

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜZÜM ÇEKİRDEKLERİNDEN ENZİM DESTEKLİ SULU
EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE YAĞ ELDESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Mehmet ARSLAN**

Anabilim Dalı : İleri Teknolojiler

Programı : Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyoteknoloji

OCAK 2010

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜZÜM ÇEKİRDEKLERİNDEN ENZİM DESTEKLİ SULU
EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE YAĞ ELDESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Mehmet ARSLAN
(52183011)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20 Aralık 2010
Tezin Savunulduğu Tarih : 25 Ocak 2011**

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Melek TÜTER (İTÜ)
Doç. Dr. Sevil YÜCEL (YTÜ)**

OCAK 2010

ÖNSÖZ

Öncelikle tez danışmanım Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN'e ve aileme, şimdiye kadar bana verdikleri emekler ve bir karşılık beklemeden olarak en zor zamanlarımda hep yanımda oldukları için en derin teşekkürlerimi ifade etmek isterim.

Çalışmalarım süresince sürekli olarak yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. H. Ayşe AKSOY ve Prof. Dr. Melek TÜTER'e verdikleri destek ve samimiyetten dolayı da ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bütün bu çalışmalar süresince aynı vücudun sağ ve sol uzuvları gibi başarı merdivenlerini birlikte çıktığımız ve yardımlarını asla esirgemeyen kadim dostum Mustafa SARAÇ'a ve onun şahsında diğer çalışma arkadaşlarıma da candan teşekkürlerimi iletmek isterim.

Bu çalışmada ayrıca kullandığımız enzimleri bize temin ve hediye eden Novozymes Dış Ticaret Ltd.Ş 'ne teşekkür ederim.

Aralık 2010

Mehmet A. ARSLAN

Kimya Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	III
İÇİNDEKİLER	V
KISALTMALAR	VII
ÇİZELGE LİSTESİ	IX
ŞEKİL LİSTESİ	XI
ÖZET	XIII
SUMMARY	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1 Üzüm ve Üzüm Üretimi Hakkında Genel Bilgi.....	3
2.2 Üzüm Çekirdekleri ve Yağının Karakteristik Özellikleri ile Sağlık Etkileri.....	4
2.3 Bitkisel Yağ Elde Etme Yöntemleri.....	9
2.3.1 Tohum/çekirdeklere uygulanan ön işlemler.....	9
2.3.2 Soğuk presleme yöntemi.....	10
2.3.3 Çözücü ekstraksiyonu yöntemi.....	11
2.3.4 Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemi.....	12
2.3.5 Enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemi.....	14
2.4 Enzimler Hakkında Genel Bilgi	17
2.4.1 Selüloz enzimi.....	18
2.4.2 Proteaz enzimi.....	18
2.4.3 Pektinaz enzimi.....	19
2.4.4 Hemiselüloz enzimi.....	19
2.5 Literatürde Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Üzerine Yapılmış Çalışmalar.....	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	25
3.1 Kullanılan Hammaddeler	25
3.2 Yöntemler.....	25
3.2.1 Üzüm çekirdeklerinin öğütülmesi ve yağ içeriklerinin saptanması.....	25
3.2.2 Üzüm çekirdek yağının yağ asitleri bileşiminin belirlenmesi.....	26
3.2.3 Üzüm çekirdeklerinden enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesi.....	27
3.2.4 Üzüm çekirdeklerinden enzimatik sulu ekstraksiyon ile en yüksek Verimle elde edilmiş yağın karakterizasyonu.....	29
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1 Üzüm Çekirdeklerinin Yağ İçerikleri ve Çekirdek Yağının Yağ Asitleri Bileşimi	31
4.2 ÜÇ1 Fraksiyonunun Enzimatik Ekstraksiyonuna pH, Enzim Cinsi ve Miktarının ile Çözücü Etkisi.....	32
4.2.1 ÜÇ1 fraksiyonundan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, yağ verimine çözücü etkisi.....	32
4.2.2 ÜÇ1 fraksiyonundan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, yağ verimine enzim miktarının etkisi.....	33

4.2.3 ÜÇ1 fraksiyonundan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, yağ verimine sürenin etkisi.....	35
4.3 ÜÇ2 Örneklerinin Enzimatik Ekstraksiyonuna, Homojenizatör, pH, Enzim cinsi ve Miktarı ile Sürenin Etkisi.....	35
4.3.1 ÜÇ2 fraksiyonundan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, yağ verimine homojenizatörün etkisi.....	36
4.3.2 ÜÇ2 fraksiyonundan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, yağ verimine pH ve sürenin etkisi.....	37
4.4 Enzimatik Sulu Ekstraksiyon ile Elde Edilen Pamuk Yağının Karakterizasyonu.....	38
5. VARGILAR VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ.....	45

KISALTMALAR

AD	: Asit Değeri
AOCS	: Amerikan Yağ Kimyacıları Derneęi
CLA	: Konjüge Linoleik Asit
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
ESE	: Enzimatik Sulu Ekstraksiyonu
FAME	: Yağ asidi metil esterleri
FAO	: Gıda ve Tarım Organizasyonu
P_c	: Kritik Basınç
SC	: Süperkritik Ekstraksiyon
T_c	: Kritik Sıcaklık
ÜÇ1	: < 0,6 mm tane boyutundaki üzüm çekirdeği yağı
ÜÇ2	: 0,6-1 mm tane boyutundaki üzüm çekirdeği yağı
V_K	: Enzimatik Yağ Verimi (Katı bakiye üzerinden)
V_S	: Enzimatik Yağ Verimi (Sıvı fraksiyonlar üzerinden)
Y_b	: İşleme tabi tutulan tohumların içerdeği başlangıç yağ miktarı, gram
Y_k	: Küspede kalan yağ miktarı, gram
Y_s	: Sıvı fazlardan çözücü ile geri kazanılan yağ miktarı, gram

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : 2009 yılında Dünya’da üzüm üretimi.....	3
Çizelge 2.2 : Üzüm çekirdeğinin yağ asidi bileşenleri.....	5
Çizelge 2.3 : Üzüm çekirdeğinin amino asit bileşimi.....	6
Çizelge 2.4 : Üzüm çekirdeğinin kimyasal bileşimi.....	7
Çizelge 2.5 : Üzüm çekirdeği yağının karakteristik özellikleri.....	7
Çizelge 2.6 : Üzüm çekirdeğinde bulunan önemli E vitamini bileşikleri.	9
Çizelge 3.1 : Gaz kromatografisi analiz koşulları.....	27
Çizelge 4.1 : Üzüm çekirdeği yağı yağ asitleri bileşimi.....	31
Çizelge 4.2 : ÜÇ1 fraksiyonunun selülaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve çözücü cinsinin etkisi.....	32
Çizelge 4.3 : ÜÇ1 fraksiyonunun proteaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve çözücü cinsinin etkisi.....	33
Çizelge 4.4 : ÜÇ1 fraksiyonunun selülaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve enzim miktarının etkisi.....	34
Çizelge 4.5 : ÜÇ1 fraksiyonunun proteaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve enzim miktarının etkisi.....	34
Çizelge 4.6 : ÜÇ1 fraksiyonunun proteaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine süre etkisi.....	35
Çizelge 4.7 : ÜÇ2 fraksiyonunun proteaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine homojenizatör etkisi.....	36
Çizelge 4.8 : ÜÇ2 fraksiyonunun selülaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine homojenizatör etkisi.....	36
Çizelge 4.9 : ÜÇ2 fraksiyonunun proteaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve süre etkisi.....	37
Çizelge 4.10 : ÜÇ2 fraksiyonunun selülaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve süre etkisi.....	38

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Kıtalaraya göre Dünya üzüm üretimi.....	4
Şekil 2.2: Süperkritik akışkan ekstraksiyon sistemi.....	14
Şekil 2.3: Üzüm çekirdeği için enzimatik sulu ekstraksiyon işlemi.....	16
Şekil 2.4: Bir kimyasal reaksiyonun enzim ile katalizlenmiş ve katalizlenmemiş halleri için enerji diyagramı.....	18
Şekil 3.1: Soxhlet Düzenegi.....	26

ÜZÜM ÇEKİRDEKLERİNDEN ENZİM DESTEKLİ SULU EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE YAĞ ELDESİ

ÖZET

Üzüm çekirdeği (*Vitis vinifera* L), gıda sanayii, eczacılık, kozmetik ve medikal alanlarda, yapısında bulunan antioksidan ve yağ asitleri içerikleri sebebiyle son yıllarda dikkat çeken bir tohum haline gelmiştir. Dünya üzüm üretimi 65 milyon ton civarında olup Türkiye 3,9 milyon ton ile dünya sıralamasında 6. sırada yer almaktadır. Ülkemizde üzüm özellikle Akdeniz ve Ege bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Üzümün dörtte birlik kısmını oluşturan çekirdeği % 10 – 12 oranında yağ içermektedir. Meyve suyu ve şarap sanayiinin yan ürünü olan çekirdeklerden elde edilen bu yağ linoleik (%65-70) ve oleik (%15-25) asitlerce zengindir. Ayrıca üzüm çekirdeği yağı zengin antioksidan (monomerik flavan-3-ol, fenolik asitler ve oligomerik proantosiyanidinler) içeriği ile de sağlığa yararlı yağlar sınıfına dahil edilmektedir. Üzüm çekirdeğinin deri, kolojen bağlar, damarlar, kan dolaşımı ve kalp üzerinde koruyucu etkilere sahip olduğu ortaya konulmuştur.

Bitkisel tohum ve çekirdeklerden endüstriyel olarak presleme ve çözücü ekstraksiyonu ile yağ elde edilmektedir. Çözücü olarak genellikle hekzan kullanılır. Çözücü ortamında çalışmak emniyet, çevre kirliliği açısından sıkı tedbirlerin alınmasını gerektirir ve yağda kalan çözücü bakiyesinin kontrol dışı kalması da insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle son yıllarda sulu ekstraksiyon ile yağ eldesi üzerinde yapılmış çalışmaların sayısı hızla artmaktadır.

Bu çalışmada, üzüm çekirdeklerinden sulu ortamda yüksek verimle yağ eldesi hedeflenmiştir. Çekirdekler, içerisinde hücre çeperlerini degrade edebilecek enzimler (proteaz ve selüloz enzimleri) bulunan, su ile ekstrakte edilmiştir. Yağ verimine reaksiyon parametrelerinin (pH, enzim cinsi ve miktarı, tanecik boyutu ve sürenin) etkisi incelenmiş ve reaksiyon parametreleri optimize edilmiştir.

Ekstraksiyonlar, ÜÇ1 (0,6 mm den küçük) ve ÜÇ2 (0,6-1,0 mm) tane boyutlarındaki fraksiyonlar ile 50°C sıcaklıkta, 1:7 çekirdek:tampon çözelti oranında, pH 4-6 aralığında, 0,25-1,25 mL/g enzim miktarlarında 4-24 saat sürede yapılmıştır. Proteaz olarak Alcalase 2.5L ve selüloz olarak Celluclast 1.5L ticari enzimleri kullanılmıştır. Çalışmamızda proteaz ile pH 6'da 0,5 mL/g enzim miktarında 6 saatte % 26,1 verimle, selüloz ile ise pH 5'de 0,5 mL/g enzim miktarında 15 saatte % 26,2 verimle yağ ekstrakte edilebilmiştir. Küspede kalan yağ miktarı üzerinden yapılan hesaplamalara göre, proteaz ile pH6 da 24 saatte % 75,4 verimle ve selüloz ile pH 5 de 6 saatte %62 verimle yağın ekstrakte edilmiş olduğu da belirlenmiştir.

Sonuç olarak, proteaz katkılı sulu ekstraksiyon ile üzüm çekirdeklerinden %75 verimle yağ elde edilebilmektedir. Bu yağ ile çekirdeklerden direkt hekzan ile elde edilmiş yağ arasında, asit değeri ve yağ asitleri bileşimleri açısından bir fark olmadığı da saptanmıştır.

PRODUCTION OF OIL FROM GRAPE SEEDS USING ENZYME-ASSISTED AQUEOUS EXTRACTION METHOD

SUMMARY

Grape seed (*Vitis vinifera* L), has been a seed gained a lot of attraction in food industry, pharmacy, cosmetic and medical applications because of its rich content by means of antioxidants and fatty acids. While total grape production in the world is 65 billion tons per year, Turkey is holding the 6.th place with 3.9 billion tons. In our country grape is produced mostly in Mediterranean and Aegean regions. The seed part of the grape that occupies the $\frac{1}{4}$ of the volume includes fat by ratio of 10-12%. This fat that is produced by the seeds which are the byproducts of fruit juice and wine industry, contains 65-70% linoleic and 15-25% oleic acids. In addition to this, grape seed oil is very good for health because of its the high antioxidant contents (monomeric flavan-3-ol , phenolic acids and oligomeric proanthocyanidins). It s a proven fact that grape seed has protective effects on skin, collagen fibers, vessels, blood circulation and heart functions.

Today industrially way of extracting fat from plant germ and seeds are mostly done by using pressure and solvent extraction methods. Mostly hexane is used as a solvent. Working with solvents requires very high standard of precautions and small amount of remaining solvent in the fat content may have harmful effects on human health. Because of these reasons, the number of studies about extraction in aqueous environment is increasing every other year.

In this study, aim is to gain oil in aqueous environment with high yields. Seeds were extracted in aqueous environment using enzymes (protease and cellulase) to be able to degrade the cell wall. The effect of reaction parameters (pH, enzyme type and amount, particle size and time) for the oil yield was examined and reaction parameters were optimized.

Extraction experiments were carried out by using ÜÇ1 (smaller than 0,6 mm) and ÜÇ2 (0,6-1,0 mm) fractions at 50 °C, 1:7 seed:buffer solution ratio, pH 4-6 intervals using 0,25-1,25 mL/g enzymes for 4-24 hours. Alcalase 2.5L and Celluclast 1.5L used as commercial Protease and Cellulase sources. In our study using protease (0,5 mL/g enzyme ratio) at pH 6 for 6 hours resulted %26,1 and cellulase (0,5 mL/g enzyme ratio) at pH 5 for 15 hours resulted %26,2 oil yields. By experimenting and calculating the oil amount remained in pulp gives also %75,4 yield for protease at pH 6 for 24 hours and %62 for cellulase at pH 5 for 6 hours.

