002; Osborn ve Akoh, 2003). Şekil 4.6'da 48 saat süre ile zeytinyağı ve YY'nin *p*-anisidin değerindeki değişim verilmektedir.



Şekil 4.6: Yapılandırılmış yağın ve zeytinyağının 48 saat süre içindeki *p*-anisidin değerlerindeki değişimi.

Şekil 4.6'dan zeytinyağın başlangıç *p*-anisidin değerinin (4,1/gr), YY'ye göre çok düşük olduğu görülmektedir. 50°C'de 48 saat süre boyunca gerçekleşen oksidasyondan sonra, zeytinyağının *p*-anisidin değeri 9,3/gr'a ulaşmıştır. YY ise bu oksidasyon süreci sonucunda 18,3/gr değerine ulaşmıştır.

YY'daki yüksek *p*-anisidin değeri yüksek oranda meydana gelen ikincil oksidasyon ürünleri ile ilişkilidir. Yağlara antioksidan ilavesinin indüksiyon periyodunu uzattığı gibi peroksit sayısı ve *p*-anisidin değeri düşürmektedir (Osborn & Akoh, 2003). Antioksidan olarak tokoferol ilavesinin hızlanmış oksidasyon süresince *p*-anisidin değerine olumlu etkisi olacağı bildirilmiştir (Maduko, Park & Akoh, 2008). Lee, Shin, Lee ve Lee (2004) aspir yağı ve aspir yağına KLA ilave edilmiş YY'nin *p*-anisidin değeri 20 gün süre boyunca incelemiştir. Çalışma sonucunda YY'nin başlangıç ve 20 gün süre içerisinde belirlenen *p*-anisidin değerinin aspir yağına oranla çok yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmada çeşitli oranlarda (100, 200 or 300 ppm) biberiye ekstraktları eklenerek *p*-anisidin değerindeki değişim tespit

edilmiştir. Çalışma sonucuna göre biberiye ekstraktı eklenen yağların p-anisidin değerinin düşük olduğu tespit edilmiştir. En düşük p-anisidin değeri 300 ppm biberiye ekstraktı ilavesinde elde edilmiştir. Lee, Lee, Akoh, Chung ve Kim (2006) naturel sızma zeytinyağı ve KLA'dan elde edilen YY'nin oksidatif stabilitesinin belirlenmesi üzerine bir çalışma yapmıştır. 60 °C'de, 20 gün süreyle yapılan oksidatif stabilite analizi sonucu YY'nin p-anisidin değeri zeytinyağına oranla yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum zeytinyağında bulunan doğal antioksidanların (% 97) ve tokoferolün (% 56) azalması ve iki konjuge çift bağ içeren KLA zeytinyağına inkorporasyonun gerçekleşmesi ile ortaya çıktığı belirtilmiştir.

Toplam antioksidan (TOTOX) değeri

TOTOX değeri peroksit sayısı ve p-anisidin değerinin kombinasyonundan meydana gelmekte ve yağların toplam oksidatif stabilitesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Çalışma sonucunda oksidatif stabilite analizinin başlangıcında zeytinyağının TOTOX değeri (12,1) YY'ye (22) göre daha düşük oranlarda olduğu belirlenmiştir. 50°C'de 24 saat sonunda zeytinyağının ve YY'nin TOTOX değeri sırasıyla 25,8 ve 42,3'e ulaşmıştır. 48 saat süre sonunda ise bu değerler zeytinyağı ve YY için sırasıyla 45,5 ve 86,3 değerine ulaşmıştır. Beklenildiği gibi YY'nin TOTOX değeri zeytinyağın TOTOX değerine göre yüksek olarak tespit edilmiştir. Buna sebep olarak YY'de peroksit sayısı ve p-anisidin değerini etkileyen ve enzimatik sentez ile deasidifikasyon prosesleri sonucu azalan antioksidan içeriği düşünülmektedir. Bu durumda yağlar oksidasyon sürecine dayanıksız hale gelmektedir. Yapılan birçok çalışmada YY'nin TOTOX değeri başlangıç yağına göre yüksek olarak belirlenmiştir (Wanasundara & Shahidi, 1999; Lee, Lee, Akoh, Chung & Kim, 2006; Osborn ve Akoh, 2003; Maduko, Park ve Akoh, 2008; Pina-Rodriguez ve Akoh, 2009). Lee, Lee, Akoh, Chung ve Kim (2006) yaptığı çalışmada tokoferol ilavesinin YY'nin oksidatif stabilitesini arttırdığı belirlenmiştir.