As a result of using protease assisted aqueous extraction, oil can be extracted at %75 yield from grape seeds. And also it is confirmed that there is no difference in acid values and fatty acid distributions between oils gained with using hexane and enzyme.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Üzüm (*Vitis vinifera* L.) 2006 yılında 69 milyon tonluk üretim hacmiyle dünya üzerinde üretilen en yaygın mahsullerden biridir (Url-3, 20010). Toplam üretilen miktarın yaklaşık %80 i şarap yapımında kullanılırken hasat süresinin ilk birkaç haftası boyunca 10 milyonlarca ton üzüm posası ortaya çıkmaktadır. Üzüm çekirdeği bu posanın kuru ağırlık bazında %38-52 lik önemli bir kısmını oluşturur (Schriber ve diğ., 2002). Çekirdekler % 8-15 civarında yağ içerir. Bu yağ gıda sanayinde, eczacılıkta, kozmetik ve medikal alanlarda oldukça fazla kullanılmaya başlanmıştır. Şarap üretimi ve ticaretinin fazla olduğu ülkelerde, İtalya, Fransa ve İspanya’da, üzüm çekirdeğinin değişik alanlarda kullanılması ekonomik açıdan önem taşımaktadır Bu değerli yağın üretimi olan talep Avrupa’nın diğer birçok ülkesinde de önemli bir derecede artmaktadır (Kamel ve diğ., 1985).

Üzüm çekirdeği yağının kalitesi özellikle doymamış yağ içeriğinin yüksekliğinden (yaklaşık %90) ileri gelmektedir. Özellikle linoleik (C18:2) ve oleik (C18:1) yağ asitlerinin yanında linolenik (C18:3) ve palmitoleik (C16:1) yağ asitleri de içermektedir (Bail, 2008). Ayrıca, bileşimin yaklaşık %10 unu oluşturan doymuş yağ asitleri olarak palmitik (16:0) ve stearik (18:0) asitler bulunmaktadır.

Bitkisel tohum ve çekirdeklerinden endüstriyel olarak yenebilir özellikte yağ elde etme işlemi için n-hekzan ile ekstraksiyon hala en çok kullanılan yöntemdir. Fakat bu organik çözücü genelde seçici olmadığı için ve uçucu olmayan pigmentlerle mumsu maddeleri simültane olarak ortamdan uzaklaştırarak yağın viskoz, koyu görümlü bir renge dönüşmesine neden olmakta ve de daha sonra uzaklaşmayan çözücü yağlar üzerinde biyolojik kirliliğe neden olmaktadır. Bu durum daha ileri rafinasyon proseslerini zorunlu kılar ki, bu da yağın ticari geleceği açısından bazı sıkıntılara yol açabilir (Fiori, 2007). Çözücü ortamında çalışılmak emniyet, çevre kirliliği açısından sıkı tedbirlerin alınmasını gerektirir ve yağda kalan çözücü bakiyesinin kontrol dışı kalması da insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilir.

Diğer bir yöntem olan süperkritik sıvı ekstraksiyonu ise yüksek verimine ve nispeten daha tehlikesiz olmasına rağmen çok yenidir ve de ilk kurulum sırasında ciddi yatırım maliyetleri gerektirmektedir (Beckman, 2004).

Bu nedenlerle, çeşitli tohum ve çekirdeklerden, üzüm yağı ve benzer özellikte yüksek sağlık özelliği taşıyan yağların eldesinde günümüzde ilgi daha çok, sulu ortamda gerçekleşen genellikle karbohidraz ve proteolitik tipi enzimlerin kullanımıyla daha düşük sıcaklıklarda ve yüksek seçicilikte gerçekleşen ekstraksiyon prensibine dayanan enzimatik ekstraksiyon işlemine doğru yoğunlaşmaktadır.

Bu çalışmanın ana amacı, şarap ve meyve suyu sanayiinin yan ürünü olan üzüm çekirdeklerinden, insan sağlığı açısından değerli yağ asitleri bileşimine sahip çekirdek yağını enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile elde etmektir. Bu amaçla üzüm çekirdeklerinin selüloz ve proteaz enzimlerini içeren sulu çözeltiler ile ekstraksiyonu yapılacak ve ekstraksiyon verimine, enzim cinsi ve miktarı, pH, süre gibi parametrelerin etkileri incelenecektir.

2. LİTERATÜR ÇALIŞMASI

2.1. Üzüm ve Üzüm Üretimi Hakkında Bilgi

Üzüm, Vitis türünün çok yıllık geçici asmalarında yetişen ve dünya üzerinde en fazla çeşidi olan bitkilerden biri olan, yaklaşık 15.000 çeşit, bir meyve türüdür. Bu çeşitlilik üzüm bitkisinin doğada varlığını devam ettirebilmek için iklim bakımından çok seçici olmadığından ve ortam şartlarına iyi derecede uyum gösterebilen genetik yapısından kaynaklanmaktadır.

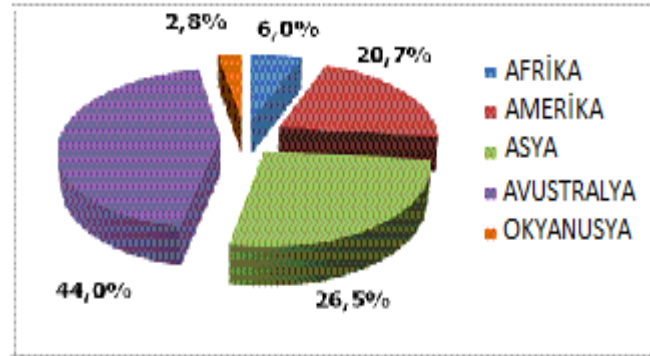
Dünya üzerinde üzüm yetiştiriciliği için en uygun iklim koşullarından birisine sahip olan Türkiye, mor üzümün dünyada ilk defa evcilleştirildiği ülke olup, üzüm konusunda köklü bir geçmişe sahiptir. Dünyada üzüm üretimi yaklaşık 75000 km² alanda gerçekleştirilmekte olup, üretilen ürünlerin yaklaşık %71'i şarap yapımında, %27 si taze meyva olarak, %2 si ise kuru meyve olarak tüketilmektedir. Üretim miktarı yıllara göre değişmekle birlikte yaklaşık 65-70 milyon ton civarlarında gerçekleşmektedir.

Çizelge 2.1 : 2009 yılında Dünya'da üzüm üretimi

Ülke	Üretim (ton)
İtalya	8,519,418
Çin	6,787,081
Amerika Birleşik Devletleri	6,384,090
Fransa	6,044,900
İspanya	5,995,300
Türkiye	3,612,781
İran	3,000,000
Arjantina	2,900,000
Şili	2,350,000
Hindistan	1,677,110

Şekil 2.1 de gösterildiği gibi bu üretimin yarıya yakın kısmı, %44, Avrupa kıtasında gerçekleşmektedir (Url-6, 2010). Türkiye, üzüm üretiminde İtalya, Çin, ABD, Fransa ve İspanya'dan sonra dünya sıralamasında 6.sırada yer almaktadır (FAOSTAT, 2007). Üzüm genel olarak Ege ve Akdeniz bölgelerinde yetişmekle birlikte bir miktar Güneydoğu Anadolu Bölgesinde de üretimi yapılmaktadır. Ege Bölgesinde çekirdeksiz kuru üzüm, Akdeniz Bölgesinde ilk turfanda, Orta Anadolu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde şaraplık, şıralık, sofralık, çekirdekli kurutmalık üzüm yetiştiriciliği yönünden gelişme göstermektedir. Kaynaklara göre değişmekle birlikte ülkemizde üretilen üzümlerin yaklaşık %30 u taze sofralık, %37'si kurutmalık, %30'u pekmez, pestil, sucuk, şıra ve %3'ü de şaraplık olarak değerlendirilmektedir (Url-5, 2010).

Türkiye'de şarap üretiminde kullanılan üzümlerin suyu sıkıldıktan sonra geri kalanlar, %15-25 kadarlık üzüm posası olup, %50'si kabuk, %25'i çekirdek ve %25'i üzüm çöpüdür (Çinkılıç, 2008).



Şekil 2.1 : Kıtalara göre Dünya üzüm üretimi

2.2 Üzüm Çekirdekleri ve Yağının Karakteristik Özellikleri ile Sağlık Etkileri

Üzüm çekirdekleri türe ve iklime göre değişmekle birlikte ortalama olarak %14-17 oranında yağ içermektedirler. Bu yağın en dikkat çekici özelliklerinden biri linoleik asit gibi (%72-76) doymamış yağ asitleri oranında oldukça zengin olmasından kaynaklanmaktadır. Aspir yağında %70-72, ayçekirdeğinde %60-62 ise linolenik asit bulunmaktadır (Ghisalberti, 2001). Çizelge 2.2 de üzüm çekirdeği yağının sahip olduğu yağ asidi bileşenleri (Dalmolin ve diğ., 2010), Çizelge 2.3 de aminoasit

bileşimi, Çizelge 2.4 de kimyasal bileşimi ve Çizelge 2.5 de de sahip olduğu karakteristik özellikler gösterilmiştir (Kamel ve Dawson, 1985).

Çizelge 2.2 : Üzüm çekirdeğinin yağ asidi bileşenleri

Yağ asidi				
Kullanılan adı	Gerçek adı	C _{xy}	100w	100x
Laurik	Dodekanoik	C _{12:0}	0,03	0,04
Miristik	Tetradekanoik	C _{14:0}	0,11	0,13
Palmitik	Hekzadekanoik	C _{16:0}	8,14	8,84
Palmitoleik	cis-9-Hekzadekanoik	C _{16:1}	0,16	0,18
Margarik	Heptadekanoik	C _{17:0}	0,07	0,07
Margaroleik	cis-9-Heptadek-9-enoik	C _{17:1}	0,03	0,03
Stearik	Oktadekanoik	C _{18:0}	4,05	3,97
Oleik	cis-9-Oktadekanoik	C _{18:1}	15,12	14,92
Linoleik	cis-9, cis-12-Oktadekanoik	C _{18:2}	71,20	70,79
Linolenik	Bütün-cis-9,12,15 oktadekanoik	C _{18:3}	0,57	0,57
Arakhidik	Eikosanoik	C _{20:0}	0,22	0,2
Gadoleik	cis-9-Eikosanoik	C _{20:1}	0,17	0,15
Behenik	Dokosanoik	C _{22:0}	0,08	0,07
Lignokerik	Tetrakosanoik	C _{24:0}	0,05	0,04

Çizelge 2.3 : Üzüm çekirdeğinin amino asit bileşimi

Gram aminoasit/ 16 g N	
Aminoasit	Üzüm çekirdeği
Esansiyel	
Lizin	2,57
Histidin	1,51
Fenilalanin	2,80
Leusin	5,95
İzoleusin	3,03
Treonin	2,80
Metionin	1,05
Valin	4,20
Arginin	7,24
Esansiyel olmayan	
Aspartik	3,50
Serin	3,85
Glutamik	20,5
Prolin	2,45
Glisin	8,29
Alanin	4,08
Sistein	1,05
Tirozin	1,28

Çizelge 2.4 : Üzüm çekirdeğinin kimyasal bileşimi

Kuru maddece ağırlık yüzdesi	
Ham protein	8,2
Ham protein (çekirdek)	
Ham yağ	14
Ham yağ (çekirdek)	
Toplam kül	2,2
Ham fiber	38,6
Karbohidrat	37,0
Yüzde nem	43,1
Enerji, Kcal/g	3,1

Çizelge 2.5 : Üzüm çekirdeği yağının karakteristik özellikleri

Rekraktif indeks	1,4741
Spesifik ağırlık, 25/25 ⁰ C	0,904
İyot değeri	132
Sabunlaşma değeri	194
Sabunlaşmayan madde, %	0,93
Hidroksil değeri	16
Asit değeri	1,59
Serbest yağ asidi	
% oleik asit	0,78
Ester numarası	192

Yüksek değerli yağ asitleri açısından son derece zengin olmasının yanında üzüm çekirdeği yağı galik asit, katesin, epikatesin gibi fenolik bileşiklerle birlikte yine diğer çekirdek yağlarına göre binlerce kat daha fazla oligomerik proantosiyanozid gibi tanninler içermektedir ki bu durum üzüm çekirdeği yağını peroksidasyona karşı son derece dayanıklı hale getirmektedir. Prosiyanidinler sahip olduğu radyokoruyucu etkiler, kataraktın önlenmesi, antihiperglikemik etki, antioksidan enzim sistemlerinin düzenlenmesi, insülin hassasiyetinin azalması ve hipertrigliseridemya gibi problemleri önlemesi yönünden oldukça önemli olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Thorsten ve diğ., 2009).

Bilimsel araştırmalar göstermiştir ki yağın içerisinde bulunan, fenol çeşidi proantosiyanidinler E vitamininden 20 kat, C vitamininden de 50 kat daha fazla antioksidan özelliğe sahiptir. Buna ek olarak, yapılan geniş araştırmalar sonucu üzüm ekstraktının derinin esnekleşmesini ve elastikleşmesini sağlamak, kolojen bağları güçlendirmek gibi birçok olumlu etkisinin olduğu görülmüştür. Yapılan diğer bilimsel çalışmalar da, proantosiyanidinler vücudu güneşe karşı koruduğunu, arter, toplar ve kılcal damarların yapısını güçlendirerek kan dolaşımını sağladığını, görme duyusunu geliştirdiğini, kalp dokularının esnekliğini arttırdığını ortaya koymuştur (Shi ve diğ., 2004).

Yine yapılan çalışmalar göstermiştir ki, üzüm çekirdeği yağı düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonuna karşı dayanıklılık, trombozisi önleme, kardiyovasküler rahatsızlıkların önlenmesi, kan serumunda kolesterolün azaltılması, kan damarlarının genişlemesi ve otonomik sinirlerin düzenlenmesi gibi son derece önemli tıbbi özelliklere sahiptir. Bu nedenlerden dolayı üzüm çekirdeği yağı, yetişkin olmayanlar , yetişkinler ve de yaşlılar için oldukça önemli bir besin iksiri olarak değerlendirilebilir. Bu biyoaktif bileşenlerin dışında üzüm çekirdeği ayrıca önemli miktarda E vitamini içermektedir (78 mg/100 mg) ki E vitamini lipoprotein kolesterol (LDLC) oksidasyonuna karşı önleyici özelliklerde olup damar tıkanıklığını önlemede de önemli işlevler yerine getirmektedir. Bu durumun E vitamininin 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA redüktazını baskılaması ve LDL reseptörlerini apregüle etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Chao ve diğ., 1999).

Üzüm çekirdeğinde bulunan önemli E vitamini bileşikleri (tokoferoller), Çizelge 2.6 da gösterilmiştir.

E vitamini bugün kozmetiklerde de sıkça kullanılan bir koruyucu madde olup, üzüm çekirdeği yağının raf ömrünü ve stabilitesini de önemli ölçüde arttırmaktadır (Minhajuddin ve diğ., 2005).

Çizelge 2.6 : Üzüm çekirdeğinde bulunan önemli E vitamini bileşikleri

Tokoferol ve tokotrienol	İçerik/ (mg. 100g ⁻¹)
	FAO/WHO
α -Tokoferol	1,60-3,80
γ -Tokoferol	ND-7,30
α -Tokotrienol	1,80-10,70
γ -Tokotrienol	11,50-20,50

Aynı zamanda üzüm çekirdeği yağı C_{18:2} yağ asidinin pozisyonel ve konfigürasyonel izomerik karışımı olan konjüge linoleik asit (CLA), üretiminde de kullanılabilir. Bu alanda yapılan birçok çalışma göstermiştir ki CLA deneysel modellerde meme, kolon, mide ve deri kanserlerinin önlenmesinde son derece önemli bir ajandır. Bu durum lenfosit ve makrofaj aktivitelerinin iyi bir şekilde düzenlenmesinde önemli bir rol oynamasından kaynaklanmaktadır. Üzüm çekirdeği bu bakımlardan da yine önemli bir potansiyeli bünyesinde bulundurmaktadır (Ghisalberti, 2001).

2.3 Bitkisel Yağ Elde Etme Yöntemleri

Endüstride yağlı tohumlardan veya diğer bitkisel tohum/çekirdeklerden yağ elde edilmesinde, ön işlemleri takiben, genellikle soğuk presleme ve/veya çözücü ekstraksiyonu yöntemleri kullanılır. Alternatif ekstraksiyon yöntemleri arasında süperkritik akışkan ile ekstraksiyon yöntemini ve özellikle sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemini görmekteyiz. Aşağıdaki bölümlerde bu yöntemler üzerinde kısa açıklamalar verilmiştir.

2.3.1 Tohum/çekirdeklere uygulanan ön işlemler

Hammaddenin Temizlenmesi: Ekstraksiyonda kullanılacak hammaddenin hazırlanması sırasında genellikle birtakım kabukların ve çöplerin çekirdekten ayıklanması gerekmektedir. Bu amaçla etkili bir çekirdek temizliği sağlamak için günümüzde küçük-orta-büyük ölçeklerde pek çok teknolojik yaklaşım bulunmaktadır. Bu yaklaşımlar ardarda sıralanmış çeşitli boyutlarda kumaş

dokularından oluşan görüntüleme aygıtlarından (Clothier) komkako havalandırma pervanesi milleri (Clipper Office Tester) ve spiral ayırıcılara kadar geniş bir çeşitlilik göstermektedir.

Kurutma: Nemli çekirdekler daha düşük yağ verimi vermekle birlikte ekipmana zarar da verebilirler. Nem ayrıca, çekirdekte küf sporları bulunduğu için küflenmeye de zemin hazırlar. Genel bir kural olarak çekirdeklerin tohumlar depolama ve ekstraksiyon işlemleri sırasında ortalama 10% seviyelerinden daha fazla nem içermemelidir.

Isıtma: Isınmış çekirdekler daha az eforla daha fazla yağ verirler. Yağ ekstraksiyonu için optimum sıcaklık aralığı 37-70 °C arasında değişmektedir. Küçük çaplardaki üretim için fırında veya ısıtıcıda ısıtmak ya da solar güneş kurutucularda konsantre güneş ışığıyla ısıtmak yeterli iken, daha büyük çaplarda üretim için depolama bölümü ile yağ çekirdeği presleme arasındaki hazneye yerleştirilen ısıtıcı ekipmanı daha iyi sonuç vermektedir (Kurki ve diğ., 2008).

2.3.2 Soğuk presleme yöntemi

Bu yöntemde yağlı dokudan presleme (basınç uygulama) ile yağ çıkarılır. Bazı durumlarda, örneğin zeytin yağında, birden fazla basınç uygulanır. İlk preslemede az verimle fakat en iyi kalitede yağ elde edilir. Sıcak presleme ile daha iyi verim alınır da, bu sırada istenmeyen müsilaj, renk, koku ve tat veren yabancı maddeler ve serbest yağ asitleri yağa karışırlar. Presleme ile tüm yağı ayırmak zordur. Küspede önemli miktarda yağ kalabilir.

Presleme için önce çekirdek içleri ezmek, öğütmek veya silindirler arasından geçirmek suretiyle preslemeye en uygun lapa haline getirilirler ve kurutulurlar. Kurutma işlemi özel kurutucularda buharla ısıtarak yapılır. Nem derecesi nadir hallerde yüzde 20 kadar yüksek bir değerde tutulsa da genellikle yüzde 3-5 arasında bırakılır. Isıl işlemi uygulanıp uygulanmadığına göre sıcak veya soğuk presleme uygulanır. Soğuk presleme yönteminde ezilmiş madde doğrudan doğruya basılır ki bu şekilde en iyi kalitede zeytin yağı ve hint yağı elde edilir. Fakat genellikle uygulanan sıcak presleme yöntemidir. Bunun için ısıtılmış madde prese gönderilir. Presler açık sandık veya kapalı kafes tipindedir. Kapalı kafes tipi sonsuz vida şeklindeki presleme makineleri (ekspeller) bulunmadan önce daha çok sandık pres makineleri kullanılıyordu. Bunlar, düşey makineleri olup bir dizi yatay delikli

levhaları içerirler. Isı işlemine bağı tutulmuş ezilmiş madde kıl torbalar içerisinde olarak önce ılımlı basınçla kalıp haline getirildikten sonra makineye yerleştirilir. 150-300 atmosfer basınç altında yağ torbadan dışarıya sızdırılır. Ham yağ, makinenin yanlarından dipteki tekneye akar ve buradan, süzmeden önce durulma tankında toplanır. Burada yağ uzun zaman bırakılmakla berraklaştırılır, bu sırada türlü eşlik maddeleri çöker, veya basınçlı süzgeçten geçirilir.

Torba pahalıya mal olduğundan şimdi daha ziyade elekli pres makineleri tercih edilmektedir. Isıl işlem gören yağlı madde küspesinde % 7 kadar yağ kalır. Önceden ısıl işlem görmüş tohumlar ile çalışılırsa küspede kalan yağ % 4-6 olur. Küspe protein ve karbonhidratca zengindir, hayvan yemi olarak kullanılır.

Ekspeller presi bir kafes basınç makinesidir, kapalı tip veya sürekli tipte olabilir. Çok yerde ekspeller hidrolik preslerin yerini almıştır. Ekspeller temel olarak bir silindirik gövde içinde, sonsuz bir vida biçiminde dönen eksenden ibarettir, kıyma makinesine benzer. Isıtılmış ve kurutulmuş yağlı madde baş taraftan gövdeye sokularak gittikçe artan basınca tabi tutulur, gövdenin yanından yağ akar, sonundan küspe çıkar. Pres buhar kılıfı ile ısıtılabilir. Küspe ikinci kez öğütölüp yeniden pres edilebilir veya hidrolik preste sıkılabilir. Sürekli presler masrafsızlar da daha bulanık ve hidrolik prese göre düşük verimle yağ çıkarırlar, bununla birlikte tohumlardan yağ çıkarmak için genellikle kullanılan budur (Kurki ve diğ., 2008).

2.3.3 Çözücü ekstraksiyonu yöntemi

Çözücü ekstraksiyonu endüstride, biyolojik, anorganik ve organik maddelerin üretiminde yaygın olarak kullanılan bir yöntem olup bir katı-sıvı ekstraksiyonu işlemidir. Günlük yaşamda çay ve kahve yapımı verilebilecek en güzel örnek iken, şeker pancarından şeker, yağlı tohumlardan yağ elde edilmesi endüstriyel katı-sıvı ekstraksiyonuna örnektir (Gülbaran, 1981).

Bu yöntem Fransız E. DEISS'in 1855 de Marsilya'da zeytinden karbon sülfür ile yağ ekstraksiyonu ile başlamıştır. Çözücü ile ekstraksiyonda, yağlı doku önce peletler haline getirilir ve çözücü içerisinde ılımlı bir şekilde karıştırılır, çözelti aktarılır, yerine yeni çözücü konur. Çözücü ekstraksiyonu, çok bileşenli bir katıdan istenilen bileşenin bir çözücü ile çözülerek ayrılmasıdır. Katı içinde difüzyon yavaş olduğu için dengeye ulaşması zor olan bir süreçtir. Katı-sıvı ekstraksiyonuna üç ana faktör etki eder: Bunlardan ilki çözücü ile madde temasıdır. Çözünmesi istenen madde katı

yüzeyinde ise çözücü ile ekstrakte edilmesi kolaydır, ancak, yağlı tohumlarda olduğu gibi çözünmesi istenen madde katının içinde ise, katının bir ön işleminden geçirilerek parçacık boyutu küçültülür. Böylece katı-çözücü temas yüzeyi artırılarak ekstraksiyon verimi yükseltilir.

Ekstraksiyon işleminde kullanılacak çözücü istenen maddeyi çözebilecek yapıda olmalıdır. Çözücü miktarı ise inert katının miktarına göre belirlenir. Ayrıca çözücü çözünen maddeden kolayca ayrılabilen yapıda olmalıdır, bu nedenle düşük kaynama noktasına sahip çözücülerin kullanılması tercih edilir. Genellikle kullanılan çözücüler petrol eteri, benzen, trikloretilen gibi klorlandırılmış hidrokarbonlar, etilmetil keton, sikloheksan, karbon sülfür ve dünyada en yaygın olarak kullanılan hekzandır.

Ekstraksiyona etki eden diğer parametre ise sıcaklıktır. Yüksek sıcaklıklarda çalışmak difüzyon hızını artırıp işlemi çabuklaştırır, bunun yanında, çok yüksek sıcaklıkta bazı bileşenlerin yapısında bozulmalar oluşabilir veya istenmeyen bileşikler de çözünebilir.

Ekstraksiyon sonrası yağdan ve küspeden çözücünün tamamıyla uzaklaştırılması yapılır. Küspe proteince zengindir, sığırlara yem olarak verilir. Çözücü ekstraksiyonu düşük yağ yüzdeli tohumlardan yağın çıkarılmasında uygulanan tek yöntemdir. % 30 dan daha fazla içeren hammaddelerden ise yağ eldesinde önce madde preslenir, yağ yüzdesi 8-10 düşürüldükten sonra çözücü ile ekstraksiyona tabi tutulur. Yağlı maddelerde ekstraksiyon sonrası küspede kalan yağ % 0,5-2 olmaktadır (Url-4, 2010).

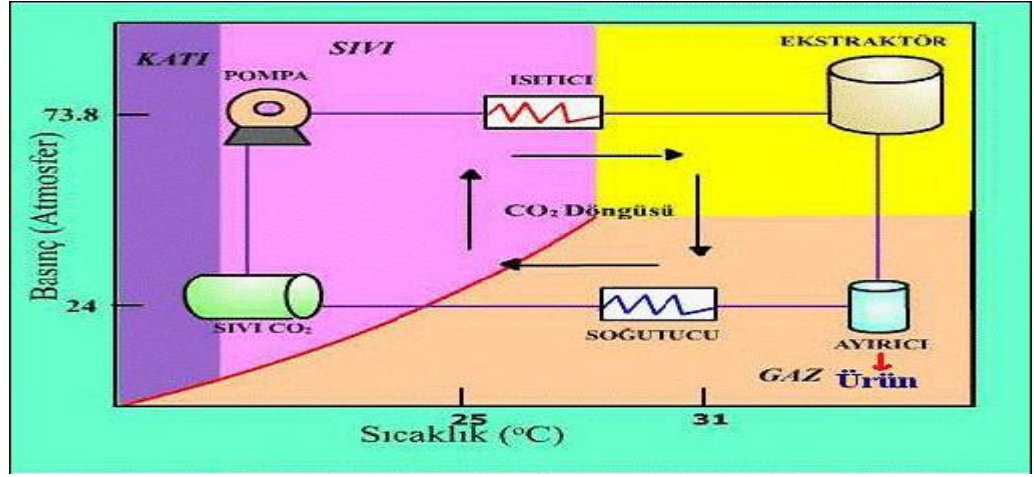
2.3.4 Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemi

Son yıllarda, süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SC) alternatif bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. SC, distilasyon, Soxhlet, sıvı ekstraksiyonu ve presleme gibi diğer yöntemler ile başarısız olan üstünlükleri sağlayan yeni bir yöntemdir. Bu yöntemde çözücü tüketimi ve basamak sayısı azalmakta, analiz süresi kısalmaktadır. Çözücü tüketimi hacminin azaltılması sadece yüksek fiyatlardan kaçınmak açısından değil, çevreye verilme problemi bakımından da önemlidir. Süperkritik akışkanların önemli özelliği çözme gücünün, yoğunluktaki değişimler yolu ile kontrol edilebilmesidir. Farklı polarite ve molekül boyutlu bileşikler tek bir süperkritik akışkan kullanımı ile ekstrakte edilebilmektedir. Ayrıca SC akışkan hızı, süperkritik

akışkanda moleküllerin difüzyon katsayıları bir sıvı ortamındakinden daha fazla olması nedeni ile yüksektir. Bu yöntem kolaylıkla otomatikleştirilebilmekte ve kromatografik ve spektrofotometrik tekniklerle birleştirilebilmektedir (Meguro ve diğ., 2000).

Bir maddenin, basınç-sıcaklık faz diyagramında gaz-sıvı denge eğrisi ileriye doğru hareket edilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artar. Isıl genleşmeler nedeniyle, sıvının yoğunluğu azalırken; basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlar. Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı arasındaki farklar kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık “akışkan” olarak adlandırılabilir. Böylece, maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının (T_c), basıncı ise kritik basıncının (P_c) üzerine çıkartıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı, yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgedeki akışkan “süperkritik akışkan (SC)” olarak tanımlanır. İlk kez 1879 ‘da Royal Society seminerlerinde (Londra) Hannay ve Hogart tarafından, bir katının yüksek basınçtaki gazda çözündüğü, basınç düşürülünce katının çöktüğü açıklanmıştır. Bir kaç yıl sonra Eduard Buchner (1907’de biyokimya alanında Nobel ödülü almıştır), uzun süren bir çalışmanın ardından bir model bileşik olarak naftalinin SC-CO₂ içindeki çözünürlüğü ölçmüştür (Froning, 1990).