5. SONUÇ

Yapılan çalışmada, ülkemizde yaygın bir şekilde yetişen ancak yağ kaynağı olarak değerlendirilmeyen engerek otu tohum yağı yağ asitleri ve ülkemizde yine yaygın olarak tüketilen zeytinyağı kullanılarak sn-1,3 spesifik lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimeleri ile ÇDYA açısından zengin yapılandırılmış yağ üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen enzimatik asidoliz reaksiyonları *Thermomyces lanuginosus*'dan elde edilen ve sn-1,3 spesifik bir lipaz olan Lipozyme® TL IM enzimi tarafından katalizlenmiştir. Ayrıca, seçilen reaksiyon parametreleri olan reaksiyon sıcaklığı (T, °C), reaksiyon süresi (t, saat) ve substrat mol oranının (Sr, mol/mol) reaksiyon ürünleri üzerindeki etkisini incelemek üzere Tepki Yüzey Yöntemi (TYYY) kullanılarak 3 faktörlü, 5 seviyeli Merkezil Birleşik Deney Tasarımı kullanılmıştır. Reaksiyonlar sonucunda seçilen tepki [SDA miktarı (%)] için kuadratik model elde edilmiştir.

Optimum deney koşulu olarak sıcaklık 55 °C, süre 8,4 saat ve substrat mol oranı 6 mol/mol olarak seçilmiştir. Belirlenen optimum koşulda mg ve gram ölçekte elde edilen YY'nin SDA miktarları sırasıyla %4,9 ve %4,86 olarak bulunmuştur. Bu değerlerin modelden tahminlenen SDA miktarı (%5) ile benzer olduğu görülmüştür. Sn-2 pozisyonel analizi gerçekleştirilen mg ölçekte ve g ölçekte üretilen YY'lerin sn-2 pozisyonundaki yaklaşık SDA miktarı % 6 olarak bulunmuştur. Yapılan bu analizlere ek olarak, g ölçekte üretilen YY'nin oksidatif stabilitesi belirlenmiş ve indüksiyon süresi 0,3 saat olarak bulunmuştur. Peroksit sayısı, p-anisidin değeri, TOTOX değeri sonucunda YY'nin zeytinyağına göre çok daha düşük oksidatif stabiliteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, YY'nin oksidatif stabilitesinin artırılması için çeşitli doğal antioksidanların eklenmesi önerilmektedir.

Bu çalışma sonucunda katma değeri yüksek ve biyoteknoloji ürünü olan, sağlık üzerindeki olumlu etkileri bilinen SDA ve diğer çoklu doymamış yağ asitleri ile zenginleştirilmiş olan fonksiyonel yağın enzimatik olarak üretilmesi ve elde edilen bu yağların gerek doğrudan tüketimi gerekse çeşitli fonksiyonel gıdaların bileşiminde kullanılması potansiyel kullanım alanları olarak düşünülmektedir. Elde edilen