Süperkritik akışkan ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi Şekil 2.2’de verilmiştir. Sistemdeki sıvı akışkan önce bir pompa ile istenilen basınç değerine ayarlanır. Buradan bir ısıtıcıya gönderilen akışkan istenilen sıcaklık değerine ısıtılır. Böylece süperkritik sıcaklık ve basınç değerlerine getirilmiş olan akışkan sıcaklığı sabit tutulan bir ekstraktöre gönderilir. Ekstraktörde bulunan madde ile temas sonucu, süper kritik akışkanda çözünen karışım bir ayırıcıya alınır ve basıncı düşürülür. Basıncının düşürülmesi sırasında çözme gücünü kaybeden akışkan üründen ayrılır. Ayırıcıdan alınan süper kritik gazının geri kazanımı için bir soğutucuda sıcaklığı düşürülmektedir. Soğutucudan çıkan sıvı akışkan tekrar sisteme beslenmek üzere sıvı CO₂ tüpünden alınan akımla karıştırılır. Elde edilen ürün yada ürünler ayırıcının altından toplanır (Yen ve diğ., 1998).



Şekil 2.2 : Süperkritik akışkan ekstraksiyon sistemi

Süper kritik ekstraksiyon sisteminde kullanılan CO₂ nin zehirsiz olup yanıcı olmaması, ucuz temin edilmesi, kimyasallara ve radyoaktif maddelere karşı kararlı olması, polar olmayan ve orta polar organik bileşikler için yüksek çözme gücü göstermesi, ekstrakte olan türlerin kazanımının CO₂ in gazlaştırılmasını içeren basit bir işlemle gerçekleştirilmesi, sistemden kolaylıkla ayrılıp ve geride atık bırakmaması, kritik sıcaklık ve basıncının düşük olması gibi avantajları vardır.

Süperkritik akışkanlarla ayırma işlemlerinin yüksek basınçta (>80 atm) gerçekleşmesinden dolayı yüksek yatırım maliyeti ve yüksek enerji gereksinimi gibi birkaç dezavantajı vardır. Son derece önemli olduğu halde ihmal edilen diğer bir dezavantajı ise, en çok kullanılan CO₂ tir. Saf CO₂ tüplerinin içeriğinde bile varolan %1-2'lik oksijenin, antioksidanlar gibi oksijene hassas bileşikler ile tepkimeye girip az miktarda da olsa bozunmalarına neden olmaktadır (Yamagucci, 1986).

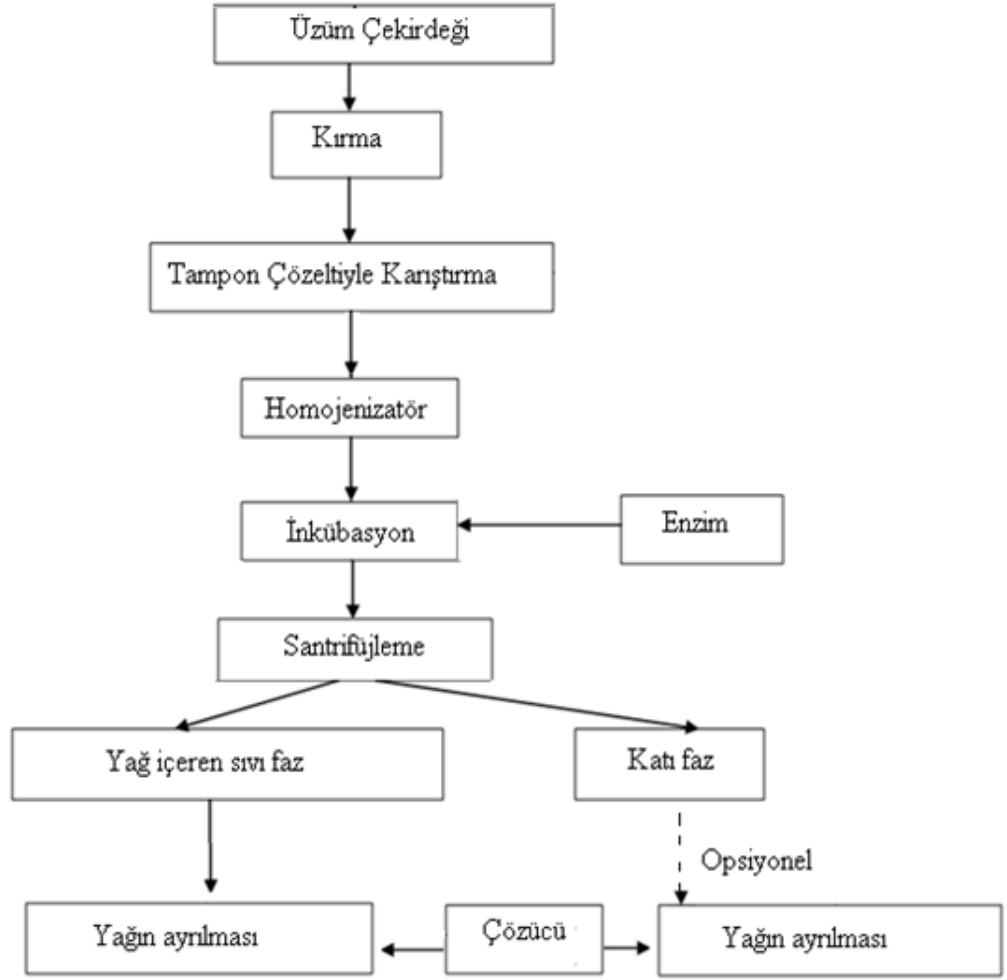
2.3.5 Enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemi

Yağlı tohumlardan yağ elde edilmesinde bugün en yaygın olarak kullanılan yöntem çözücü ekstraksiyonudur. Tipik çözücü olarak genelde hekzan kullanılmasına ve çözücünün çok büyük miktarının uçurularak geri kazanılmasına rağmen güvenlik ve çevreyle ilgili endişeler hala devam etmektedir. Çevre Koruma Ajansı (EPA) da yağlı çekirdeklerin ekstraksiyonunda çözücü emisyonunu önemli bir ekolojik kirleticisi olarak duyurmuş ve bu konuda bağlayıcı düzenlemeleri devreye koymaya çalışmaktadır (EPA, 2001).

Organik çözücülerin kullanılması güvenlik açısından sorun yarattığından, çözücü olarak su kullanımı denenmiş, ancak ilk denemeler düşük yağ verimi nedeniyle başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Buna rağmen bu konu üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Enzimatik sulu ekstraksiyonu yağın su içinde çözünmezliğine dayanan güvenli bir işlemdir. Bu yöntemde yağ ekstrakte edilebildiği gibi protein de ekstrakte edilebilmektedir. Ekstraksiyon mekanizmasının esası hücre duvarının yıkılması ile protein ve yağın açığa çıkması olduğundan bunların ekstraksiyonu eş zamanlı olarak gerçekleşir. Ekstraksiyonunu etkileyen değişkenler (enzim bileşimi, ortam pH'ı, partikül büyüklüğü, sıcaklık, çalkalama hızı, süre ve katı-sıvı oranı) yağ ve protein ekstraksiyon verimlerini belirlemektedir. Selülaz, hemiselülaz, pektinaz gibi enzimler kotiledon hücre duvarlarını yıkarken, proteaz ise yağlı membran yüzeylerini bozunmaya uğratmaktadır. Proteolitik enzimler yağ bileşenlerinin etrafını saran lifofilik proteinler olan oleozinleri hidrolize etmekte, böylece oleozinlerin yüzey aktiviteleri azalmakta ve yağ ayrımı gerçekleşmektedir (Moura, 2008).

Sulu ekstraksiyon, yangın ve patlama riski de içermediğinden soğuk presleme ve çözücü ekstraksiyonu yöntemlerinden daha avantajlıdır. İşlem, daha güvenli çalışma olanağı sunması, daha düşük ilk yatırım masrafı gerektirmesi ve farklı tohumlarla çalışılabilmesi açısından daha esnek bir çözümdür. Ilımlı işletme koşulları, rafine edilmeyi gerektirmeyen yağ eldesini ve zehirsiz gıda üretimini olanaklı kılar (Latif, 2009). Öte yandan, sulu ekstraksiyonun veriminin çözücü ekstraksiyona göre daha düşük olması çözüm bekleyen bir sorundur. Ekstraksiyon verimi hücre duvarını degrade eden karbohidrazların ve proteazların hidrolitik etkisi ile artırılabilir (Ramadan, 2009). Enzim destekli sulu ekstraksiyon ifadesi de buradan gelir. Üzüm çekirdeklerinden enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesi kademelerinin şematik gösterimi Şekil 2.3 de gösterildiği gibidir.

Enzimatik sulu ekstraksiyonda izlenen adımlar genelde yağ elde edilecek maddenin öğütülmesi (ıslak veya kuru), ufalanmış malzemenin sulu çözeltide karıştırılması, enzimle inkübasyonu, sıvı ve likit fazların santrifüjle veya filtrasyonla birbirlerinden ayrılması ve sıvı fazdan yağın elde edilmesidir.



Şekil 2.3 : Üzüm çekirdeği için enzimatik sulu ekstraksiyon işlemi

Yağı elde edilmek istenen maddenin kimyasal kompozisyonuna bağlı olarak bazı ek işlemlerde gerekebilmektedir. Örneğin mısır özü yağı ekstraksiyonunda enzimle inkübasyon basamağından önce mısır tohumlarında doğal olarak bulunan lipazı inaktive etmek için ısı uygulanmaktadır (Bocevskaa, 1993). Kanola yağında ise enzimatik inkübasyon öncesinde çekirdekler ekstraksiyon sırasında nitril ve izotiosiyamid gibi toksik bileşikler ortaya çıkaran mirozinaz enzimini inaktive etmek amacıyla, ısıtılmaktadır. Böylece bu risk ortadan kaldırılmış olunur (Zhang ve diğ., 2007).

Enzimatik sulu ekstraksiyonda hücre duvarlarının yıkımı ile açığa çıkan yağ ekstraksiyon ortamında genellikle üç faz halinde dağılmış olur. Serbest yağ fazı, emülsiyeye olmuş yağ ve krema tabakasındaki yağ fazları. Soya fasulyesinin enzimatik

ekstraksiyonunda bu 3 formun 3 ü de ayrı ayrı oluşurken; mısır özü, kanola ve hindistan cevizi işlemlerinde emülsifiye ve serbest yağ fazları, ayçiçeği yağı eldesinde ise sadece emülsifiye yağ fazı gözlenmiştir. Bu fazlara dağılmış yağların ayrı miktarlarının tespiti neredeyse imkansızdır. Bu nedenlerden dolayı sonuç olarak yağ ekstraksiyonu veriminde sıvı faza geçen toplam yağ miktarı üzerinden hesaplamalar yapılır (Rosenthal, 1996).

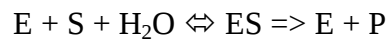
Enzimatik sulu ekstraksiyon ve hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen yağların serbest yağ asidi, peroksit ve diğer oksidasyon değerleri açısından fark olmadığı da gözlemlenmiştir (Dunford, 2004).

2.4 Enzimler Hakkında Genel Bilgi

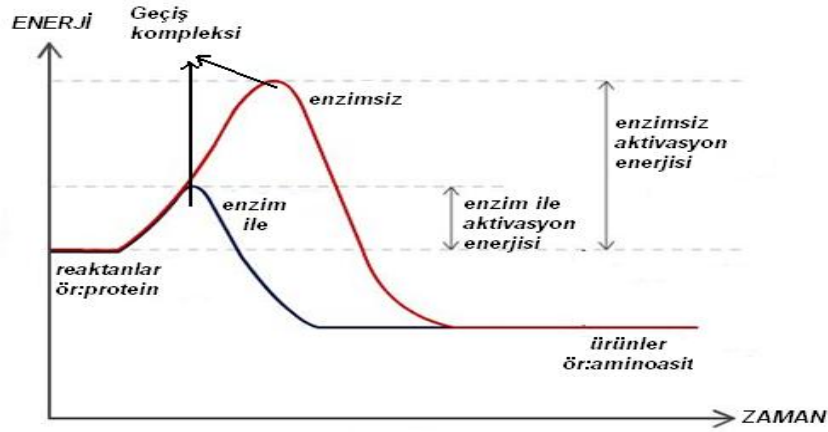
Canlıları oluşturan biyomoleküller, kinetik yönden oldukça kararlı olduklarından reaksiyon vermeleri zordur. Biyolojik katalizörler olarak tanımlanan enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandırarak hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden %100 lük bir ürün verimi sağlarlar. Protein yapısında olan enzimler, proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş grubu olarak nitelendirilirler. Enzimlerin katalizör özelliklerinin yanı sıra hücrelerin DNA'larından bilgi aktarılmasında rol alma gibi önemli görevleri vardır (Solomon ve diğ., 2002).

Birbirinden farklı işlevleri olan enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve reaksiyon mekanizmalarına göre 6 ana grupta sınıflandırılmıştır. Bunlar oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır.

Sulu ekstraksiyon prosesinde kullanılan enzimler, peptid ve glikozid bağlarının bir H₂O molekülünün katılmasıyla hidrolizini katalizleyen hidrolaz enzimleridir. Gerçekleştirdikleri reaksiyonlar aşağıdaki gibidir (Keha ve Küfrevioğlu, 2004).



Şekil 2.4 de görüldüğü gibi enzimlerin reaksiyonları hızlandırma etkisi, reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli aktivasyon enerjisini düşürmelerinden ileri gelir (Url-1, 2010). Sonunda bir değişikliğe uğramadan eski formlarına geri dönerler (Solomon ve diğ., 2002).



Şekil 2.4: Bir kimyasal reaksiyonun enzim ile katalizlenmiş ve katalizlenmemiş halleri için enerji diyagramı

Bu avantajlı katalizörlerin aktivitesine substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, pH, sıcaklık, iyonik şiddet, kofaktör konsantrasyonu, inhibitör ve aktivatör konsantrasyonları gibi faktörler etki eder. Enzimler, bu faktörlerin farklı değerlerinde en yüksek verimle çalışabilirler, diğer bir deyişle, her biri için optimum değerler farklıdır (Keha ve Küfrevioğlu, 2004). Bu çalışmada kullanılacak enzimler için optimum değerler, enzimlerin diğer özellikleri açıklanırken verilecektir.

2.4.1 Selüloz enzimi

Selüloz enzimi, selülozu hidroliz etmede kullanılan, geniş çapta mantar ve bakterilerden elde edilen bir enzimdir. Endüstride yaygın olarak kullanılan bu enzim, biyoteknolojik enzimler arasında önemli bir yere sahiptir. Selüloz enzimleri yaygın olarak alkol üretiminde, deterjan sanayiinde, tekstil ve kağıt endüstrisinde, sebze ve meyve sularının berraklaştırılmasında, bira mayalanmasında ve şarap üretimi gibi sektörlerde kullanılmaktadır (Özşahin, 2006).

Yapılan araştırmalar selüloz enzimlerinin çalışma şartlarını; asidik olanlar için 45-55°C ve pH 4,5-5,5; nötral olanlar için 50-60°C ve pH 6-8 optimum olarak belirlenmiştir (Aslan ve Körlü, 2009).

2.4.2 Proteaz enzimi

Proteaz enzimi, doğal hayatta bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynayarak besin döngüsünü sağlamakta ve bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadır. Proteazlar, endüstriyel pazarda oldukça büyük bir yere sahiptirler. Özellikle son dönemde deterjan sektöründe, proteaz enzimi

sayesinde önemli gelişmeler olmaktadır. Bunun yanında proteaz enzimleri, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde de kullanılmaktadır (Özşahin, 2006).

Bu enzim üzerine yapılan çalışmalar, proteaz enziminin aktif olarak pH 4 ile 9 aralığında, sıcaklık olarak ise 10 – 70° C arasında çalıştığını göstermiştir (Parlak ve diğ., 2008).

2.4.3 Pektinaz enzimi

Bitki hücre duvarında, bitki dokularının bütünlüğünü sağlayan pektin maddesinin parçalanmasını sağlayan enzimdir. Endüstride özellikle, meyve sularının berraklaştırılması ve konsantre edilmesinde, şarapların berraklaştırılmasında ve keten için selüloz liflerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır.

Bir çok çeşidi bulunan pektinaz enziminin optimum çalışma şartları yapılan araştırmalar ve deneyler sonucu pH 3 ve 30°C olarak tespit edilmiştir (Kaymak ve Aksöz, 2005).

2.4.4 Hemiselülaz enzimi

Hemiselülaz, anaerobik funguslar gibi bitkiler tarafından bitki biyokütlesini parçalamak için üretilen bir çeşit enzimdir (Yıldız, 2008). Hemiselülaz grubu enzimler, ayrıştırdıkları substrata göre isimlendirilirler; örneğin, ksilan ayrıştırıcılar ksilanaz, mannan ayrıştırıcılar mannaz gibi (Haktanır ve Arcaç, 1997). Hemiselülaz, ekmek, bisküvi, kek ve diğer fırın ürünlerinin kalitesini geliştirmek amacı ile son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Erem ve Certel, 2006). Bunun yanında, büyük miktarlarda üretilmeleri nedeniyle, nisbeten daha ekonomik olan, hemiselülaz türü enzimler, kağıt endüstrisinde özellikle tercih edilmektedir.

Bu enzim üzerine yapılan çalışmalar, hemiselülaz için ortam pH'ının 4-7 aralığında olması gerektiğini, sıcaklığın ise optimum 50°C olarak seçilmesini önermektedir (Yılğör, 2010).

2.5 Literatürde Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Yağın tohumlardan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ, protein ve antioksidan maddelerin eldesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

Yağlı tohum olarak Afrika, Arabistan, güneybatı Asya ve Avustralya’da yetiştirilen kalahari kavununun kullanıldığı bir çalışmada Nyam ve çalışma arkadaşları, kavun çekirdeklerinden petrol eteri ve sulu enzimatik yöntemi ile yağ elde etmişlerdir. Bu çalışmada iki farklı enzim Flavourizm 1000 L ve Nötraz 0.8 L kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda görülmüştür ki bu yağların serbest yağ asidi, peroksit, iyot ve sabunlaşma değerleri birbirine çok yakın değerlerdedir. Yağların erime noktaları arasında yine önemli bir fark görülmemektedir. Enzimle ekstrakte edilen yağ daha açık sarı renkte, çözücü kullanılarak elde edilen yağ daha koyu renkli olmuştur (Nyam ve diğ., 2009).

Soya fasulyesinden enzimatik ekstraksiyon yardımıyla protein ve yağ elde etmeyi amaçlayan bir çalışmada, Moura ve arkadaşları Protex 6 L ve Protex 7 L ticari proteaz enzimlerinin protein ve yağ verimi üzerindeki etkilerini incelenmiştir. Hem protein hem de yağın krema, serbest yağ ve emülsifiye faz olmak üzere 3 farklı fraksiyonda dağılım yaptığını gözlemiştir. 0.5% Protex 6 L kullanılarak elde edilen yağ ve protein verimleri sırasıyla 96% ve 85% olarak hesaplanmıştır. Çalışmada emülsiyonu kırmak için çeşitli enzimatik ve pH uygulamaları denenmiştir. pH 4.5 da 2.5% Protex 6 L kullanıldığında emülsiyon kırılabilmiştir (Moura ve diğ., 2008).

Man ve çalışma arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada, hindistan cevizi yağının çeşitli enzimlerle ekstraksiyonu incelenmiş, selüloz, poligalakturonaz, proteaz ve α -amilaz enzimlerinin değişik konsantrasyonlarda, değişik pH (4-8) ve sıcaklıklarda (40⁰, 50⁰, 60⁰) yağ verimi üzerindeki etkileri ölçülmüştür. Selüloz, α -amilaz, poligalakturonaz ve proteaz enzimlerinin %1 ilavesi ile pH 7 ve 60⁰C de işleme tabi tutulunca en yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiştir (73.8%). Elde edilen yağların özellikleri ve rengi arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Man ve diğ., 1996).

Zhang ve çalışma arkadaşları, enzimatik elde edilmiş kanola yağı ve protein hidrolizatlarının yağ ve protein verimlerini arttırmak amacıyla bir çalışmada, enzimatik reaksiyon sonrası katı bakiyeye ve sulu faza çeşitli yıkama ve emülsiyon kırma işlemleri uygulamışlardır. Toplam yağ ve protein hidrolizat verimleri sırasıyla 88-90% ve 94-97% olarak bulunmuştur. Protein geri kazanımı 66.7% olup proteinler ham kanola peptidleri bakımından da 47.04% den 73.51% ye zenginleşmişlerdir (Zhang ve diğ., 2007).

Mısır özünden mısır yağını eldesi için Moreau ve ekibi, mısır özünü çeşitli enzimlerle 4 saat 50 °C ve 16 saat 65 °C da reaksiyona tabi tutmuşlardır. Mısır özü örneklerinden 3 farklı ticari selüloz kullanarak yaklaşık 80% yağ verimleri ile yağ elde edilmiştir. Dört katı madde kullanıldığında ise verim 90%'a yükselmiştir. Enzim kullanılmadan sadece sulu ekstraksiyon yöntemiyle ise verimin 37% olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, hekzanla ekstrakte edilmiş mısır özü yağıyla enzimatik sulu ekstraksiyon kullanılarak elde edilmiş yağın aynı özelliklerde olduğu sonucuna varılmıştır (Moreau ve diğ., 2004).

Ayçiçeğinden enzimatik yağ ekstraksiyonu çalışması Latif ve Anwar tarafından gerçekleştirilmiştir. Enzimatik prosesin ayçiçek yağı üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, Protex 7L, Alkalaz 2.4L, Viskozim L, Natuzim ve Kemzim olmak üzere 5 farklı enzim kullanılmıştır. En yüksek yağ verimine (tohumdaki toplam yağın % 87.25'i) Viskozim ile ulaşılmış, bunun yanında, Protex 7L'nin sulu fazda en yüksek seviyede protein eldesi sağladığı belirlenmiştir. Bu sonuca 45°C sıcaklıkta, 120 rpm'de 2 saatlik reaksiyonun ardından 15 dakikalık santrifüjleme (7000 rpm, 30°C) sonunda varılmıştır (Latif ve Anwar, 2009).

Ramadan ve Moersel tarafından yapılan benzer bir çalışmada, yer kirazı (goldenberry) çekirdekleri kullanılmıştır. Optimum su:enzim:substrat oranı 4:0,02:1 olarak seçilmiştir. Bu koşullarda enzim içermeyen kontrol prosesinde %3 yağ verimi alınırken, en iyi sonucu sağlayan, selülozun kullanıldığı proseste %42'lik verime ulaşılmıştır (Ramadan ve Moursel, 2009).

Soto ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir araştırmada, hodan (borage) tohumundan enzim destekli soğuk presleme işlemi ile yağ ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Hodan tohumu polifenol ve tokoferol (E vitamini) içeriği yüksek bir tohumdur. Bu çalışmada hodan tohumlarından soğuk presleme yöntemi ile yağ çıkarılmış ve yağsız posasından da metanol ekstraksiyonu ile içerdiği polifenoller elde edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca soğuk preslemeden önce yapılan enzimatik işlemin elde edilen yağ oranını üç misli arttırdığı belirlenmiştir. Koşullar (sıcaklık 45°C, nem %20, %25 enzim miktarı ve Olivex:Celluclast, 1:1 karışımı) optimize edilmiştir (Soto ve diğ., 2008).

Literatürde üzüm çekirdeğinden yağ eldesinde enzimatik işlemlerin denendiği iki çalışma bulunmaktadır. Tobar ve arkadaşlarının Şili şarap endüstrisinin atıklarının

değerlendirilmesi üzerine yaptıkları birinci çalışmada, enzimatik ön işlemin soğuk presleme ile yağ eldesi verimine ve küspeden antioksidan kazanılmasına olan etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada üzüm çekirdeklerin Ultrazyme ve Celluclast enzimlerinin 3:1 oranında karışımı ile 45 °C’da 9 saat işlem görmesinin soğuk presleme işlemi verimini %59.4 oranında arttırdığı belirlenmiştir (Tobar ve diğ., 2005).

Passos ve çalışma arkadaşları tarafından yürütülen ikinci çalışmada, üzüm çekirdeklerinin sulu ekstraksiyonunda ilk olarak selüloz, pektinaz, proteaz ve hemiselüloz enzimlerinin optimum çalışma koşulları belirlenmiştir. İlk olarak optimum pH değerleri pektinaz, 3,5; selüloz, 5; hemiselüloz, 4-6; ve proteaz, 7,6 olarak bulunmuştur. İkinci olarak ekstraksiyona sıcaklığın etkisi incelenmiştir. 30°C ve 40°C’de benzer sonuçlar elde edilmesine rağmen, 50°C bu deney için oldukça düşük sonuçlar vermiştir ve sonuç olarak 30-40°C arası uygun bir aralık olarak kabul edilmiştir. Bir sonraki aşamada sürenin etkisi gözlemlenmiştir ve bunun için 8, 16, 24, 48 ve 120 saatlik deneyler yapılmıştır. En iyi sonuç 120 saatin sonunda alınmasına rağmen, bu sürenin normal şartlar için çok uzun olmasından dolayı 24 saat optimum kabul edilmiştir. Passos ve arkadaşları denemelerde iki farklı enzim karışımı ile çalışmalarını sürdürmüşler ve neticede nispeten düşük konsantrasyonda enzim karışımına karar vermişlerdir. Son olarak, bu çalışmada partikül büyüklüğünün verim üzerine olan etkileri incelenmiştir. Her ne kadar sonuçlar küçük boyutlu çekirdeklerle çalışmanın daha avantajlı olduğunu gösterse de, endüstriyel boyutta yapılan çalışmalarda bu kadar küçük boyutlar kullanımı tercih edilmeyeceğinden, boyutları 1,0 – 1,4 mm aralığında olan çekirdek fraksiyonu ile son denemeleri yapmışlardır. Sonuç olarak, üzüm çekirdeğinden enzimatik yağ ekstraksiyonu 30-40°C sıcaklık aralığında 24 saatte gerçekleştirilmiştir. Ortam pH’ı 4 olarak seçilmiş; enzimler, selüloz: 29, proteaz: 1191, pektinaz: 569 ve ksilanaz: 21 U/g çekirdek olacak şekilde kokteyl olarak kullanılmıştır. Reaksiyon sonunda çözelti sıvı azot ile dondurularak kurutulmuş ve yapısındaki su/nem bu şekilde alınmıştır. Çalışma sonucu ekstraksiyon verimi, enzimatik muamele yapılmamış tohumlara göre % 106’lık bir artış göstererek %13.7 çıkmıştır. Orijinal yağ içeriği %15,5 olan bu tohum fraksiyonundan %88 verimle yağ elde edilebilmiştir (Passos ve diğ., 2009).

Bu çalışmamızda, Haşkøy-Şarkøy, Tekirdağ yöresinde yetiştirilmiş Fransız kökenli Gamay cinsi üzümlerden toplanmış çekirdekler ile enzimatik sulu ekstraksiyon

deneyleri yürütülmüştür. Kimya Mühendisliği Bölümünde Tüntaş ve Özsoy'un Bitirme Ödevi çalışmasında aynı tohumlar ile ön çalışmalar yapılmıştır. Çalışmada en iyi sonuçlar Alcalase 1.2L proteaz enzimi ile 1,25 mL/g enzim miktarında, pH4 de 18 saat sonunda ulaşılan %10,2 lik yağ verimidir (Tüntaş ve Özsoy, 2010). Bu tezimizde sistematik olarak reaksiyon parametrelerinin etkileri incelenecektir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Hammaddeler

Deneyleerde kullanılan üzüm çekirdekleri Fransız kökenli Gamay cinsi üzümleerden elde edilmiş olup bu üzümleerin yetiştiiği yöre Haşküy-Şarküy, Tekirdağ'dır. Üzümleerin bağ bozum tarihi 10 Ekim 2009, mekanik ezilme ve depolanma tarihi 12 Ekim 2009'dur. Çekirdekler 28 – 29 Ekim'de ayıklandıktan sonra, 30 Ekim – 2 Kasım 2009 tarihleri arasında kurutulmuştur.

Enzimatik ekstraksiyon deneylelerinde proteaz olarak Alcalase 2,5L ve selülaaz olarak ise Celluclast 1,5L enzimleri kullanılmış olup bu enzimleer Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark) firmasından hediye edilmiştir.

Alcalase 2,5L Type-DX *Bacillus licheniformis* mikroorganizmalarından elde edilmiş proteazdır ve proteolitik aktivitesi 2,5 AU/g (Anson Units/gram) dır. Enzimin optimum sıcaklık aralığı 55-70 °C ve optimum pH aralığı 4-8'dir. Celluclast 1,5L *Trichoderma reesei* mikroorganizmalarından elde edilen ve selulolitik aktivitesi 700 EGU/g (Endo-Glucanase Units/gram) olan selülaaz'dır. Enzimin optimum sıcaklık aralığı 50-60 °C ve optimum pH aralığı 4,5-6,0'dır.

Fosfat tampon çözeltileri potasyumdihidrojen fosfat (KH₂PO₄) (1/15mol/L) stok çözeltisi ile disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) (1/15mol/L) stok çözeltisinin karışımı ile hazırlanmıştır.