YY'nin, salata sosu, mayonez, sürülebilir yağ, margarin vb. ürünlerin formülasyonlarında kullanılarak bu ürünlere fonksiyonel özellik kazandırabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ackman, R. G.**, 2008. Fatty acids in fish and shellfish, in *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, pp. 155-180, Ed. Chow, C. K., CRC Press, New York.
- Akoh, C. C., and Moussata, C.O.** 1998: Lipase-catalyzed modification of borage oil: incorporation of capric acid and eicosapentaenoic acids to form structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 6, 697-701.
- Akoh, C. C. and Moussata, C. O.** 2001: Characterization and oxidative stability of enzymatically produced fish and canola oil-based structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78**, 25-30.
- Akoh, C. C., Sellappan, S., Fomuso, L. B. and Yankah, V. V.**, 2002. Enzymatic synthesis of structured lipids, in *Lipid Biotechnology*, pp. 251-280, Ed. Gardner, H. W. and Min Kuo, T., CRC Press, New York.
- Akoh, C.C.**, 2002. Structured lipids, in *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, pp. 877-908, Ed Akoh, C.C. and Min, D.B., CRC Press, New York.
- Akoh, C.C.**, 2005. Structured and specialty lipids, in *Healthful Lipids*, pp. 591-606, Ed. C. C. Akoh and O. M. Lai, AOCS Press, Urbana.
- Akoh, C. C. ve Kim, B. H.**, 2008. Structured lipids, in *Food Lipids, Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, pp. 848-863, Ed. Akoh, C.C. and Min, D.B., CRC Press, New York.
- Akova, A. ve Üstün, G.**, 2002: Boraj yağının enzimatik hidrolizi ile gamma-linolenik asit zenginleştirilmesi, *İTÜ Dergisi/d mühendislik*, **1**, 1, 15-20.
- AOAC International**, 2000. Saponification Number (Koettstorfer Number) of Oils and Fats, AOAC Official Method 920.160.
- AOCS International**, 1998. Peroxide Value Acetic Acid-Chloroform Method, Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society Official Method Cd 8-53.
- AOCS International**, 1998. p-Anisidine Value, Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society Official Method Cd 18-90.
- Berti, M., Johnson, B. L., Dash, S., Fischer, S. Wilckens, R. and Hevia, F.**, 2007. Echium: a source of stearidonic acid adapted to the northern great plains in the US, in *Issues in New Crops and New Uses*, pp. 120-125, Eds J. Janick and A. Whipkey, ASHS Press, Alexandria.

- Bhathena, S. J.**, 2008. Fatty acid metabolism in diabetes, in *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, pp. 1151-1171, Ed. C. K. Chow, CRC Press, New York.
- Brenna, J. T., Salem, N., Sinclair, A. J. and Cunnane, S. C.**, 2009: A-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in humans, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **80**, 2-3, 85-91.
- Bolat, U. Y.** 2009. Türkiye’de Yetişen *Echium vulgare* tohumlarının ve Yağının Karakterizasyonu, *Lisans Tezi*, İTÜ, İstanbul, Türkiye.
- Branco de Araújo, M. E. M., Campos, P. R. B., Noso, T. N., Alberici, R. M., Cunha, I. B. S., Simas, R. C., Eberlin, M. N. and Carvalho, P. O.**, 2011: Response surface modelling of the production of structured lipids from soybean oil using *Rhizomucor miehei* lipase, *Food Chemistry*, **127**, 28-33.
- Breslow, J.L.**, 2006: N-3 fatty acids and cardiovascular disease, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **83**, 6, 1477–1482.
- Can, A. ve Özçelik, B.**, 2005: Enrichment of hazelnut oil with long-chain n-3 pufa by lipase-catalyzed acidolysis: optimization by response surface methodology, *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, **82**, 1, 27-32.
- Carrin, M. E. and Crapiste, G. H.**, 2008: Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic–stearic acid mixture, *Journal of Food Engineering*, **84**, 2, 243–249.
- Chapkin, R.S.**, 2008. Reappraisal of the essential fatty acids, in *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, pp. 675-683, Ed. C. K. Chow, CRC Press, New York.
- Chen, B., Zhang, H., Cheong, L-Z., Tan, T. and Xu, X.**, 2010: Enzymatic production of aba-type structured lipids containing omega-3 and medium-chain fatty acids: effects of different acyl donors on the acyl migration rate, *Food and Bioprocess Technology*, Peer reviewed article in press.
- Chopra, R., Rastogi, N. K. and Sambaiah, K.**, 2009: Enrichment of rice bran oil with α -linolenic acid by enzymatic acidolysis: optimization of parameters by response surface methodology, *Food and Bioprocess Technology*, Peer reviewed article in press.
- Clough, P.M.**, 2001. Specialty vegetable oils containing gamma-linolenic acid and stericidonic acid, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 75-117, Ed Gunstone, F.D., Marcel Dekker Inc., New York.
- Coupland, K. and A. Hebard.**, 2002: Stearidonic acid containing plant-seed oils: their potential for use in healthy foods. *93rd AOCS Annual Meeting and Expo*, May 5–8, Montreal- Quebec, Canada.
- Coupland, K.**, 2008: Stearidonic acid: A plant produced omega3 PUFA and a potential alternative for marine oil fatty acids. *Lipid Technology*, **20**, 7, 152-154.