Deneylelerde kullanılan çözücüler ve diğeer kimyasal maddeler Merck firmasından temin edilmiştir.

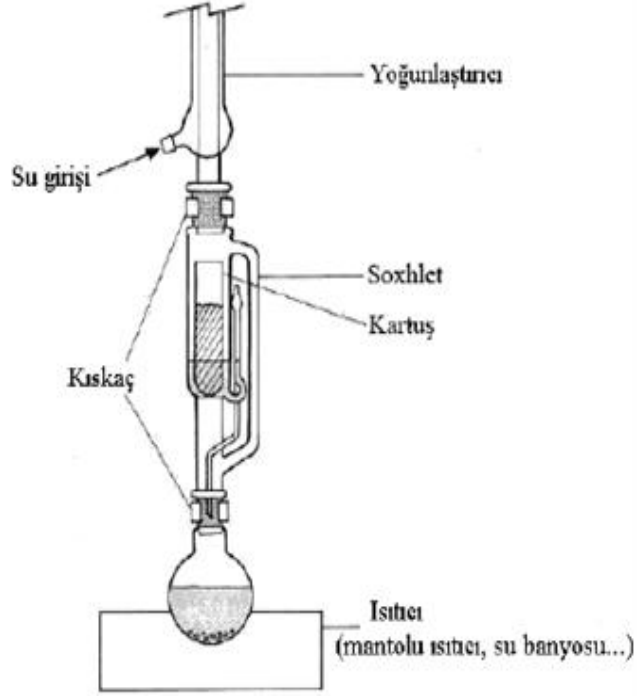
3.2 Yöntemleer

3.2.1 Üzüm çekirdeklerinin öğütölmesi ve yağ ieeriklerinin saptanması

Kurutulmuş üzüm çekirdekleri ilk olarak kahve değirmeninde öğütölümüştür. Öğütölümüşt taneler daha sonra eleklerden elenmiş ve tane büyüklüğüne göre iki gruba ayrılmıştır. Tane boyutları 0,6 mm den daha ufak taneleri ieerer fraksiyon ÜÇ1 ve

0,6-1,0 mm aralığında olan fraksiyon ÜÇ2 ve olarak adlandırılmıştır. Her iki fraksiyonun Soxhlet cihazında yağ içerikleri belirlenmiştir.

Genellikle yağ içeren bitkisel tohum ve çekirdekleri gibi maddelerin yağ içeriklerinin saptanmasında kullanılan Soxhlet düzeneği Şekil 3.1’ deki gibidir (Url-2, 2010).



Şekil 3.1: Soxhlet Düzeneği

Soxhlet düzeneğinde yağ içeriği belirlenecek olan madde belli bir tane büyüklüğüne getirildikten sonra, 10 gram ÜÇ1 veya ÜÇ2 fraksiyonu, Soxhlet cihazının ekstraktör bölümüne kartuş içinde yerleştirilmiş ve 4 saat boyunca hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Çözücü kartuş içerisindeki katı madde ile temas eder ve yağı çözer. Kartuşun bulunduğu haznede biriken çözücü sifonlama ile aşağıdaki balona dolar. Bu işlem genellikle 4 saat devam eder. Ekstraksiyon sonrası hekzan çözeltisi darası belli balona alınmış ve döner buharlaştırıcı (Laborata 4000-efficient Heidolph, USA) 85 °C’de hekzan evapore edilmiştir. İşlem sonucunda balon tekrar tartılmış ve elde edilen yağ miktarı üzerinden her iki fraksiyonun yağ içerikleri hesaplanmıştır.

3.2.2 Üzüm çekirdek yağının yağ asitleri bileşiminin belirlenmesi

Üzüm çekirdek yağının yağ asitleri bileşimini belirlemek için önce, ÜÇ1 ve ÜÇ2 fraksiyonlarından elde edilmiş üzüm çekirdeği yağlarının BF₃ ile metanollü ortamda metil esterleri hazırlanmıştır. Daha sonra bu yağ asitleri metil esterlerinin bileşimi

Hewlett-Packard 5890 II (Hewlett-Packard, Waldron/Almanya) gaz kromatografi cihazı ile saptanmıştır. Uygulanan kromatografik analiz koşulları Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1: Gaz kromatografisi analiz koşulları

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

⁽¹⁾ Alev iyonizasyon dedektörü

⁽²⁾ 30 m x 0.32 mm, 0.5µm film kalınlığında polietilen glikol (PEG)

Kromatogramlarda elde edilen piklerin tanımlanmasında 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0 ve 20:1 yağ asitleri metil esterlerini içeren standard bir karışım (Sigma-Aldrich)’ın aynı cihaz ve koşullarda yapılan analizinden elde edilmiş kromatogram kullanılmıştır.

3.2.3 Üzüm çekirdeklerinden enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesi

Belli tane büyüklüğündeki üzüm çekirdekleri fraksiyonlarından (ÜÇ1/ÜÇ2) enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesine pH, sıcaklık, süre, enzim cinsi ve miktarının etkileri incelenmiştir. Ekstraksiyon denemelerinde uygulanan prosedür Moreau ve arkadaşlarının kullandıkları çalışma koşulların modifiye edilmiş şeklidir (Moreau ve diğ., 2004). Ekstraksiyonlarda pH değerleri belirli fosfat tampon çözeltileri kullanılmıştır.

ÜÇ1 fraksiyonu ile çalışıldığında 4 g örnek 50 mL'lik polikarbonat falkon santrifüj tüplerine konulmuş ve üzerine 30 mL pH'ı belirli fosfat tampon çözelti ilave edilmiştir.

ÜÇ2 fraksiyonu ile çalışma durumunda ise 8 gram örnek 100 mL'lik cam balona tartılmış ve üzerine 60 mL tampon çözeltisi konulmuştur. Bu karışım homojenizatör (Heidolph SilentCrusher M tip, Heidolph Instruments GmbH&Co., Schwabach/Almanya)'de 14000 rpm de 1'er dakika homojenize edilmiştir. Böylece hücre çeperlerinin homojen parçalanması ve tampon çözelti ile ıslanması sağlanmıştır.

Falkon tüplerine/balonlara daha sonra gereken miktarda enzim katılmış ve tüpler/balonlar orbital çalkalayıcıya (Edmund Bühler, KS-15, Germany) yerleştirilmiştir. Çalkalama işlemine 200 rpm hızında 50 °C'de belirli süre devam edilmiştir. Çalkalama sonrası tüpler/balonlar 95 °C'lik sıcak su banyosunda 15 dakika bekletilmiş ve böylece enzimlerin inaktive olması sağlanmıştır.

Falkon tüpleri ile çalışıldığında tüpler direkt olarak, balonlar ile çalışıldığında ise balon muhtevası önce iki falkon tüpüne bölünmüş ve sonra bu tüpler santrifüj cihazına (Universal 32, Hettich Zentrifugen, Germany) yerleştirilmiştir. Tüpler 4000 rpm'de 1 saat boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjlenen karışım tüp içerisinde dört faza ayrılmıştır. En üstte yağ fazı, daha sonra kremamsı görünümdeki yağ-su emülsiyon fazı, berrak olmayan sulu faz ve en dipte ise küspe diye adlandırılan katı faz yer almıştır. Enzimatik ekstraksiyon denemelerinde en büyük zorluk, enzimatik reaksiyonlar sonucu açığa çıkan hidroliz ürünleri (protein, selüloz, hemiselüloz, pentanoz makromoleküllerinin hidroliz ürünleri) ile sulu ortama geçen yağ molekülleri arasında oluşan bazı kimyasal bağlar sonucu emülsiyon oluşumudur. Dolayısıyla reaksiyon ortamından yağın tamamının yüzeyde toplanması bu nedenle engellenmektedir. Bundan dolayı ekstraksiyon verimlerinin hesaplanmasında aşağıda açıklanan iki farklı yöntem uygulanmıştır.

Çözücü vasıtasıyla sıvı fazlardan geri kazanılan yağ üzerinden yağ veriminin (V_s) hesaplanması: Santrifüj tüpünde sıralanan yağ fazı, kremamsı faz ve sulu faz dikkatli bir şekilde içerisinde çözücü [(50 mL hekzan ve 50 mL su) veya (100 mL kloroform:metanol, 2:1 karışımı)] bulunan ayırma hunisine aktarılmıştır. Ayırma

hunisindeki karışım çalkalanmış ve fazlara ayrılması beklenir. Sulu ve çözücü fazı olmak üzere iki faza ayrılan karışımdan sulu faz başka bir ayırma hunisine aktarılmış ve aynı işlemler 2-3 defa tekrarlanmıştır. Çözücü fazı (hekzan veya kloroform) darası bilinen balona nakledilmiş ve balon döner buharlaştırıcıya yerleştirilmiştir. 80-85 °C'de çözücünün evapore edilmesinden sonra balonda kalan yağ miktarı tartılmış ve aşağıdaki eşitliğe göre V_e yağ verim değeri hesaplanmıştır:

$$V_s (\%) = (Y_s / Y_b) \times 100 \quad (3.1)$$

Burada, Y_s = Sıvı fazlardan çözücü ile geri kazanılan yağ miktarı, gram; Y_b = İşleme tabi tutulan tohumların içerdiği başlangıç yağ miktarı, gram'dır.

Küspede kalan yağ üzerinden yağ veriminin (V_k) hesaplanması: Santrifüjleme sonucu tüpte kalan küspe, katı faz, süzgeç kağıdı üzerine nakledilmiş ve 105 °C'de kurutulmuştur. Daha sonra süzgeç kağıdı ve küspe birlikte 250 mL'lik behere yerleştirilmiş ve üzerine 15 mL/g madde olacak şekilde hekzan konulmuştur. Beher içeriği manyetik karıştırıcıda 800 rpm'de 1,5 saat karıştırılarak küspede kalan yağın hekzana geçmesi sağlanmıştır. Hekzanlı çözelti daha sonra süzgeç kağıdından darası belirli balona süzölmüştür. Süzgeç kağıdı üzerinde kalan küspe partikülleri birkaç defa 15 mL hekzan ile yıkanmış ve yıkama çözeltileri de balona ilave edilmiştir. Balon döner buharlaştırıcıya yerleştirilmiştir. 80-85 °C'de hekzanın evaporasyonu sağlanmıştır. Balon tekrar tartılmıştır. Aşağıdaki eşitliğe göre V_k yağ verim değeri hesaplanmıştır:

$$V_k (\%) = [(Y_b - Y_k) / Y_b] \times 100 \quad (3.2)$$

Burada, Y_b = İşleme tabi tutulan tohumların içerdiği başlangıç yağ miktarı, gram; Y_k = Küspede kalan yağ miktarı, gram'dır.

3.2.4 Üzüm çekirdeklerinden enzimatik sulu ekstraksiyon ile en yüksek verimle elde edilmiş yağın karakterizasyonu

Bu son bölümde ise enzimatik sulu ekstraksiyon ile en yüksek verimin sağlandığı koşullarda olarak elde edilmiş üzüm çekirdek yağının asit değeri ve yağ asitlerinin bileşimi belirlenmiştir. Asit değeri AOCS standard yöntemine göre saptanmıştır. Yağ asitlerinin bileşimleri ise Bölüm 3.2.2 de açıklanan çalışma prosedürü uygulanarak belirlenmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızın amacı üzüm çekirdeklerinden enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile mümkün olduğu kadar yüksek verimle yağ elde etmektir. Önce soxhlet cihazında hekzan ile üzüm çekirdeklerinin içerdiği yağ miktarı tayin edilmiştir. Bu değer %100 ekstraksiyon verimi olarak kabul edilmiştir. Daha sonra enzimatik koşullarda, proteaz ve selüloz enzimleri katkısıyla, ekstraksiyonlar yapılmış ve pH'nın, sürenin, enzim cinsi ve miktarının ekstraksiyon verimine olan etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

4.1. Üzüm Çekirdeklerinin Yağ İçerikleri ve Çekirdek Yağının Yağ Asitleri Bileşimi

ÜÇ1 ve ÜÇ2 fraksiyonlarının yağ içerikleri soxhlet cihazı ile sırasıyla % 21,1 ve %9,3 olarak saptanmıştır. Her iki fraksiyondan elde edilen yağların metil esterleri hazırlanmış (FAME) ve Bölüm 3.2.2 de açıklanan analiz prosedürüne göre gaz kromatografisi ile yağ asitleri bileşimleri belirlenmiştir. Her iki fraksiyonun yağ asitleri bileşimleri arasında fark bulunmamıştır. Üzüm çekirdeği yağının yağ asitleri bileşimi Çizelge 4.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1: Üzüm çekirdeği yağı yağ asitleri bileşimi

Yağ Asidi	Yağ Asidi Bileşimi (%)
Palmitik asit (16 : 0)	8,3
Palmitoleik asit (16 : 1)	0,2
Stearik asit (18 : 0)	4,6
Oleik asit (18 : 1)	18,8
Linoleik asit (18 : 2)	68,6
Linolenik asit (18 : 3)	0,4

Üzüm çekirdekleri yağının esansiyel yağlardan biri olan linoleik asitce zengin olduğu görülmektedir.

4.2 ÜÇ1 Fraksiyonunun Enzimatik Ekstraksiyonuna pH, Enzim Cinsi ve Miktarının ile Çözücü Etkisi

Çalışmamızın ilk aşamasında, 0,6 mm den küçük boyutlardaki taneleri içeren (ÜÇ1) fraksiyonu ile sulu ekstraksiyon deneylerine başlanmıştır. Yapılan ilk denemelerde ekstraksiyon sonrası yağ moleküllerinin çok az miktarının tabaka halinde yüzeyde toplandığı buna karşılık emülsiyon halinde kremamsı tabakada ve sulu fazda daha fazla yağ moleküllerinin bulunduğu gözlenmiştir. Sulu ekstraksiyon sonucunda yağ veriminin hesaplanabilmesi için hücrelerden açığa çıkan yağ miktarının bilinmesi gereklidir. Yağ miktarının belirlenebilmesi için de sıvı fazlardan (yağ fazı, kremamsı faz ve sulu fazdan) yağın çözücü ile ekstraksiyonu zorunlu hale gelmiştir.