- Czaplicki, S., Zadernowski, N. and Ogrodowska, D.,** 2009: Triacylglycerols from viper bugloss (*Echium vulgare* L.) seed bio-oil, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111**, 12,1266-1269.
- Firestone, D.,** 2005. Olive oil in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, pp. 317-318, Ed. F. Shahidi, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Foresti, M.L. and Ferreira, M. L.,** 2010: Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses, *Enzyme and Microbial Technology*, **46**, 419-429.
- Gebauer, S., Harris, W. S., Kris-Etherton, P. M. and Etherton, T. D.,** 2005. Dietary n-6:n-3 fatty acid ratio and Health, in *Healthful Lipids*, pp. 221-248, Ed. C. C. Akoh ve O. M. Lai, AOCS Press Urbana, Illinois.
- Geleijnse, J. M., Giltay, E. J., Grobbee, D. E., Donders, A. R., and Kok, F. J.,** 2002: Blood pressure response to fish oil supplementation: meta-regression analysis of randomized trials. *Journal of Hypertension*, **20**, 1493-1499.
- Gomez Candela, C., Bermejo Lopez, L. M. and Loria Kohen, V.,** 2011: Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. Nutritional recommendations. *Nutrición Hospitalaria*, **26**, 323-329.
- Gunstone, F.D.,** 2001. Procedures used for lipid modification, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 11-36, Ed. F.D. Gunstone, Marcel Dekker Inc, New York.
- Guil-Guerrero, J. L., García Maroto, F. F. and Giménez Giménez, A.,** 2001: Fatty acid profiles from forty-nine plant species that are potential new sources of γ -linolenic acid, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78**, 7, 677-684.
- Guil-Guerrero, J.L.,** 2007: Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, Nutritional Importance, Medical Uses and Natural Sources, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**, 12, 1226-1236.
- Hamosh, M.,** 2008. Fatty acids and growth and development, in *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, pp. 899-922, Ed. C. K. Chow, CRC Press, New York.
- Harris, V. S., Lemke, S. L., Hansen, S. N., Goldstein, D. A., DiRienzo, M. A., Su, H., Nemeth, M. A., Taylor, M. L., Ahmed, G. and George, G.,** 2008: Stearidonic acid-enriched soybean oil increased the omega-3 index, an emerging cardiovascular risk marker, *Lipids*, **43**, 9, 805-811.
- Hoy, C.E. and Xu, X.,** 2001. Structured triacylglycerols, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 209-239, Ed. Gunstone, F.D., Marcel Dekker, New York.
- Hou, C. T.,** 2002. Industrial uses of lipases in *Lipid Biotechnology*, pp. 357-387, Ed. Kuo, T.M. and Gardner, H.W., CRC Press, New York.
- Jennings, B. H. and Akoh, C. C.,** 1999: Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to