4.2.1 ÜÇ1 fraksiyonundan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, yağ verimine çözücü etkisi

Yağ miktarının belirlenebilmesi için sıvı fazlardan yağın çözücü ile geri kazanılmasında, çözücü olarak hekzan veya kloroform/metanol karışımından hangisinin kullanılması gerektiğine karar vermek için birinci seri enzimatik sulu ekstraksiyon denemeleri yapılmıştır. 4 gram tohum, 30 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 4, pH 5 ve pH 6) ve gram tohum başına 1,25 mL enzim (selülaz ve proteaz) katılımı ile hazırlanan karışımlar ayrı ayrı 50 °C da 6 saat reaksiyona tabi tutulmuştur. Her reaksiyon 4 kez tekrarlanmış ve 4 reaksiyon ürününün ikisinin (%V_s) verim hesaplaması hekzan üzerinden diğer ikisinin (%V_s) verim hesabı ise kloroform:metanol (2:1, hacim:hacim) karışımı üzerinden yapılmıştır. Selülaz ve proteaz enzimleri ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3 de verilmiştir.

Çizelge 4.2: ÜÇ1 fraksiyonunun selülaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve çözücü cinsinin etkisi (süre: 6 saat, enzim miktarı: 1,25 mL/tohum)

Çözücü cinsi	Yağ verimi (%V _s)		
	pH 4	pH 5	pH 6
Hekzan	1,4	1,7	1,2
Kloroform:metanol	4,3	7,4	5,3

Çizelge 4.3: ÜÇ1 fraksiyonunun proteaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve çözücü cinsinin etkisi (süre: 6 saat, enzim miktarı: 1,25 mL/tohum)

Çözücü cinsi	Yağ verimi (%V _s)		
	pH 4	pH 5	pH 6
Hekzan	2,6	2,2	2,1
Kloroform:metanol	6,2	5,9	7,7

Çizelge 4.2 ve 4.3'den görüldüğü üzere kremamsı ve sulu fazlardan yağın geri kazanılmasında kloroform:metanol çözücü karışımı hekzana göre daha iyi netice vermiştir. Verim değerleri 2,5-4,5 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu çizelgelerde yer alan verilerden yağ verimine proteaz enzimin etkisinin selüloz enziminden daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca her enzim için ortam pH'ının verime etkisi olduğu da gözlenmiştir. Bu sonuçlardan bundan sonraki deneylerde kloroform:metanol karışımı kullanılarak yağ verimlerinin bulunmasına karar verilmiştir.

4.2.2 ÜÇ1 fraksiyonundan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, yağ verimine enzim miktarının etkisi

Selüloz ve proteaz enzimleri ile daha yüksek yağ verimlerine erişmek amacıyla enzim miktarının etkisi incelenmeye alınmıştır. Bu amaçla, 3 gram tohum, 30 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 4, pH 5 ve pH 6) ve gram başına 0,25 mL, 0,50 mL, 1,0 mL ve 1,25 mL enzim (selüloz ve proteaz) kullanımı ile 50 °C da 6 saat ayrı ayrı reaksiyona tabi tutulmuştur. Çizelge 4.4 ve 4.5 de selüloz ve proteaz enzimi katkılı sulu ekstraksiyon işlemlerinin sonuçları görülmektedir.

Çizelge 4.4 incelendiğinde, pH 4 de enzim miktarının pratik olarak etkisi olmadığı, pH5 de yağ verimlerinin enzim miktarı ile %7,8 e kadar yükseldiği ve daha sonra biraz düşüş gösterdiği anlaşılmaktadır. pH 6 da ise 0,5mL/g enzim miktarı ile %7,1 gibi değere ulaşıldığı ve enzim miktarının artışı ile verim değerlerinin düşüşe geçtiği görülmektedir. Selüloz enzimi için en uygun pH 5 dir ve 1,0 mL/g enzim miktarı en iyi sonuç göstermiştir.

Çizelge 4.4: ÜÇ1 fraksiyonunun selüloz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve enzim miktarının etkisi (süre: 6 saat, çözücü: kloroform:metanol)

Enzim miktarı (g tohum) ⁻¹	Yağ verimi (%V _s)		
	pH 4	pH 5	pH 6
0,25 mL	4,0	4,6	3,2
0,5 mL	4,4	5,9	7,1
1,0 mL	4,5	7,8	5,9
1,25 mL	4,3	7,4	5,3

Çizelge 4.5: ÜÇ1 fraksiyonunun proteaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve enzim miktarının etkisi (süre: 6 saat, çözücü: kloroform:metanol)

Enzim miktarı (g tohum) ⁻¹	Yağ verimi (%V _s)		
	pH 4	pH 5	pH 6
0,25 mL	5,9	5,0	7,1
0,5 mL	6,5	5,3	10,4
1,0 mL	6,8	6,4	7,9
1,25 mL	6,2	5,9	7,7

Çizelge 4.5’den proteaz enziminin pH 5 de en düşük verim değerleri verdiği, bu enzim ile pH 4 ve özellikle pH 6 da izafi olarak yüksek verim elde edilebileceği görülmektedir. pH 5 de diğerlerine göre düşük verim değerleri eldesi proteinlerin izoelektrik noktalarının genellikle pH 4,5-5 arasında olması ile alakalı olabilir. Proteaz enziminin reaksiyon ürünü olan protein hidrolizatlarının ve amino asitlerin bu pH da sulu ortamda daha düşük çözünürlük göstermesi ve kısmen çökmesi yağların çözücü ile geri kazanımında negatif etki yapmış olabilir. pH 4 de en yüksek yağ verimi 1,0 mL/g enzim miktarı ile alınırken, pH 6 da ise verimin 0,5 mL/g enzim miktarında %10,4 gibi değere yükseldiği görülmektedir. Proteaz enzimi için pH6 da 0,5 mL/g enzim miktarı ile çalışmak daha uygundur.

Selüloz ve proteaz katkılı enzimatik ekstraksiyon sonuçlarının genel değerlendirilmesini yaptığımızda, 6 satlik bir sürede ÜÇ1 fraksiyonu ile çalışıldığında verim değerlerinin en fazla %10,4 e erişebildiği görülmektedir.

4.2.3 ÜÇ1 fraksiyonundan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, yağ verimine sürenin etkisi

Kimya Mühendisliği Bölümünde yürütülmüş ve Mayıs 2010 da tamamlanmış bitirme ödevinde aynı üzüm çekirdekleri fraksiyonu (ÜÇ1) ve aynı proteaz enzimi ile aynı çalışma prosedüründe çalışılmıştır (Tüntaş ve Özsoy, 2010). Çizelge 4.6 da bu çalışmada daha uzun reaksiyon sürelerinde elde edilmiş sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 4.6: ÜÇ1 fraksiyonunun proteaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine süre etkisi (pH 4, çözücü: kloroform:metanol, enzim miktarı: 0,625 mL/g)

Yağ verimi (%V _s)			
6 saat	12 saat	18 saat	24 saat
6,6	7,1	10,2	6,7

Çizelge 4.6'dan reaksiyon süresinin 3 katı arttırılmasının dahi yağ verimini çok fazla yükseltmediği görülmektedir. Proteaz enzimi 18 saatlik sürede ekstraksiyon verimini %10,2 e yükseltmiştir. 24 saatlik çalışmada ise verim %6,7'ye düşmüştür. Süre uzadıkça proteaz enzimi hücreden ortama daha fazla protein fraksiyonları ve amino asitlerini hidroliz eder. Oluşan bu hidroliz ürünleri sulu ortamdan yağın ekstraksiyonunu engellemiş olabilir.

Bu nedenle ÜÇ1 fraksiyonu ile daha yüksek yağ verimlerine ulaşmanın pratik olarak zor olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle bu ufak tane boyutlarındaki fraksiyon ile daha fazla deney yapılmamıştır. Bundan sonraki çalışmalarımızda ÜÇ2 fraksiyonu kullanılmıştır.

4.3 ÜÇ2 Örneklerinin Enzimatik Ekstraksiyonuna, Homojenizatör, pH, Enzim Cinsi ve Miktarı ile Sürenin Etkisi

Bu bölümde önce, ÜÇ2 fraksiyonunun daha büyük tane boyutlarında olması nedeni ile ekstraksiyon öncesi homojenizatör kullanmanın yağ verimine etkisi incelenmiştir. Daha sonra her enzim için en uygun miktar, pH ve süre tespiti amacıyla deneylere devam edilmiştir.

4.3.1 ÜÇ2 fraksiyonundan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, yağ verimine homojenizatörün etkisi

Bu bölümde ÜÇ2 fraksiyonunun ekstraksiyon öncesi homojenizatörde tampon çözelti içerisinde homojenize edilmesinin yağ verimine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla her iki enzim ile pH 4’de, 0,5 mL/g ve 1,0 mL/g enzim miktarlarında 6 saat sürede 2 seri ekstraksiyon denemeleri yürütülmüştür. Bir seri ekstraksiyon deneylerinde homojenizatör kullanılmıştır. Homojenizatörlü ve homojenizatörsüz gerçekleştirilmiş deneylerimize ayrıca iki yönteme göre (V_s ve V_k) yağ verimleri hesaplanmıştır. Bu reaksiyonlara ait sonuçlar Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.8 ‘de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7: ÜÇ2 fraksiyonunun proteaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine homojenizatör etkisi (pH 4, çözücü: kloroform:metanol, enzim miktarı: 0, 5 mL/g ve 1,0 mL/g)

	0,5 mL/g çekirdek		1,0 mL/g çekirdek	
	Verim (% V_s)	Verim (% V_k)	Verim (% V_s)	Verim (% V_k)
Homojenizatörlü	22,6	73,8	23,5	75,1
Homojenizatörsüz	25,0	63,8	25,8	66,0

Çizelge 4.8: ÜÇ2 fraksiyonunun selüloz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine homojenizatör etkisi (pH 4, çözücü: kloroform:metanol, enzim miktarı: 0, 5 mL/g ve 1,0 mL/g)

	0,5 mL/g çekirdek		1,0 mL/g çekirdek	
	Verim (% V_s)	Verim (% V_k)	Verim (% V_s)	Verim (% V_k)
Homojenizatörlü	9,3	50,6	9,7	52,5
Homojenizatörsüz	9,8	40,1	10,1	43,2

Her iki enzim ile ve her enzim miktarında yürütülmüş deneylerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Homojenizatör kullanımı ile sıvı fazlardan geri kazanılan yağ miktarlarında bir miktar düşme olduğu gözlenmektedir. Buna karşılık homojenizatör kullanıldığında V_k değerlerindeki yükselme bize ekstraksiyon ortamına daha fazla yağın geçtiğini göstermektedir. Tane boyutlarında azalma enzimlerin hücre komponentleri arasındaki temas yüzeyinin büyümesine sebep olmakta ve enzimatik reaksiyon daha da ilerlemektedir. Hücre dışına çıkan yağ miktarı dolayısıyla

artmaktadır. V_k değerlerinin artışı bu şekilde açıklanabilir. Hidroliz ürünlerinin çözeltide çoğalması, muhtemelen bu ürünler ile yağ molekülleri arasında bazı bağların oluşumu, yağ moleküllerinin çözücü ile çözeltiden ekstraksiyonunu engellemiş olabilir. Dolayısıyla V_s verim değerleri daha az bulunmaktadır.

Bu deneylerde ayrıca enzim miktarının bir misli artışının yağ verimlerini çok fazla artırmadığı da gözlenmiştir. Enzim maliyetini düşük tutmak amacıyla, bundan sonraki deneylerimizde her iki enzim için, 0,5 mL/g çekirdek miktarlarında ve homojenizatör kullanılmasına karar verilmiştir.

4.3.2 ÜÇ2 fraksiyonundan enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, yağ verimine pH ve sürenin etkisi

Çalışmamızın bu son bölümünde, 0,5 mL/g enzim miktarı kullanılarak proteaz enzimi ile pH 4, pH 5 ve pH 6'da, selüloz enzimi ile pH 4 ve pH 5'de 6, 15 ve 24 saat sulu ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde yine V_s ve V_k verim değerleri saptanmış ve sonuçlar mukayese edilmiştir. Bu koşullarda proteaz ve selüloz enzimleri ile elde edilen sulu ekstraksiyon verim sonuçları Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10 da verilmiştir.

Çizelge 4.9: ÜÇ2 fraksiyonunun proteaz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve süre etkisi (çözücü: kloroform:metanol, enzim miktarı: 0, 5 mL/g)

Süre(saat)	pH 4		pH 5		pH 6	
	Verim (% V_s)	Verim (% V_k)	Verim (% V_s)	Verim (% V_k)	Verim (% V_s)	Verim (% V_k)
6	22,6	73,8	18,7	79,0	26,1	75,4
15	10,2	65,4	8,1	72,2	11,3	62,8
24	19,8	69,1	16,2	76,7	20,4	70,4

Çizelge 4.9 dan proteaz enzimi ile yine pH 5 de en düşük yağ verimleri elde edilmiştir. Bu düşük değerler üzüm çekirdeği proteinlerinin izoelektrik noktası ile alakalı olmalıdır. En iyi V_s yağ verimi %26,2 olarak pH6 da 6 saatte elde edilmiştir.

Çizelge 4.10: ÜÇ2 fraksiyonunun selüloz enzimi destekli sulu ekstraksiyonda, yağ verimine pH ve süre etkisi (çözücü: kloroform:metanol, enzim miktarı: 0,5 mL/g)

Süre (saat)	pH 4		pH 5		pH 6	
	Verim (%V _s)	Verim (%V _k)	Verim (%V _s)	Verim (%V _k)	Verim (%V _s)	Verim (%V _k)
6	9,7	52,5	14,3	55,6	10,2	55,0
15	20,3	59,6	26,2	62,0	23,3	59,5
24	12,1	55,2	17,2	58,1	14,8	56,3

Çizelge 4.10'dan selüloz enzimi ile pH 5 de yine pH 4 ve pH6'ya göre daha yüksek yağ verimleri elde edilmiştir. pH 5 de ise 15 saatlik sürede %26,2 yağ verime ulaşılabilmiştir.

4.4 Enzimatik Sulu Ekstraksiyon ile Elde Edilen Üzüm Çekirdeği Yağının Karakterizasyonu

Enzimatik sulu ekstraksiyon ve Soxhlet yöntemine göre elde edilen üzüm çekirdeği yağlarının asit değerleri 1,50 ve 1,56 mg KOH/g yağ, kırılma indisleri ise 1,4745 ve 1,4746 olarak bulunmuştur.

5. VARGILAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı, insan sağlığı için önem teşkil eden değerli yağ asidi bileşimine sahip üzüm çekirdeğinden enzimatik yöntem ile yağ ekstraksiyonudur. Bu bağlamda, enzimatik ekstraksiyona etki eden parametreler incelenerek işlemin ekonomikliği ve verimliliği artırılmaya çalışılmıştır.