- produce structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **76**, 1133-1137.
- Jennings, B.H., and Akoh, C.C.**, 2000: Lipase-Catalyzed Modification of Rice Bran Oil to Incorporate Capric Acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 4439-4443.
- Jennings, B. H. and Akoh, C. C.**, 2009: Effectiveness of natural versus synthetic antioxidants in a rice bran oil-based structured lipid, *Food Chemistry*, **114**, 1456-1461.
- Jiménez, M. J., Esteban, L., Robles, A., Hita, E., González, P. A., Munío, M. M. and Molina, E.**, 2010: Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position by lipase-catalyzed acidolysis, *Biochemical Engineering Journal*, **51**, 172-179.
- Kahveci, D.**, 2005. Zeytinyağının lipaz enzimi kullanılarak uzun zincirli çoklu doymamış omega 3 yağ asitlerince zenginleştirilmesi, Bitirme Ödevi, İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi, İstanbul.
- Kahveci, D., Can, A. & Özçelik, B.**, 2009: Production of lipase-catalyzed structured lipid from olive oil with omega-3 polyunsaturated fatty acids, *Food Science and Biotechnology*, **18**, 79-83.
- Karupaiah, T. Noor, M. İ. and Sundram, K.**, 2005. Dietary fatty acids and their influence on blood lipids and lipoproteins, in *Healthful Lipids*, pp. 171-203, Eds. C. C. Akoh and O. M. Lai, AOCS Press, Urbana, Illinois.
- Kelley, D.S. and Vemuri, M.**, 2008. The effects of dietary fatty acids on lipid metabolism, in *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, pp. 591-611, Ed. C. K. Chow, CRC Press, New York.
- Kim, I.-H., Yoon, C., Cho, S., Lee, K., Chung, S., & Tae, B.**, 2001: Lipase-catalyzed incorporation of conjugated linoleic acid into tricaprylin, *Journal of the American Oil Chemistry Society*, **78**, 547-551.
- Lai, O.M., Low, C.T. and Akoh, C. C.**, 2005: Lipase-catalyzed acidolysis of palm olein and caprylic acid in a continuous bench-scale packed bed bioreactor, *Food Chemistry*, **92**, 527-533.
- Lee, J-H., Shin, J-A., Lee, J-H. and Lee, K-T.**, 2004: Production of lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts, *Food Research International*, **37**, 967-974.
- Lee, J-H. and Lee, K-T.**, 2005. Structured lipids production, in *Handbook of Functional Lipids*, pp. 489-511, Ed. C. C . Akoh, CRC Press, USA.
- Lee, J-H., Lee, K-T., Akoh, C.C., Chung, S. K. ve Kim, M.R.** 2006: Antioxidant evaluation and oxidative stability of structured lipids from extra virgin olive oil and conjugated linoleic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 5416-5421.
- Lapillonne, A. and Jensen, C. L.**, 2009: Reevaluation of the DHA requirement for the premature infant, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **81**, 143-150.

- Lobb, K. and Chow, C. K.**, 2008. Fatty acid classification and nomenclature, in *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, pp. 1-15, Ed. C. K. Chow, CRC Press, New York.
- Lumor, S. E. and Akoh, C. C.**, 2005: Enzymatic incorporation of atearic acid into a blend of palm olein and palm kernel oil: optimization by response surface methodology, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **82**, 412-426.
- Maduko, C. O, Akoh, C. C. and Park, Y. W.**, 2007: Enzymatic production of infant milk fat analogs containing palmitic acid: optimization of reactions by response surface methodology, *Journal of Dairy Science*, **90**, 2147-2154.
- Maduko, C. O and Akoh, C. C.**, 2008: Characterization and oxidative stability of structured lipids: infant milk fat analog, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **85**, 197-204.
- Marangoni, A.G.**, 2002. Lipases: structure, function, and properties, in *Lipid Biotechnology*, pp. 357-387, Eds. Kuo, T.M. and Gardner, H.W., Marcel Dekker Inc., New York.
- Martin, D., Reglero, G. and Señoráns, F.J.**, 2010: Oxidative stability of structured lipids, *European Food Research and Technology*, **231**, 635-653.
- Miller, C.C. and Ziboh, V.A.**, 1998: Gamma-linolenic acid-enriched diet alters cutaneous eicosanoids, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **154**, 3, 967- 974.
- Montgomery, D. C.**, 2005. Design and Analysis of Experiments, John Wiley & Sons, New York.
- Nagao, K. and Yanagita, T.**, 2010: Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome, *Pharmacological Research*, **61**, 3, 208–212.
- Nettleton, J. A. and Katz, R.**, 2005: N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: A review, *Journal of the American Dietetic Association*, **105**, 3, 428-440.
- Nielsen, N. S., Xu, X., Timm-Heinrich, M. and Jacobsem, C.**, 2004: Oxidative stability during storage of structured lipids produced from fish oil and caprylic acid, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **81**, 375-384.
- Nielsen, N. S., Yang, T. Xu, X. and Jacobsem, C.**, 2006: Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor, *Food Chemistry*, **94**, 53-60.
- Oh, J., Lee, K., Park, H., Kim, J., Kwon, K., Kim, J., Kim, H., and Kim, I.**, 2009: Lipase-catalyzed acidolysis of olive oil with capric acid: effect of water activity on incorporation and acyl migration, *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, **57**, 19, 9280–9283.
- 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*, **1**, 3, 93-103.

- Osborn, H. T. ve Akoh, C. C.**, 2003: Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid based oil-in-water emulsions, *Food Chemistry*, **84**, 451-456.
- O’Keefe, S. F.**, 2002. Nomenclature and classification of lipids, in: *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, pp. 1-2, Eds. C. C. Akoh and D. B. Min, CRC Press, New York.
- Özcan, T.**, 2008: Analysis of the total oil and fatty acid composition of seeds of some Boraginaceae taxa from Turkey, *Plant Systematics and Evolution*, **274**, 143-153.
- Park, Y., Albright, K. J., Storkson, J. M., Liu, W., Park, Y. and Pariza, M. W.**, 2007: Influence of stearidonic acid on lipoprotein secretion and fatty acid composition in hepg2 cells, *Journal of Food Lipids*, **14**, 4, 366-376.
- Paiva, A. L., Balcao, V.M., Malcata F.X.**, 2000: Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme and microbial technology*, **27**, 187-204.
- Pina-Rodriguez, A. M and Akoh, C. C.**, 2009: Enrichment of amaranth oil with ethyl palmitate at the sn-2 position by chemical and enzymatic synthesis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 11, 4657–4662.
- Rao, R. B., Manohar, Sambaiah, K. ve 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**, 9: 885–890.
- Rincon-Cervera, M. A. and Guil-Guerrero, J. L.**, 2010: Preparation of stearidonic acid-enriched triacylglycerols from *Echium plantagineum* seed oil, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **112**, 227-232.
- Ruiz-Lopez, N., Haslam, R. P., Venegas-Calero’n, M., Larson, T. R., Graham, I. A., Napier, J. A. And Sayanova, O.**, 2009: The synthesis and accumulation of stearidonic acid in transgenic plants: a novel source of ‘heart-healthy’ omega-3 fatty acids, *Plant Biotechnology Journal*, **7**, 704–716.
- Sacks, F. M. and Katan, M.**, 2002. Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease, *The American Journal of Medicine*, **113**, 9, 13–24.
- Scrimgeour, C. M. and Harwood, J. L.**, 2007. Fatty acid and lipid structure, in: *The Lipid Handbook*, pp. 1-5, Eds. J. L. Harwood, F. D. Gunstone and A. J. Dijkstra, CRC Press, New York.
- Senanayake, S. P. J. and Shahidi, F.**, 1999: Acidolysis of seal blubber oil with lauric acid, *Journal of Food Lipids* **1**, 78–96.
- Senanayake, S. P. J. and Shahidi, F.**, 2007: Enzymatic incorporation of docosahexaenoic acid into borage oil, *Journal of American Oil Chemists’ Society*, **76**, 9, 1009-1015.

- Seriburi, V. and Akoh, C. C.**, 1998: Enzymatic interesterification of lard and high-oleic sunflower oil with *Candida antarctica* lipase to produce plastic fats *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 1339–1345.
- Shahidi, F. and Wanasundra, U. N.**, 2002. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils, in *Food lipids, chemistry, nutrition and biotechnology*, pp 465-487, Eds. Akoh C.C, Min, D. B., Marcel Dekker, New York.
- Sharma, M., Rastogi, N. K. and Lokesh, B. R.**, 2009: Synthesis of structured lipid with balanced omega-3: omega-6 ratio by lipase-catalyzed acidolysis reaction: optimization of reaction using response surface methodology. *Process Biochemistry*, **44**, 11, 1284–1288.
- Shuang, D., Jiang-Ke, Y. and Yun-Jun, Y.**, 2009: Optimization of lipase-catalyzed acidolysis of soybean oil to produce structured lipids. *Journal of Food Biochemistry*, **33**, 442–452.
- Sıralı, R. and Deveci, M.**, 2002: Bal arısı (*Apis Mellifera* L.) için önemli olan bitkilerin trakya bölgesinde incelenmesi, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, **2**, 1, 17-26.
- Simopoulos, A. P.**, 2006: Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **60**, 502–507.
- Stolyhwo, A. and Mol, J.**, 2007: Changes in the content of γ -linolenic C18 : 3 (n-6) and stearidonic C18 : 4 (n-3) acids in developing seeds of viper's bugloss *Echium vulgare* L., *Acta Biochimica Polonica*, **54**, 4, 741-746.
- Stransky, K., Zarevucka, M. and Wimmer, Z.**, 2005: Gas chromatography analysis of blackcurrant oil in relation to its stability, *Food Chemistry*, **92**, 569–573.
- Şahin, N. ve Karaali, A.**, 2002: Özel amaçlı besinlerin üretiminde yararlanılan "lipazlarla katalizlenen reaksiyonlar, *Türkiye 7. Gıda Kongresi*, 24 Mayıs, Ankara, Türkiye.
- Şahin, N., Akoh, C. C. and Karaali, A.**, 2005a: Enzymatic production of human milk fat substitutes containing γ -linolenic acid: optimization of reactions by response surface methodology, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **82**, 549–557.
- Şahin, N., Akoh, C. C. and Karaali, A.**, 2005b: Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 5779-5783.
- Şahin Yeşilçubuk, N. ve Karaali, A.**, 2008: Gamma-linolenik asit ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların üretimi, *İTÜ Dergisi/d mühendislik*, **7**, 4, 60-71.
- Turan, S., Karabulut, I. ve Vural, H.** 2007: Influence of sn-1,3-lipase catalysed interesterification on the oxidative stability of soybean oil-based

structured lipids, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**, 90-97.

Türk Standartları Enstitüsü, 2010. Hayvansal ve Bitkisel Katı ve Sıvı Yağlar – Asit Sayısı ve Asitlik Tayini. TS EN ISO 660, Ankara.

URL-1 <<http://www.ienica.net/crops/echium.pdf>>, alındığı tarih 23.06.2010.

URL-2 < http://www.dweckdata.com/Published_papers/Echium.pdf>, alındığı tarih 05.01.2011.

URL-3 <<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Teblig/2010-35.html>>, alındığı tarih 05.03.2011.

Venegas-Calderón, M., Sayanova, O. and Napier, J. A. 2010: An alternative to fish oils: Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids, *Progress in Lipid Research*, **49**, 108–119

Watkins, S. M. and German, J. B., 2002. Unsaturated fatty acids, in: *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, pp. 19-23, Eds. C. C. Akoh and D. B. Min, CRC Press, New York.

Willis, W. M. and Marangoni, A. G., 2007. Enzymatic interesterification, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, pp. 808-839, Eds. Akoh, C. C. and Min, D. B., CRC Press, Boca Raton.

Xu, X., 2000: Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **102**, 287-303.

Yang, T., Fruekilde, M-B., and Xu, X., 2003a: Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification , *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **80**, 881–887.

Yang, T., Xu, X., He, C. and Li, L., 2003b: Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes, *Food Chemistry*, **80**, 473-481.

Yang, T., Fruekilde, M-J. and Xu, X., 2005: Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming, *Food Chemistry* , **92**, 101–107.

Yeşilçubuk, N. Ş., 2007. Annesütü yağına benzer yapılandırılmış yağ üretimi, *Doktora Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi, İstanbul.

Yıldırım, A. and Ekin, T., 2003: Orta Anadolu Bölgesi Yabancı Ot Florası, *Bitki Koruma Bülteni*, **43**, 1-98.

Zhang, P., Boudyguina, E., Wilson, M. D., Gebre, A. K. and Parks, J. S., 2008: *Echium* oil reduces plasma lipids and hepatic lipogenic gene expression in Apob100-only LDL receptor knockout mice, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **19**, 10, 655–663.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Sena Bilgiç

Doğum Yeri ve Tarihi: Bursa, 1984

Lisans Üniversitesi: İstanbul Teknik Üniversitesi

Yayın Listesi:

- **Bilgiç, S.**, Yeşilçubuk, N. Ş., 2011: Lipase-Catalyzed Acidolysis of Olive Oil with SDA *Echium Vulgare* Seed Oil: A Structured Lipid with a Good Balanced of Polyunsaturated Fatty Acids, International Food Congress: Novel Approaches in Food Industry, May 26-29, Izmir, Turkey.