Günümüze kadar yapılmış araştırmalarda genel olarak enzimatik ekstraksiyona enzim cinsi, enzim miktarı, çalışılan pH aralığı, partikül boyutu, sıcaklık, reaksiyon süresi gibi parametrelerin etki ettiği görülmüştür. Bu saptamadan yola çıkarak, paralel olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda selülaz ve proteaz cinsi enzimler ile 5 farklı parametrenin etkisi incelemeye alınmış, çalışma sıcaklığı olarak her iki enzim için de uygun değer olan 50°C seçilmiştir. Tüm deneylerde sabit tutulan diğer bir parametre homojenizasyon süresidir ve bu işlem 1'er dakika olarak uygulanmıştır.

Literatürde bu tür çalışmalarda genel olarak hekzan kullanıldığı için ÜÇ1 fraksiyonuna yapılan deneyler önce hekzanla gerçekleştirilmiş daha sonra denenen kloroform-metanol 2:1 çözücüsünün çok daha iyi sonuçlar verdiği görülerek deneylere bu çözücü sistemiyle devam edilmiştir. Daha sonrasında ÜÇ1 fraksiyonunda enzim miktarı ve pH etkisi simültane olarak incelenmiş ve bu amaçla her iki enzim için 0,25 mL/g, 0,5 mL/g, 1 mL/g ve 1,25 mL/g çekirdek miktarlarıyla çalışıldığında proteaz için pH 6 da optimum enzim miktarının 0,5 mL/ g tohum olduğu belirlenmiştir. Süre 4 katına çıkarılsa dahi (24 saat) ÜÇ1 fraksiyonuyla yağ veriminin çok fazla olmadığı görülmüş ve böylece ÜÇ2 fraksiyonuyla deneylere devam edilmiştir. Hem selülaz hem de proteaz için 0,5 mL/g ve 1mL/g çekirdek ile yapılan deneylerde homojenizatör kullanılması durumunda V_s değerlerinde bir azalma görülmüş, fakat V_k değerlerindeki yükselme bize ekstraksiyon ortamına daha fazla yağın geçtiğini göstermiştir. Ayrıca enzim miktarında bir misli artışa rağmen yağ verimlerini çok fazla artırmadığı da gözlenmiştir. Enzim maliyetini düşük tutmak amacıyla, daha sonraki deneylerimizde her iki enzim için, 0,5 mL/g çekirdek miktarlarında ve homojenizatör kullanılmasına karar verilmiştir. Son olarak ÜÇ2 tanecik boyutunda pH ve sürenin etkisini gözlemlemek için pH 4, pH 5 ve pH 6'da

6-15-24 saatlik sürelerle proteaz ve selüloz için ekstraksiyon yapılmış ve proteaz için pH 6'da 6 saat ile ve selüloz enzimi için pH 5'de 15 saat ile %26,1 ve %26,2 ile en yüksek verim değerlerine ulaşılmıştır.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, farklı selüloz ve proteaz enzimleri yanında enzimatik ekstraksiyon işleminin veriminin artırılması için bitki dokularının bütünlüğünü korumasını sağlayan pektin maddesini parçalayan pektinaz ve bitki biyokütlesini parçalayan hemiselüloz gibi enzimlerin etkisi ayrı ayrı ve de kokteyl biçiminde araştırılmalıdır. Ayrıca kloroform-metanol çözücüsü gibi daha farklı (tercihen zararsız) çözücü sistemleriyle çalışılması durumunda da yağ verimleri incelenebilir. Ayrıca kahve çekirdeği öğütücüsüyle öğütme ve de eleme adımlarında meydana gelen hatırısayılır düzeydeki yağ miktarı kaybının da önüne geçmek amacıyla tanecikleri falkon tüpünün içinde öğütecek çok ince çaplı mikrolenderlar düşünülebilir

KAYNAKLAR

- Aslan, M., Körlü, A.,** 2009: Selülaz Enziminin Denim Yıkamada Kullanımı, *Electronic Journal of Textile Thechnologies*, **3**, 11-23.
- Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H. and Buchbauer, G.,** 2008: Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant *Food Chemistry*, **108** , 1122–1132.
- Beckman, E.J.,** 2004: Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing, *Journal and Supercritical Fluids*, **28**, 121-191.
- Bocevaska, M., Karlović, D., Turkulov, J. and Pericin, D.,** 1993: Quality of corn germ oil obtained by aqueous enzymatic extraction, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **70**, 1273-1277.
- Bockisch, M.,** 1998: Fats and Oils Handbook, AOCS Press, Urbana, IL.
- Bravi, M., Spinoglio, F., Verdone, N., Adami, M., Aliboni, A., D'Andrea, A., De Santis, A. and Ferri, D.,** 2007: Improving the extraction of -tocopherol-enriched oil from grape seeds by supercritical CO₂. Optimisation of the extraction conditions, *Journal of Food Engineering*, **78**, 488–493.
- Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees M., Guiet S. and Winkelman, W.,** 2006: Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 6261–6265.
- Çinkılıç, H.,** 2008: Farklı organik ve inorganik ortamlarda hıyar fidesi eldesi, *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, **5**, 151-157.
- Dalmolin, I., Mazutti, M.A., Batista, E.A.C. , Meireles, M. A. A. and Oliveira, J.V.,** 2010: Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent, *J. Chem. Thermodynamics*, **42**, 797–801.
- Dunford, N.T and Dunford, H.B.,** 2004: Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing, **5**, AOCS Publishing.
- Environmental Protection Agency,** 2001. *National emissions standards for hazardous air pollutants: solvent extraction for vegetable oil production, final rule.* **66**,19005–19026.
- Erem, F. ve Certel, M.,** 2006. Fırın Ürünlerinde Enzim Uygulamaları, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, TÜRKİYE, 24-26 Mayıs.
- Fiori, L.,** 2007: Grape seed oil supercritical extraction kinetic and solubility data: critical approach and modeling, *Journal of Supercritical Fluids*, **43**,43–54.
- Froning, G.W., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., Pierce, M.M., Niemann, L. and Siekman, D.K.,** 1990: Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using SC-CO₂, pp 10.

- Ghisalberti, C.,** 2001.PCT Int. Appl. **WO 2001018161 A2.**
- Gülbaran, E.,** 1981: Kimya Mühendisliği Ünit Operasyonları Cilt-III Kütle İletimi ve Uygulamaları, *İTÜ Mühendislik Mimarlık Fakültesi Yayınları*, **137**, İstanbul.
- Haktanır, K. ve Arcak, S.,** (1997). Toprak Biyolojisinin Konusu, Önemi ve Gelişimi. Alındığı tarih 24 Mart, 2010, http://www.agri.ankara.edu.tr/sciences/1250_karacaarcak_TBiyoloji_Hafta_hepsi.pdf
- Iso, S., Uno, S., Meguro, Y., Sasaki, T. and Yoshida, S.,** 2000: Pressure dependence of extraction behavior of plutonium(IV) and Uranium(VI) from nitric acid solution to supercritical carbon dioxide containing tributylphosphate, *Nuclear Energy*,. pp 1.
- Kamel, B. S., and Dawson, H.,** 1985: Characteristics and Composition of Melon and Grape Seed Oils and Cakes, *JAOCS*, Vol. **62**, no. 5.
- Kamel, B. S., Dawson, H. and Kakuda, Y.,**1985: Characteristics and composition of melon and grape seed oils and cakes, *Journal of the American Chemical Society*, **62**, 881–883
- Kayahan, M.,** 2004. Yağlı Tohumlardan Ham Yağ Üretim Teknolojisi, *TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Kitaplar Serisi*, No:7, Ankara.
- Kaymak, B. Ü. ve Aksöz, N.,** 2005: Aspergillus Niger 'den Pektinaz Eldesi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **6**, 8.
- Keha, E. ve Küfrevioğlu, İ.,** 2004: Biyokimya, *Aktif Yayınevi*, **3**, 93-115.
- Kurki, A., Bachmann, J. and Hill, H.,** 2008: NCAT Oilseed Processing for Small Scale Producers, *Attra*.
- Latif, S. ve Anwar, F.,** 2009: Effect of Enzymatic Processes on Sunflower Oil Quality. *J Am Oil Chem Soc*, **86**, 393-400.
- Liu, Y., Yin, J.X., Zhao, M.S., Yan, K.M. and Wang, H.M.,** 2001: *Food Oil*, **10** p.36
- Man, Y.B.C., Asbi, A.B., Azudin, M.N. and Wei, L.S.,** 1996: Aqueous Enzymatic Extraction of Coconut Oil, *JAOCS*, Vol. **73**, no. 6.
- Minhajuddin, M., Beg, Z.H. and Iqbal, J.,** 2005: Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol-rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chem. Toxicology*, **43**, 747-753.
- Moreau, R.A., Johnston, D.B., Powell, M.J. and Hicks, K.B.,** 2004: A Comparison of Commercial Enzymes for the Aqueous Enzymatic Extraction of Corn Oil from Corn Germ, *JAOCS*, Vol. **81**, no. 11.
- Moura, J. M., Campbell, K., Mahfuz, A., Jung, S., Glatz, C. E. and Johnson,** 2008: Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybeans and Cream De-emulsification, *J Am Oil Chem Soc.*, **85**,985–995.
- Nyam, K.L., Tan, C.P., Man, Y.B.C., Lai, O.M. and Long, K.,** 2009: Physicochemical properties of Kalahari melon seed oil following extractions using solvent and aqueous enzymatic methods, *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 694–701.

- Özşahin, A. D.,** 2006. Kahramanmaraş İli Kâğıt Fabrikaları Çevresinden İzolasyonu Yapılan *Bacillus* SP. Suşlarından Elde Edilen Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Parlak, B., Güngör, A., Demir, Y ve Demir, N.,** 2008. Anadolu Orkidesi (*Orchis Anatolica*) Çiçeklerinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Peynir Üretimindeki Kullanılabilirliğinin Araştırılması, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum, TÜRKİYE, 21-23 Mayıs.
- Passos, C.P., Yilmaz, S., Silva Carlos, M. and Coimbra, M.A.,** 2009: Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail, *Food Chemistry*, **115**, 48–53.
- Ramadan, M. F., Moersel, J. and Moersel, T.,** 2009: Oil extractability from enzymatically treated goldenberry (*Physalis peruviana* L.) pomace: range of operational variables. *International Journal of Food Science and Technology*, **44**, 435-444.
- Rosenthal, A., Pyle, D.L. and Niranjan, K.,** 1996: Aqueous and enzymatic process for edible oil extraction. *Enzyme Microb Technology*, **19**, 402–420.
- Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjan, K., Gilmour, S. and Trinca, L.,** 2001: Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. *Enzyme and Microbial Technology*, **28**: 499-509.
- Schieber, A., Müller, D., Röhrig, G. and Carle, R.,** 2002: Effects of grape cultivar and processing on the quality of cold-pressed grape seed oils, *Mitteilungen Klosterneuburg*, **52**, 29–33.
- Shi, J., Yu, J., Pohorly, J. E. and Kakuda, Y.,** 2004: Polyphenolics in Grape Seeds - Biochemistry and Functionality, *Journal of Medicinal Food*, **6**, 291- 299.
- Solomon, E., Berg, L. and Martin, D.,** 2002: Biology Active Learner, *Thomson Learning*, Vol. **6**, no. 6.
- Soto, C., Concha, J. and Zuniga, M. E.,** 2008: Antioxidant content of oil and defatted meal obtained from borage seeds by an enzymatic-aided cold pressing process, *Process Biochemistry*, **43**, 696-699.
- Theriault, A., Chao, J., Wang, Q., Gapor, A. and Adeli, K.,** 1999: Tocotrienol: A review of its therapeutic potential., *Clin. Biochem.*, **32**, 309-319.
- Thorsten, M., Andreas, S., Kammerer, D.R. and Reinhold, C.,** 2009: Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants food chemistry, *Food Chemistry*, **112**, 551–559.
- Tobar, P., Moure, C., Chamy, R. and Zuniga, M. E.,** 2005: Winery solid residue revalorization into oil and antioxidant with nutraceutical properties by an enzyme assisted process, *Water Science and Technology*, **51**, 47-52.
- Tüntaş, S. ve Özsoy, S.,** 2010. Üzüm Çekirdeğinden Sulu Enzimatik Yağ Ekstraksiyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği.

- Url-1** <http://www.biosci.ohiou.edu/introbioslab/Bios170/170_2/enzymes.htm>, An Introduction to Enzymes (1996), alındığı tarih 25.10.2010.
- Url-2** <<http://www.campbell.edu/faculty/jung/>>, The Soxhlet Extractor, alındığı tarih 18.10.2010.
- Url-3** <<http://www.fao.org>>, FAOSTAT (2007), alındığı tarih 16.10.2010.
- Url-4** <<http://www.gidacilar.net/sivi-ve-kati-yaglarin-uretim-asamalari-f132.html>>, Yemeklik Yağ Teknolojisi, alındığı tarih 17.10.2010.
- Url-5** <<http://www.gidasanayii.com/modules.php?name=News&file=article&sid=137>>, Gıda Sanayi (2003), alındığı tarih 17.10.2010.
- Url-6** <http://www.indianwineacademy.com/Global_Grape_Production.html>, Global Grape Production (2009), alındığı tarih 19.10.2010.
- Yamagucci, K., Murakami, M., Nakano, H., Konosu, S., Kokura, T., Yamamoto, H., Kosaka, M. and Hata, K.,** 1986: Supercritical carbon dioxide extraction of oils from Antarctic Krill. *J. Agric. Food Chem.*, pp 10.
- Yen, G.C., Chen, H.W. and Duh, P.D.,** 1998: Extraction and identification of antioxidative components from Jue Ming Zi (*Cassia tora L.*). *J. Agric. Food Chem.*, pp 10.
- Yıldız, T.,** 2008. Farklı Rumen Funguslarına Ait Selüloz ve Ksilanaz Enzimlerinin Analizi, *Yüksek Lisans Tezi*, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Yılğör, N.,** 2010: Mürekkep Giderme Sürecinde Enzimlerin Kullanılması, *Journal of the Faculty of Forestry*, Istanbul University, **60**, 50-58..
- Zhang, S., Wang, Z. and Xu, S.,** 2007: Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **84**: 97-105.
- Zhang S.B., Zhang, W., Ying, X.S. and Amer, J.,** 2007: Downstream Processes for Aqueous Enzymatic Extraction of Rapeseed Oil and Protein Hydrolysates Oil, *Chem Soc.*, **84**, 693–700.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Mehmet ARSLAN

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 1986

Adres: Nevşehirli İbrahim Paşa Cad. 48/6 Fatih / İstanbul

Lisans Üniversitesi:

2004 – 2008 İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği