

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MORINA KARACIĞER YAĞINDAN ENZİMATİK
HİDROLİZ İLE DHA’NIN ZENGİNLEŞTİRİLMESİNDE
ENZİM MİKTARI VE SÜRENİN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Müh. Tuba YAŞAR**

Anabilim Dalı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

ARALIK 2003

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MORINA KARACIĞER YAĞINDAN ENZİMATİK
HİDROLİZ İLE DHA'NIN ZENGİNLEŞTİRİLMESİNDE
ENZİM MİKTARI VE SÜRENİN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimya Müh. Tuba YAŞAR
(506011027)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 19 Aralık 2003
Tezin Savunulduğu Tarih : 15 Ocak 2004**

**Tez Danışmanı : Doç.Dr. Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Selma TÜRKAY
Doç.Dr. Nezih HEKİM**

ARALIK 2003

ÖNSÖZ

Omega 3 yağ asitlerinin vücuttaki tüm biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev aldığı ve yaşamın, doğum öncesi evresi de dahil olmak üzere, her evresinde oldukça gerekli olduğunun ortaya çıkması ile beraber bu yağ asitlerine özellikle de Dokosahekzaenoik aside olan ilgi artmıştır.

Bu çalışmada Omega 3 yağ asitlerinin en fazla balık yağlarında bulunması sebebi ile Morina Karacığer yağının *Candida rugosa* lipazı kullanılarak enzimatik hidroliz yolu ile dokosahekzaenoik asit açısından zenginleştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Yüksek lisans tezimin her aşamasında tecrübeleri ve değerli bilgisi ile beni yönlendiren, yakın ilgi ve desteğini benden esirgemeyen Sn.Doç.Dr. Yüksel Avcıbaşı Güvenilir'e, yapmış oldukları tez çalışmalarından büyük ölçüde faydalandığım Sn. Prof. Dr. Güldem Üstün ve çalışma arkadaşlarına ve tüm hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Eczacıbaşı İlaç Sanayinde çalışmaya başladıktan sonra beni tekrar üniversite hayatına dönüp, yüksek lisansımı tamamlamaya teşvik eden ve yön gösteren Kalite Güvence Müdürümüz Sn. Dr. Lütfü Şen'e ve şefimiz Sn. Nesrin Tanrıyakul'a, başlamış olduğum yüksek lisansımı yoğun çalışma tempomuza rağmen devam ettirmeme izin ve destek veren şu an çalışmakta olduğum Geliştirme Bölümü Müdürü Sn.Dr. Yıldız Özalp'e ve şefim Sn.Remzi Boz'a içtenlikle teşekkür ederim.

Çalışmalarım esnasında yanımda olarak benden desteğini esirgemeyen sevgili eşim Tamer Yaşar'a ve aileme, ayrıca bu çalışmada başından sonuna dek birlikte olduğum arkadaşım Özlem Şirin'e sonsuz teşekkür ederim.

Aralık,2003

Tuba YAŞAR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
KISALTMALAR	V
TABLO LİSTESİ	VI
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
SEMBOL LİSTESİ	IX
ÖZET	X
SUMMARY	XI
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 TEORİK ÇALIŞMALAR	3
2.1. Yağların Yapısı Ve Türleri Hakkında Genel Bilgi	3
2.2. Yağ Asitleri	4
2.2.1. Yağ Asitlerinin Tanımlanması	8
3. BALIK VE BALIK YAĞLARI HAKKINDA GENEL BİLGİ	9
3.1. Balık Yağlarının Besin Değerleri Ve Sağlık Açısından Önemi	9
3.2. Balık Yağı Kullanım Alanları	12
3.3. Morina Karaciğer Yağı Hakkında Genel Bilgi	13
3.4. DHA Hakkında Genel Bilgi	15
3.5. Balık Yağlarından DHA İzolasyonu Ve Zenginleştirilmesinde Kullanılan Yöntemler	18
3.5.1. Üre ile fraksiyonlama yöntemi ile DHA zenginleştirilmesi	18
3.5.2. Süperkritik CO ₂ ekstraksiyon yöntemi ile DHA zenginleştirilmesi	19
3.5.3. Kromatografik yöntemlerle DHA zenginleştirilmesi	21
3.5.4. Kristalizasyon ve distilasyon yöntemi ile DHA zenginleştirilmesi	23
3.5.5. Enzimatik hidroliz ve esterleşme yöntemi ile DHA zenginleştirilmesi	23
4 ENZİM VE LİPAZLAR HAKKINDA GENEL BİLGİ	27
4.1. Enzimler Hakkında Genel Bilgi	27
4.2. Lipaz Hakkında Genel Bilgi	30
4.2.1. <i>Candida rugosa</i> lipazı	31
5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	32
5.1. Kullanılan Malzeme, Cihazlar ve Metot	32
5.1.1. Kullanılan malzemeler	32
5.1.2. Kullanılan cihazlar	32
5.1.3. Metot	33
5.1.3.1. Enzimatik hidroliz	33
5.1.3.2. Ekstraksiyon	33
5.1.3.3. Evaporasyon	34
5.1.3.4. Metil ester hazırlama	34
5.1.3.5. Gaz kromatografisi	34
5.2. Kullanılan Enzimin Hidroliz Aktivitesinin Belirlenmesi	35
5.3. Morina Balığının Karaciğer Yağının Enzimatik Hidrolizi	35
5.4. Morina Karaciğer Yağının Enzimatik Hidroliz Reaksiyonunda Hidroliz Değerlerinin Bulunması	38

5.4.1. Asit Değeri Bulunması	38
5.4.2. Sabunlaşma Değeri Bulunması	39
5.4.3. % Hidroliz Değeri Bulunması	39
5.5. Morina Karaciğer Yağının Enzimatik hidroliz ürününün Ekstraksiyonu	39
5.6. Metil Ester Hazırlama	40
5.7. Metil Esterlerin Gaz Kromatografisi Analizi	40
5.8. Hidroliz Ürünlerinin TG, DG, MG ve YA Bileşiminin Saptanması	42
5.9. Hidroliz ürününün Kolon Kromatografisi İle Fraksiyonlanması ve Her Fraksiyonun Yağ Asitleri Bileşiminin Saptanması	42
5.10. Morina Karaciğer Yağının Enzimatik hidroliz ürününün Yağ Asidi Bileşimi	43
5.10.1. Morina Karaciğer Yağının <i>Candida rugosa</i> Lipazı İle Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne Enzim Miktarının ve Hidroliz Süresinin Etkisi	44
5.10.2. Morina Karaciğer Yağının <i>Candida rugosa</i> Lipazı ile Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne pH Etkisi	52
5.10.3. Morina Karaciğer Yağının <i>Candida rugosa</i> Lipazı İle Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne Sıcaklığın Etkisi	57
5.10.4. Morina Karaciğer Yağının <i>Candida rugosa</i> Lipazı İle Hidroliz Reaksiyonuna karıştırma hızının etkisi.	62
5.10.5. Morina Karaciğer Yağının En Uygun Koşullarda <i>Candida rugosa</i> Lipazı İle Hidroliz Reaksiyonu Süresince % Hidroliz miktarının saptanması	64
5.10.6. Morina Karaciğer Yağının <i>Candida rugosa</i> Lipazı İle Hidroliz Reaksiyonundan Elde Edilen hidroliz ürününün TG, DG, MG Bileşiminin Saptanması	65
5.10.7. Morina Karaciğer Yağından Seçilen Uygun Koşullarda Enzimatik Olarak Üretilen hidroliz ürününün Fraksiyonlarına Ayrılması ve Her Fraksiyonun Yağ Asitleri Bileşiminin Saptanması	67
6. SONUÇLAR VE YORUMLAR	72
KAYNAKLAR	76
EKLER	83
ÖZGEÇMİŞ	119

KISALTMALAR

DHA	:	Dokosahekzaenoik asit
EPA	:	Eikosapentaenoik asit
THL	:	Tetrahydrolipstatine
TG	:	Trigliserid
DG	:	Digliserid
MG	:	Monogliserid
ALA	:	Alpha linolenik Asit
LDL	:	Kötü Kolesterol
HDL	:	İyi Kolesterol
EP	:	Avrupa Farmakopesi
GC	:	Gaz kromatografisi
HPLC	:	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography)
TLC	:	İnce tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography)
THF	:	Tetrahidrofuran

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Önemli doymamış yağ asitleri.	6
Tablo 2.2. Çoklu doymamış yağ asitlerinin besin kaynakları	8
Tablo 2.3. Bazı balıkların yağ asidi kompozisyonları	8
Tablo 3.1. Bazı önemli çoklu doymamış yağ asitlerinin formülleri	9
Tablo 3.2. Bazı bitkisel yağların ve morina karaciğer yağının yağ asit bileşimi	14
Tablo 4.1. Lipazın endüstrideki diğer kullanım alanları	31
Tablo 4.2. <i>Candida rugosa</i> lipazının özellikleri	31
Tablo 5.1. Morina karaciğer yağının karakteristik özellikleri	36
Tablo 5.2. Farklı pH değerlerinde tampon çözeltilerin hazırlanması	36
Tablo 5.3. Metil esteri hazırlanacak madde miktarına karşılık gelen BF ₃ -Metanol kompleksi miktarı	40
Tablo 5.4. Orjinal morina karaciğer yağının yağ asit bileşimi	44
Tablo 5.5. Morina karaciğer yağının pH 7, T=35°C, E=400 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	45
Tablo 5.6. Morina karaciğer yağının pH 7, T=35°C, E=1000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	46
Tablo 5.7. Morina karaciğer yağının pH 7, T=35°C, E=2000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	47
Tablo 5.8. Morina karaciğer yağının pH 7, T=35°C, E=5000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	48
Tablo 5.9. Morina karaciğer yağının pH 7, T=35°C, E=10.000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	49
Tablo 5.10. Morina karaciğer yağının pH 7.0, T=35°C, E=400-1000-2000-5000-10.000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde %hidroliz miktarının zamana göre değişimi	51
Tablo 5.11. Morina karaciğer yağının pH 3.0, T=35°C, E=1000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	53
Tablo 5.12. Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=35°C, E=1000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	54

Tablo 5.13.	Morina karaciğer yağının pH 8.0, T=35 ⁰ C, E=1000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	55
Tablo 5.14.	Morina karaciğer yağının pH 9.0, T=35 ⁰ C, E=1000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	56
Tablo 5.15.	Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=30 ⁰ C, E=1000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	58
Tablo 5.16.	Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=45 ⁰ C, E=1000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	59
Tablo 5.17.	Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=50 ⁰ C, E=1000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişim	60
Tablo 5.18.	Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=65 ⁰ C, E=1000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişim	61
Tablo 5.19.	Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=35 ⁰ C, E=1000 U/g _{yağ} , yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 200 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi	63
Tablo 5.20.	Morina karaciğer yağının <i>Candida rugosa</i> lipazı ile enzimatik hidrolizinde hidroliz miktarının zamana göre değişimi	64
Tablo 5.21.	Morina karaciğer yağının Seçilen Uygun koşullardaki enzimatik hidroliz ürününün TG, DG, MG ve YA bileşimi	66
Tablo 5.22.	Morina karaciğer yağı Enzimatik hidroliz ürününün 1. saatteki TG, DG, MG ve YA bileşenlerinin yağ asitleri bileşimi.	68
Tablo 5.23.	Morina karaciğer yağı Enzimatik hidroliz ürününün 12. saatteki TG, DG, MG ve YA bileşenlerinin yağ asitleri bileşimi.	69
Tablo 5.24.	Morina karaciğer yağı Enzimatik hidroliz ürününün 24. saatteki TG, DG, MG ve YA bileşenlerinin yağ asitleri bileşimi.	70

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1.	Yağların genel yapısı
Şekil 2.2.	Doymuş ve doymamış yağ asitleri
Şekil 2.3.	Doymamış yağ asitlerinin yapıları
Şekil 2.4.	Yiyeceklerde bulunan doymuş, teklidoymamış ve çokludoymamış yağ asidi örnekleri
Şekil 2.5.	n-6 ve omega 3 çoklu doymamış yağ asitleri
Şekil 3.1.	Alfa linolenik asit ve linoleik asitin enzimler yardımı ile omega 3 ve omega 6 yağ asitlerine dönüşümleri.
Şekil 3.2.	EPA ve DHA'ın TG, DG ve MG'lerden distilasyon ve kromatografi ile ayrılması
Şekil 4.1	Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi
Şekil 4.2.	Enzimatik reaksiyon hızının pH'a bağlı olarak değişiminin genel gösterimi
Şekil 5.1.	Morina karaciğer yağının enzimatik hidroliz ile 'DHA' bakımından zenginleştirilmesi yönteminin akım şeması
Şekil 5.2.	Gaz kromatografisi fırın programı
Şekil 5.3.	Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün DHA içeriğine enzim miktarının etkisi (pH 7, T=35°C, yağ : tampon çözelti, 12g:18ml, 600devir/dakika)
Şekil 5.4.	Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün DHA içeriğine pH'ın etkisi (T=35°C, E=1000U/gyağ, yağ:tampon çözelti, 12gr:18ml)
Şekil 5.5.	Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün DHA içeriğine sıcaklığın etkisi (pH 5.0 E=1000U/gyağ, yağ:tampon çözelti, 12gr:18ml)
Şekil 5.6.	Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün DHA içeriğine karıştırma hızının etkisi
Şekil 5.7.	Morina karaciğer yağının <i>Candida rugosa</i> lipazı ile enzimatik hidrolizinde % hidroliz miktarının zamana göre değişim
Şekil 5.8.	Morina karaciğer yağının Seçilen Uygun koşullardaki Enzimatik hidroliz ürününün TG, DG, MG ve YA bileşiminin zamanla değişimi
Şekil 5.9.	Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde TG, DG, MG ve YA fraksiyonları içinde DHA zenginleşmesinin zamana göre değişimi

SEMBOL LİSTESİ

V, V_{max}	:	Hız ve maksimum hız
S	:	Substrat
E	:	Enzim
P	:	Ürün
V₁	:	Numune için sarfedilen NaOH miktarı (ml)
V₂	:	Şahit için sarfedilen NaOH miktarı (ml)
N	:	Normalite

ÖZET

Balık yağı polidoymamış yağ asitlerinden Dokosahekzaenoik asit (DHA) insan vücudu için pek çok faydasının olması sayesinde gıda ve ilaç endüstrisinde önemi giderek artan bir maddedir.

omega 3 polidoymamış yağ asitleri (örn; DHA) vücudumuzda sentezlenemediği için dışarıdan beslenme yolu ile alınması gerekir. Yağ asitleri vücudumuzdaki tüm hücre zarlarının yapısında bulunur, ancak çok önemli yağ asitleri; DHA ve EPA(eikosapentaenoik asit), beyin ve kalp hücreleri ile bağışıklık sistemi hücre zarlarında depolanır. Bu iki yağ asidinin elde edilebileceği en iyi kaynak balık yağlarıdır.

DHA, tıpta kalp, kan hücresi, böbrek ve romatizmal hastalıklar ile kanser ve bazı nörolojik rahatsızlıklar gibi pek çok hastalığın tedavisinde rol alırken bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde ve gelişme çağındaki çocukların zihinsel gelişimini artırmada da önemli ölçüde kullanıma sahiptir. DHA'nın ilaç endüstrisinde yerini alması ile bu maddenin balık yağından daha yüksek konsantrasyonlarda elde edilmesi ihtiyacı doğmuştur. Bu sebeple DHA'nın balık yağından elde edilmesinde kullanılabilecek en etkili yöntemin bulunması amacı ile pek çok çalışma yapılmış ve araştırmalar halen devam etmektedir.

Literatürde balık yağlarından omega 3 çoklu doymamış yağ asitlerinin eldesi için üre ile fraksiyonlama, kromatografik yöntemler, kristalizasyon ve distilasyon, süper kritik CO₂ ekstraksiyonu, enzimatik hidroliz ve esterleştirme gibi pek çok yöntem önerilmekte ve bunlarla ilgili yapılan çalışmalar yer almaktadır.

Bu çalışmanın amacı, balık yağından enzimatik hidroliz ile DHA konsantrasyonu yüksek ürün elde edilmesinde enzim miktarı, reaksiyon süresi, pH, sıcaklık, tampon çözelti ve karıştırma hızının etkisini inceleyerek en uygun yöntemi belirlemek ve bu maddenin gıda ve ilaç endüstrisinde kullanımına katkıda bulunmaktır.

Bu çalışmada Morina Balığı Karaciğer Yağı *Candida rugosa* Lipazı ile farklı enzim miktarı, pH, sıcaklık, tampon çözelti ve karıştırma hızı uygulanarak hidroliz edilmiştir. Hidroliz ürünü Hegzan ve 0.5 N Etanolik KOH kullanılarak ekstrakte edilmiş ve serbest yağ asitlerinden oluşan alt faz atılmış trigliserid, digliserid ve mono gliseridlerden oluşan üst faz alınarak 50 ml saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Hegzanı döner vakum evaporatörde uçurulan üst faz esterleştirilmiş ve sonuçta elde edilen ürünün yağ asidi bileşimleri gaz kromatografisinde incelenerek Dokosahekzaenoik asit bakımından zengin ürün eldesi için gerekli olan seçilen Uygun koşullar belirlenmeye çalışılmıştır.

Morina Karaciğer yağı'nın *Candida rugosa* Lipazı ile pH 5.0, T=35⁰C, E=1000U/g_{yağ}, yağ:tampon çözelti, 12g:18ml koşullarında 24 saat süre ile yürütülen hidroliz reaksiyonu sonucunda hidroliz miktarının %83.12 olduğu ve DHA miktarının orijinal yağa göre 1,45 kat arttırıldığı görülmüştür.

Sonuçları literatürdeki örnekleri ile karşılaştırdığımızda *Candida rugosa* Lipazının Morina Karaciğer yağı üzerinde etkili olduğu ve bu yöntemin balık yağlarından DHA bakımından zengin gliserid karışımı eldesinde verimli olduğu söylenebilir.

EFFECT OF REACTION TIME AND AMOUNT OF ENZYM ON THE ENRICHMENT OF DOCOSAHEXAENOIC ACID BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF COD LIVER OIL

SUMMARY

Docosahexaenoic acid (22:6, DHA) is omega 3 polyunsaturated fatty acid and it is mostly found in fishes. Because of its beneficial effects on human body, usage of DHA in food and pharmaceutical industry increases day by day.

omega 3 polyunsaturated fatty acids can not be synthesized in the human body, so it must be obtained in the diet. Fatty acids are contained in the membranes of every cells in human body but, essential fatty acids; DHA and EPA (Eicosapentaenoic acid) are particularly concentrated in the membranes of brain cells. The best source of these two fatty acids is fish oil.

A number of diseases in humans such as; cardiovascular diseases, blood cell pathologies, neurological diseases, cancer, some kidney diseases, can be treated by DHA and it is also used for improving immune system, mental and visual development of growing children. After taking part in pharmaceutical industry, necessity of obtaining highly concentrated DHA from fish oil increased. For this reason several studies have been performed to find most efficient method for obtaining DHA enriched products from naturel fish oil.

In the literature, a number of methods have been proposed and employed including urea fractionation, chromatographic methods, crystallization and distillation, supercritical CO₂ extraction, lipase catalysed and esterification methods.

The aim of this project is to observe the effect of the amount of enzyme, reaction time, pH, temperature and stirring velocity on the enrichment of DHA by enzymatic hydrolysis of fish oil and to be helpful for food and pharmaceutical industry by this study.

In this study enzymatic hydrolysis of Cod Liver Oil with *Candida rugosa* lipase was performed using different amount of enzyme, different pH, temperature, and stirring velocity. The products of these reactions were extracted with hexane and 0.5 N ethanolic KOH solution and lower layer was separated and discarded. Upper layer which consist of triglycerid, diglycerid and monoglycerid mixture was washed with 50 ml distilled water 3 times and the lower aqueous layer was separated and discarded. Acylglycerol were subsequently recovered after hexane removal in rotary vacuum evaporator. After that, fatty acids of cod liver oil were converted in to methyl esters to determine the fatty acid composition of the product using gas chromatography method. By this way the best conditions for the enrichment of DHA from Cod Liver Oil was determined.

At the end of this study it was seen that performing hydrolysis reaction of Cod Liver Oil with 1000U/g_{yağ} *Candida rugosa* lipase at the pH5.0, T=35⁰C, fish oil:buffer solution, 12g:18ml for 24 hours result in 83.12% hydrolysis and 1,45 fold increase in the amount of DHA according to original Cod Liver Oil.

The comparison of the results with the examples given in the literature was in a good agreement. As conclusion, it can be said that *Candida rugosa* lipase is effective on the Cod Liver Oil and this method is efficient to obtain the DHA rich glyceride mixture from the fish oil.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Dokosaheksaenoik asit (DHA) uzun zincirli omega 3 çokludoymamış yağ asitlerindendir. Yağ asitleri vücudumuzun tüm hücre zarlarının yapısında bulunur ancak DHA ve EPA (eikosapentaenoik asit) gibi önemli yağ asitleri beyin ve kalp hücreleri ile sinir sistemi hücre zarlarında depolanır. DHA'ın insan sağlığı açısından oldukça önemli etkileri bulunmaktadır. Yetişkinlerde beyin fonksiyonlarını düzenler, sinir sistemini ve bağışıklık sistemini geliştirir, kalp hastalıkları ve damar sertliğini önler ayrıca ağırlı romatizmal hastalıkların, bazı böbrek hastalıklarının ve kanserin tedavisinde de kullanılmaktadır. Yeni doğan bebeklerde ise ilk 6 ay içinde görme yeteneklerinin gelişmesini ve zeka seviyesinin yükselmesini sağlar. Bundan dolayı DHA bazı literatürlerde beyin yağı olarak da adlandırılır. Ancak bu önemli yağ asitleri insan vücudunda sentezlenemediğinden dışarıdan besinler yolu ile alınması gerekmektedir. DHA bakımından en zengin besin maddesi balık yağlarıdır.

DHA'nın insan sağlığı açısından son derece önemli olması ve insan vücudunda üretilmemesi gıda endüstrisi, tıp ve buna bağlı olarak ilaç sanayinde bu maddeye olan ilgiyi oldukça artırmıştır. Son 20 yılda balık yağları üzerine yapılan çalışmalar oldukça hız kazanmıştır.

DHA'ce zengin diyet ürünlerinin hazırlanması ve bu maddenin ilaç formülasyonunda kullanılması amacı ile balık yağlarından DHA'ce zengin ürün elde edilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

Çoklu doymamış yağ asitlerinin balık yağlarından üretimi yağın kompleks yapısı sebebi ile yine birtakım kompleks yöntemler ile yapılmaktadır. Literatürde üre ile fraksiyonlama, kromatografik yöntemler (HPLC ile) , süperkritik karbondioksit ile ekstraksiyon, enzimatik hidroliz veya esterleştirme yöntemleri ile yapılan pek çok çalışmaya yer verilmiştir.

Enzimatik hidroliz yöntemi ile yapılan çalışmalarda hidroliz ürününün yağ asidi bileşenlerinin saptanması için ürün, metil esterlerine dönüştürülerek gaz kromatografisinde analiz edilir.

Bu alışmada *Candida rugosa* lipazı kullanılarak Morina Balığının Karaciğerinden elde edilen yağın (Cod Liver Oil) enzimatik hidroliz yöntemi ile DHA bakımından zenginleştirilmesi için gerekli seçilen uygun koşullar araştırılacaktır. Bu alışma ile elde edilecek sonuçlar ile DHA' ın gıda ve ilaç endüstrisinde kullanımına katkıda bulunulacağı inancındayız.

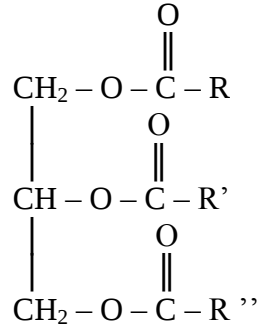
2. TEORİK ÇALIŞMALAR

2.1. Yağların Yapısı Ve Türleri Hakkında Genel Bilgi

Yağlar karbon, hidrojen, oksijen, yağ asitleri ve gliserolden oluşan kimyasal bileşiklerdir. Yağlar hayvansal ürünler, tohumlar, fındık ve sebze gibi pek çok besin maddesinde bulunurlar. Yağda çözünen vitaminler ile diğer besin maddelerinin absorpsiyonu ve taşınmasına yardım ederler, enerji deposudurlar [1,2].

Yağlar 4 ana grupta incelenirler;

1. Doymuş yağlar
2. Tekli doymamış yağlar
3. Çoklu doymamış yağlar
4. Trans yağlar



Şekil 2.1. Yağların genel yapısı [1]

Bu yağlar içerdikleri yağ asitlerinin yapılarına göre ayrılırlar. Yağ asitleri değişik uzunluklardaki karbon zincirlerinden meydana gelir ve değişik miktarlarda hidrojen ve oksijen atomu içerir. Yapısında çift bağ içeren karbon zincirleri tek bağ içerenlerden daha az sayıda hidrojen atomu taşır.

1. Doymuş yağlarda karbon atomu zinciri tekli bağlardan oluşur ve maksimum miktarda hidrojen atomu içerir. Hayvansal yağlar (örneğin tereyağı, domuz yağı) ve Hindistan cevizi yağı doymuş yağ sınıfına aittir. Doymuş yağların erime ısıları yüksek olduğundan oda ısısında katı haldedirler.

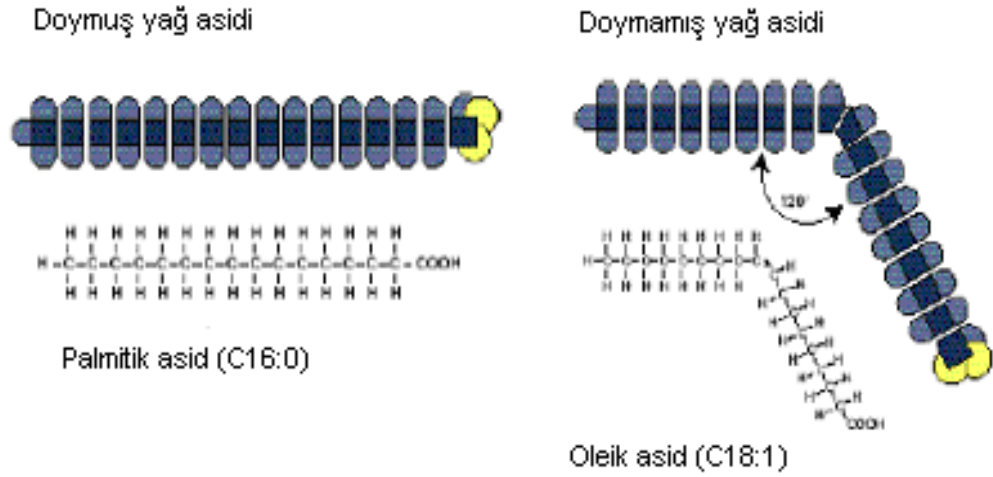
2. Tekli doymamış yağlar yapılarında en az bir adet çift bağ bulundurlar ve oda sıcaklığında sıvı haldedirler ancak buzdolabında donarak katı forma yaklaşırlar. Zeytin yağı, kanola, ceviz, avakado ve badem yağı bu yağlara örnektir.
3. Çoklu doymamış yağlar yapılarında çok sayıda çift bağ bulundurlar. Erime ısıları düşük olduğundan hem oda sıcaklığında hem de buzdolabında sıvı halde bulunurlar. Ayçiçek yağı gibi bitkisel yağlar ve balık yağları çok miktarda çift bağ içerirler.
4. Trans yağlar bitkisel yağların çift bağlarına kimyasal yollarla hidrojen ilavesi ile elde edilirler. Margarinler moleküler yapısı değişen bu yağlara örneklerdir. Oda sıcaklığında katı halde bulunurlar [2-6].

2.2. Yağ Asitleri

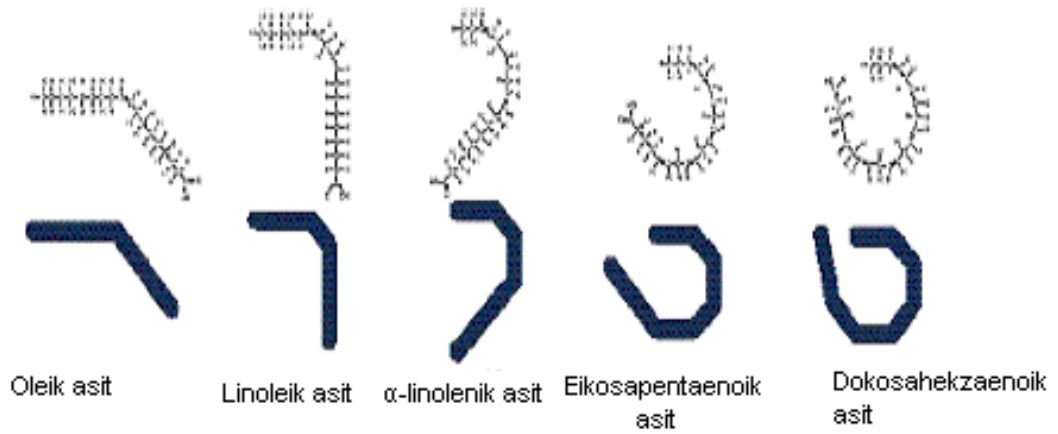
Yağ asitleri bir ucunda asit grubu (COOH) diğer ucunda metil grubu (CH₃) bağlı olan hidrokarbon zincirlerinden oluşurlar ve fosfolipidler, trigliseridler ile kolesterol esterlerin en önemli bileşenleridirler. Yağ asitleri karbon zincirlerinin uzunluğuna göre aşağıdaki şekilde gruplandırılabilirler.

- Kısa zincirli (2-4 karbon atomu)
- Orta zincirli (6-12 karbon atomu)
- Uzun zincirli (14-18 atomlu)
- Çok uzun zincirli (18 karbon atomlu yağ asitlerinden türerler)

Yağ asitleri enerji, metabolik ve yapısal aktivitelerden sorumludurlar. Kısa zincirli gelişme için etkili iken orta zincirli ve doymuş uzun zincirli yağ asitleri enerji kaynağıdır. Doymamış uzun zincirli yağ asitleri, oleik asit ve temel yağ asitleri, temel metabolik faaliyetler için gereklidir. Çok uzun zincirli yağ asitleri (DHA ve EPA) ise biyolojik hücre zarlarının karakteristik yapı taşlarını oluşturur. Yapılan pek çok araştırma yağ asitlerinin fizyolojik özelliklerinin onların sadece doymamışlık oranına değil zincir uzunluğuna da önemli derecede bağlı olduğunu gösteriyor. Çok uzun zincirli yağ asitleri insan gelişiminin kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir.



Şekil 2.2 Doymuş ve doymamış yağ asitleri. [7]



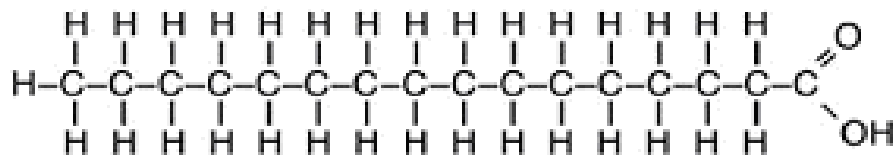
Şekil 2.3 Doymamış yağ asitlerinin yapıları. [7]

Yağ asitleri içerdikleri karbon atomu sayısı, çift bağ sayısı ve ilk çift bağın yerine göre isimlendirilir. Yapılarındaki çift bağın varlığı doymuş, tekli doymamış veya çoklu doymamış olmaları yağ asitlerinin fiziksel ve biyolojik niteliklerini belirler [7].

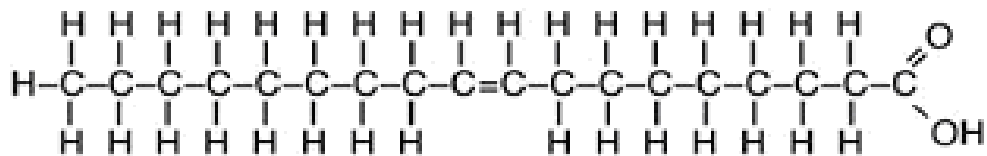
Doymuş yağ asitlerinin tüm karbonları birbirlerine tekli bağlarla bağlanmışlardır. Tekli doymamış yağ asitlerinde karbon zincirlerinde bir adet çift bağ bulunurken çoklu doymamış yağ asitlerinde birden fazla çift bağ mevcuttur.

Tablo 2.1. Önemli doymamış yağ asitler. [7]

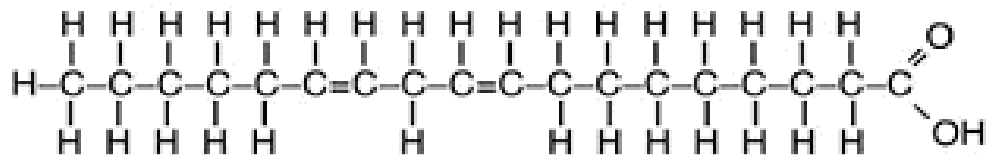
	Zincir Uzunluğu (karbon sayısı)	Çift Bağ Sayısı	Kısaltma	Erime Derecesi (°C)
Bütirik	4	0	C4:0	-8
Oleik	18	1	C18:1W9	13
Linoleik	18	2	C18:2W6	-5
α -linolenik	18	3	C18:3W3	-11
γ -linolenik	18	3	C18:3W6	-11
Araşidonik	20	4	C20:3W6	-50
Eikosapentaenoik	20	5	C20:5W3	-50
Dokosahekzaenoik	22	6	C22:6W3	-50



Doymuş yağ asidi yapısı (Palmitik asit)



Tekli doymamış yağ asidi yapısı (Oleik asit)

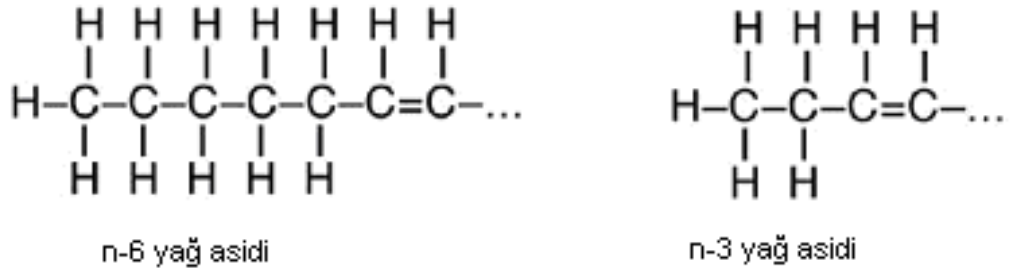


Çoklu doymamış yağ asidi yapısı (Linoleik asit)

Şekil 2.4. Yiyeceklerde bulunan doymuş, teklidoymamış ve çokludoymamış yağ asit örnekleri. [7]

Yağ asitleri yapılarındaki çift bağın bulunduğu duruma göre iki farklı yapıda bulunurlar, bunlara cis ve trans denir. Cis formu yağ asitlerinin doğal formudur. Isıtma veya yapıya hidrojen ilavesi gibi işlemlerle yağ asitleri trans formuna dönüşür. Bu işlemlerle yağın raf ömrü uzatılır veya sıvı formdan katı forma geçmesi sağlanır (örn. margarin). Yapılan pek çok araştırmada sağlıklı bir beslenme için en iyisinin oda sıcaklığında sıvı halde bulunan yağlar olduğu ve özellikle trans yağlardan uzak durulması gerektiği vurgulanmaktadır [8].

Besinlerimizde vücudumuzda sentezlenebilen doymuş ve doymamış yağların bulunması şart değildir. Ancak linoleik asit ve alpha-linolenik asitler vücudumuzda sentezlenmediğinden ‘temel yağ asitleri’ olarak adlandırılırlar ve hayati önem taşıyan bu asitlerin vücudumuza dışarıdan besinler yolu ile alınmaları gerekir. Temel yağ asitleri iki grup altında incelenir, omega 6 ve omega 3. Omega 3 grubunda ilk çift bağ üçüncü karbon atomunda iken omega 6 grubunda altıncı karbon atomundadır (şekil 2.5).



Şekil 2.5 n-6 ve n-3 çoklu doymamış yağ asitleri. [8]

Her iki yağ asidi grubu da iyi bir gelişme ve yaşam için gereklidir, ancak beslenmemizde omega 6 / omega 3 oranının dengede olması önem taşır. Literatürde omega 6 ağırlıklı beslenmenin yol açacağı pek çok rahatsızlığa yer verilmektedir [9,10,11]. Genellikle besinlerde belirli oranlarda olmak üzere 20 çeşitten fazla yağ asidi bulunur. Ancak gruplandırılırken içerdiği en yüksek orandaki yağ asidine göre gruplandırılırlar [2]. Tablo 2.2’de çoklu doymamış yağ asitlerinin besin kaynakları verilmektedir [12,13].

Tüm balıklar EPA ve DHA açısından zengindirler, ancak bazılarında oranları düşüktür. Örneğin; Kılıç balığı, dil balığı. EPA ve DHA bakımından en zengin balıklar ise uskumru, ringa ve somondur. Morina ve mezigit gibi bazı balıklar ise

yağları karaciğerlerinde depolarlar ve bu balıkların karaciğer yağı kullanılır. Tablo 2.3’de bazı balıkların ve bitkilerin yağ asidi içerikleri verilmiştir [7].

Tablo 2.2 Çoklu doymamış yağ asitlerinin besin kaynakları. [7]

Yağ Asidi	Tipi	Kısaltma	Ana Kaynaklar
Alfa-linolenik	n-3	Alpha-LA	Keten,kanola,balık yağı
Eikosapentaenoik	n-3	EPA	Yağlı balık
Dokosahekzaenoik	n-3	DHA	Yağlı balık
Linoleik	n-3	LA	Soya fasülyesi, ayçiçeği ve mısır yağı
Araşidonik	n-3	AA	kırmızı et (çok az miktarda), balık, kümes hayvanları

Tablo 2.3 Bazı balıkların yağ asidi kompozisyonları. [7]

	%Doymuş	%Tekli Doymamış	%Çoklu Doymamış	%EPA (C20:5W3)	%DHA (C22:6W6)
Uskumru	21	43	36	11.0	11.0
Ringa	19	60	21	7.1	4.3
Hamsi	28	29	43	17.0	9.0
Somon	24	40	36	8.0	11.0
Sardalye	24	34	42	15.0	10.0
Morina Karaciğer Yağı	18	51	31	9.0	9.5

2.2.1. Yağ Asitlerinin Tanımlanması

Endüstride yağ asitlerinin yaygın olarak kullanılması, yağ asitlerinin doğal kaynaklardan elde edilmesinde öncelikli olarak tanımlanmasını gerektirmektedir. Yağ asitlerinin tanımlanmasında en çok kullanılan ve en etkili yöntem gaz kromatografisidir. Diğer bir yöntem ise dolgu kolonla yapılan tanımlama işlemidir. Bu yöntemle yağ asitlerinin tanımlanmasının verimi düşüktür ve de bu işlem yaklaşık dört saat sürmektedir. Fakat gaz kromatografisi kullanılarak yapılan tanımlama işlemlerinde C₈ – C₂₄ arası yağ asitleri tanımlanabilir ve bu işlem yaklaşık 60 dakika sürer. Bu durum yağ asidi tanımlanmasında kullanılacak yöntemin gaz kromatografisi olmasını gerektirir [14 -17].

3. BALIK ve BALIK YAĞLARI HAKKINDA GENEL BİLGİ

3.1 Balık yağlarının besin değeri ve sağlık açısından önemi

Balıklar protein ve çoklu doymamış yağlar açısından zengin, doymuş yağlar açısından fakirlerdir. Balık yağları trigliserid yapısında olduğu halde trigliserid yapısında olan bitkisel yağlardan çok farklıdır [2]. Bitkisel yağlarda bulunan yağ asitlerinin sayısı 10'u geçmez ve esas olarak 1 ile 3 çift bağ içeren 18 karbonlu yağ asitleri temel yağ asitleridir. Balık yağlarında ise sayısı 30 ile 45 arasında değişen farklı zincir uzunluklarında ve bir ila 6 çift bağ içeren $C_8 - C_{26}$ yağ asitlerinin çeşitli izomerleri yapıyı oluşturmaktadır [18-19]. Balık yağlarının esas yapısını oluşturan yağ asitleri 14:0, 16:0, 16:1 n-9, 18:1 n-9, 20:1 n-9, 22:1 n-9, 20:4 n-6, 20:5 n-3, 22:5 n-3 ve 22:6 n-3 tür. Bu asitlerin dağılımı balık çeşitlerine göre değişir. Bazı önemli çoklu doymamış yağ asitlerinin formülleri Tablo 3.1'de verilmektedir [20].

Tablo 3.1 Bazı önemli çoklu doymamış yağ asitlerinin formülleri.

Araşidonik asit (20:4 n-6) $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_3-COOH$
Eikosapentaenoik asit (20:5 n-3 veya n-3 EPA) $CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_3-COOH$
n-3 Dokosapentaenoik asit (22:5 n-3 veya n-3 DPA) $CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_5-COOH$
n-6 Dokosapentaenoik asit (22:5 n-6 veya n-6 DPA) $CH_3-(CH_2)_4-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_2-COOH$
Dokosaheksaenoik asit (22:6 n-3 veya DHA) $CH_3-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-CH_2-CH=CH-(CH_2)_2-COOH$

Vücudumuzun fonksiyonel işlevleri açısından çok değerli olan Omega 3 yağ asitleri (örn. DHA ve EPA) vücudumuzda üretilmediğinden dışarıdan besinler yolu ile alınması gerekmektedir (örn. Fındık, soya, keten tohumu) vücuda alfa-linolenik asit alınır ve vücudumuzda enzimatik reaksiyon sonucu Omega-3 yağ asitlerinden DHA ve EPA'ya dönüşür.

Yalnızca balık ve balık yağlarında hazır halde DHA ve EPA bulunur. 1979 yılında Dyerberg ve Bang'ın [21] Gröndland Eskimoları üzerine yaptıkları epidemiolojik araştırmalar sonucu bu insanlarda koroner kalp hastalıkları, ani kalp krizleri, yüksek tansiyon, kolesterol gibi hastalıklara rastlanmadığı görülmüş ve bunun üzerine onların temel besin kaynağı olan balık ve balık yağları hakkında araştırmalar yoğunlaşmıştır. Balık yağının bu derece yararlı olmasının içerdiği bol miktardaki Omega 3 yağ asitlerine, özellikle de DHA'ya bağlı olduğu anlaşılmıştır [22-24].

Balık yağları, balık yağları endüstrisinin ve endüstriyel balıkçılığın yan ürünüdür. Balık yağları temel yağ asitlerinden DHA ve EPA açısından zengindirler ancak balık türlerine göre bu oran değişir. Örneğin soğuk su balıklarında temel yağ asitlerinin oranı daha yüksektir [13].

Balık yağları iki şekilde elde edilir[25];

- Yağlı balıkların vücudundan
- Beyaz balıkların karaciğerinden (örn. Morina, kalkan)

Avustralya'da yapılan araştırmaların istatistiksel sonuçları yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan göz hastalıklarının oranının balık yiyen insanlarda oldukça düşük olduğunu göstermektedir. Bu durumun göz retinasının yapısında Omega 3 yağ asitlerinin bol miktarda bulunması ve balık yağlarının bu yağ asitleri açısından oldukça zengin olmasından kaynaklandığı pek çok bilimsel yayında belirtilmiştir [26,27].

Yaklaşık 20 yıldır yapılan istatistiksel araştırmalar sonucunda balık ve balık yağı tüketiminin içerdiği Omega 3 yağ asitleri sayesinde koroner kalp hastalıkları ve kolesterole iyi geldiği ortaya çıkarılmıştır [28-37].

Omega 3 yağ asitleri bakımından zengin besin maddeleri hipertrigliserid hastalarında vücuttaki trigliserid miktarını düşürerek olumlu etki göstermektedir. Ancak yapılan

araştırmalar sonucu bitkisel kaynaklı omega 3 yağ asitlerinin bu konuda etkili olmadığı görölmüştür. [38-40]

Balık yağları lipoprotein düzensizlikleri tedavisinde ve bağışıklık sistemi üzerinde de olumlu etki gösterir [40]. Balık yağlarındaki omega 3 yağ asitlerinin aynı zamanda akyuvarların antienfeksiyon ve immunolojik özelliklerini düzenleyerek astım, artritist, ülseratif, kolit gibi enfeksiyon hastalıkları ile bazı bağışıklık bozukluklarını önleyici ve tedavi edici etki gösterdiği saptanmıştır [41,42].

Yapılan pek çok araştırmada balık yağları ile beslenen insanlarda kalp krizi, tromboz vb. hastalıklar sonucu ani ölümlerin yaşanma olasılığının oldukça düşük olduğu ortaya çıkmıştır [43,44].

Balık yağlarının kan basıncını düşürdüğü bilinmekle birlikte hipertansiyon ve kolesterol hastalarında uzun vadede nasıl bir etki yaptığı konusunda henüz yeterli bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak yüksek kan basıncı ve kolesterolü olan obezite hastalarında kilo verme amaçlı uygulanan diyetle günlük balık alımının hastanın kolesterol seviyesini dengelediği, trigliserid miktarını azalttığı ve kan basıncını düşürdüğü yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır [40,45,46].

Kanser hastalarında da olumlu etkiye sahip olan balık yağlarının özellikle pankreas kanserinde hastaların yaşadığı anormal kilo düşüşünün, hastanın günlük diyetinin balıkla desteklenmesi sonucu büyük oranda önlendiği görölmüştür [47-56].

Balık yağlarının faydaları aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- Kandaki yağ oranını dengeler,
- Kanın akışkanlığını arttırarak, kanın pıhtılaşmasını önler,
- Vücudumuzun enerji seviyesini arttırır,
- Kalp hastalıkları, Alzheimer, anjina, romatizma, diyabet, ülser, depresyon, hiperaktivite, migren, multiple skleroz ve pek çok hastalığa karşı metabolizmayı düzenler ve güçlendirir.
- Hamilelikte erken doğum ve düşük kilolu doğum riskini azaltır, bebeğin anne karnında ve doğum sonrası beyin ve sinir hücrelerinin gelişmesini sağlar. [8,23,48-52]

Margarin ve çoklu doymamış yağlar birbirlerini engelleyici etki yaptıklarından balık yağından maksimum seviyede yararlanabilmek için beslenmemizden margarin çıkarmamız gerekmektedir [57].

Sonuç olarak araştırmacılar ve doktorlar düzenli balık tüketiminin kandaki EPA ve DHA seviyesini arttırıp trigliserid ve kolesterol miktarını azaltacağı ve koroner kalp hastalıklarını da dört kat azaltacağını belirterek haftada en az iki porsiyon balık yenmesini tavsiye etmektedirler (örn. Somon, uskumru, hamsi) [53,58]. Ancak balık yağları temel yağ asitleri bakımından daha konsantre olduğu için pek çok hastalığın tedavisinde balık yerine balık yağı kullanımı önerilmektedir.

3.2 Balık Yağı Kullanım Alanları

Balık yağlarının çeşitli monomerler ile polimerize edilmiş ürünlerin endüstriyel uygulama alanları çok çeşitlidir. Bu ürünlerin yüksek kuruma hızı, aside ve baza dayanıklı filimler oluşturması, boya , vernik, lak ve mürekkep yapımında tercih edilmesine sebep olur. [20]

Balık yağları kısmen hidrojene edilerek sabun yapımında, tamamen hidrojene edilmiş haliyle kauçuk endüstrisinde, makine yağı üretiminde ve metalik sabun elde edilmesinde kullanılır.

Balık yağlarının endüstriyel olarak yaygın diğer bir kullanım alanı ise deri sanayidir. Süet ve benzeri yumuşak deri tiplerinin tabaklanması esnasında deriye yumuşaklık sağlayıcı madde olarak sulfone edilmiş balık yağı ilave edilmekte, sert yapıda olan kollajenin doymamış yağ asitleri ile reaksiyonu, derinin yumuşamasını sağlamaktadır [59, 60].

Balık yağları gıda endüstrisinde kullanımının yanı sıra sağlık açısından pek çok faydasının görülmesi üzerine ilaç endüstrisinde de önemli bir yer edinmeye başlamıştır. Balık yağlarının yüksek rafine teknolojisi ile damıtılması sonucunda uzun zincirli Omega 3 yağ asitlerince zengin kısmı ayrılır, sindirim sorunu yaşıtan uzun zincirli monoenezler ve polimerize olmuş yağlarla kirlilikler uzaklaştırılır. Böylece EPA ve DHA dengesi en uygun olan balık yağı elde edilerek ilaç haline getirilir. 1 gr balık yağı kapsülü en az 600mg uzun zincirli Omega 3 yağ asitleri içerir [61].

3.3 Morina Karaciğer Yağı Hakkında Genel Bilgi

Morina karaciğer yağı bundan birkaç yüzyıl önce Skotland, Avustralya, Norveç ve Grolland gibi balıkçılığın önde olduğu ülkelerde bulundu. Onlar bu yağı çok soğuk geçen kışların getirdiği kas ve eklem hastalıklarının tedavisinde kullanıyorlardı. 1950’li yıllarda birçok araştırmacı bu yağın ve diğer yağlı balıkların içerdiği temel yağ asitlerinden EPA ve DHA’i keşfettiler ve araştırmayı bu alana kaydirdılar. Bu araştırmalar sonucu morina karaciğer yağının tüketiminin yalnızca romatizmal hastalıkların tedavisinde değil kalp, sinir sistemi ve beyin gibi önemli organların işlevlerini en iyi şekilde yerine getirmesinde de önemli rolü olduğu görülmüştür [11,25].

Morina balığı kış aylarında veya bahar mevsiminin başında yakalandığı zaman karaciğer yağı çıkarılır. Çünkü en yağlı olduğu zaman bu aylardır. Karaciğer yağı herhangi bir kimyasal madde kullanılmadan balığın karaciğerinin karaciğer yağında kaynatılması ile elde edilir. Tazeliğini koruması için doldurulduğu şişelerin içindeki hava alınarak nitrojen gazı doldurulur. Eski zamanlarda karaciğer bir fiçi içinde bekletilir ve yaz sıcaklığında fermente olan karaciğer yağı sıkılarak çıkarılır ve daha sonra sıkılan bu karaciğer derin bir kazan içinde kaynatılarak değerli olan karaciğer yağının büyük oranda ekstrakte edilmesi sağlanırdı. Bu işleme yıl boyunca devam edilirdi. [54,55]

Morina karaciğer yağının Norveçliler tarafından kullanılan en eski adı ‘lysi’ yani ışıktır. Morina karaciğer yağı çok eski zamanlarda tüm Avrupa’da lambalarda kullanılırdı, ayrıca cildin parlaklığını sağlar ve boya ve sabun endüstrisinde kullanılırdı. Morina karaciğer yağı 1854’ten bu güne ilaç olarak kullanılmakta ve bu amaçla kullanılacak yağın hazırlığı da yağın kalitesini daha da arttıracak metotlarla yapılmaktadır. Karaciğer önce içi su dolu kaplarda kaynatılarak yüksek kaliteye ulaştırılır. Daha sonra morina, konik meşe fiçilerde buharla pişirilir. Çok değerli olan bu yağın geri kalan kısmını da elde edebilmek için karaciğer preslenir [55].

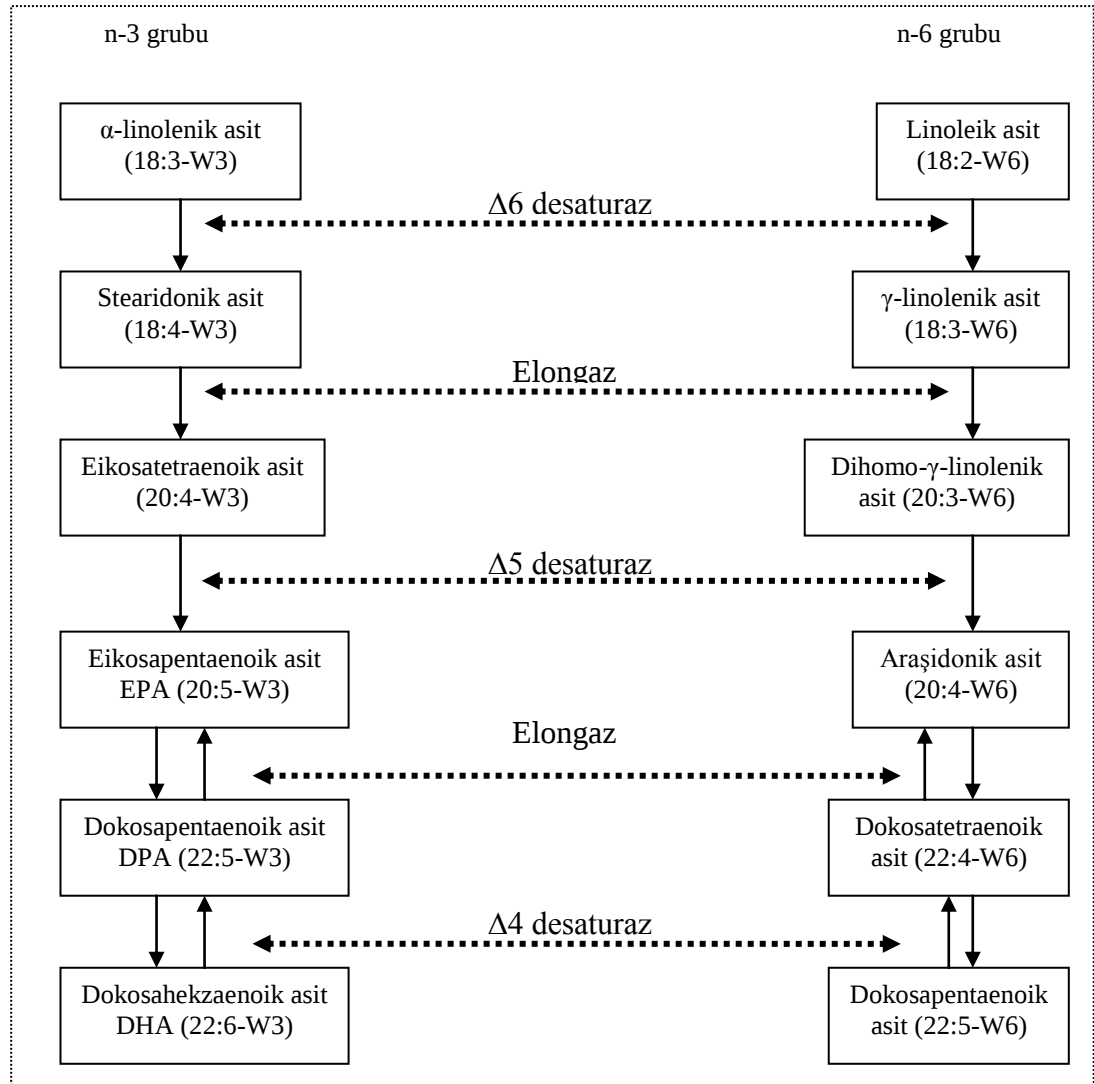
Morina karaciğer yağı içerdiği Omega 3 yağ asitlerinin yanı sıra doğal bir A ve D vitamini kaynağıdır. Bu yağ açık renkli olup, en büyük dezavantajı tadının kötü olmasıdır [51]. Morina karaciğer yağının yağ asidi bileşimi Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2 Bazı bitkisel yağların ve morina karaciğer yağın yağ asit bileşimi (%).[2]

Yağ Asidi	Kanola	Keten	Uskumru	Morina Karaciğer
14.0	0.0	0.0	5.8	8.0
14.1	0.0	0.0	0.3	0.3
15.0	0.0	0.0	0.1	0.5
16.0	3.8	6.1	15.3	16.8
16.1	0.0	0.0	7.6	7.2
17.0	0.0	0.0	0.3	0.3
17.1	0.0	0.0	2.2	1.5
16.4	0.0	0.0	0.1	0.2
18.2	2.1	3.1	4.0	2.6
18.1	62.6	17.3	17.3	22.0
18.2 (W6)	19.5	19.1	1.3	4.9
18.3 (W6)	0.0	0.0	0.6	0.3
18.3 (W3)	10.9	53.0	0.3	2.1
18.4 (W3)	0.0	0.0	0.7	2.4
20.0	0.2	1.5	0.2	0.1
20.1 (W9)	0.0	0.2	3.3	4.2
20.2 (W6)	0.0	0.0	0.2	0.1
20.3 (W6)	0.0	0.0	0.2	0.1
20.4 (W6)	0.0	0.0	1.9	1.1
20.4 (W3)	0.0	0.0	0.8	0.7
20.5 (W3)	0.0	0.0	11.7	10.4
22.0	0.2	0.0	0.0	0.0
22.1 (W11)	0.0	0.0	3.6	3.2
22.1 (W9)	0.0	0.0	0.7	0.9
22.4 (W6)	0.0	0.0	0.2	0.0
22.5 (W6)	0.0	0.0	0.3	0.0
22.5 (W3)	0.0	0.0	3.2	1.1
22.6 (W3)	0.0	0.0	13.3	6.0
Toplam Doymuş	6.3	10.7	26.2	28.3
Tekli Doymamış	62.6	17.5	34.1	39.4
Toplam W6	19.5	19.2	3.7	6.6
Toplam W3	10.9	52.9	29.9	22.6
W3+W6	30.4	72.1	33.6	29.2
Oran (W3+W6)	1.8	0.3	0.1	0.2

3.4 DHA Hakkında Genel Bilgi

DHA Omega 3 yağ asitlerindendir. Bu isimin verilmesinin sebebi çift bağın molekülün metil ucundan üç karbon atomu sonra olmasıdır. Omega 3 ve Omega 6 yağ asitleri temel yağ asitleridir ve vücudumuzda sentezlenemediklerinden dolayı dışarıdan besinler yolu ile alınmalıdırlar. Yağ asitleri tüm hücrelerin yapısını oluşturur fakat temel yağ asitleri özellikle beyin hücreleri ve sinir sistemi hücrelerinin ana bileşeridirler ve yoğun olarak burada depolanırlar [62,63,64]. Besinler yolu ile vücudumuza aldığımız alfa linolenik asit ve linoleik asit enzimler yardımı ile Omega 3 ve Omega 6 yağ asitlerine dönüşürler. Bu dönüşüm Şekil3.3’de verilmiştir[7].



Şekil 3.1. Alfa linolenik asit ve linoleik asitin enzimler yardımı ile omega 3 ve omega 6 yağ asitlerine dönüşümleri. [7]

Fakat yaş ılerledikçe dönüşümü sağlayan enzimlerin (rn. Desaturaz enzimi) azalması ile ALA'nın DHA ve EPA'e dönüşümü de azalır. Vejetaryenlerde de bu dönüşüm yok denecek kadar azdır. Bu durumda beyin ve sinir hücrelerindeki DHA azalmasını önlemek için besinler yolu ile vücuda direk DHA alımı gereklidir. Vücuda direk DHA alınmasını gerektiren durumlardan biri de alkol tüketiminin yüksek olmasıdır, çünkü alkol DHA dönüşümünü sağlayan desaturaz enziminin çalışmasını engeller [62].

Beyin ve retinanın %60'ı yağlardan oluşur, işlevsellik büyük oranda bu yağlara bağlıdır. Retina ve beyin fosfolipidlerinde ana yağ asidi komponenti olarak DHA bulunmaktadır [65-67]. Beyin yağı olarak da adlandırılan DHA'in zeka gelişiminde önemli rolü vardır. Dolayısı ile DHA bakımından zengin olmayan ürünlerle beslendiğimizde özellikle beyin ve göz hücrelerinin işlevselliği bozulmaya başlar. İlerleyen yaşlarda beyin ve göz hücrelerindeki DHA miktarının azalması ile de görme bozuklukları da artar, ancak balık yağı tüketimi ile vücuda DHA alımı devam ettiğinde beyin ve göz hücrelerinde bu bozulmalarda oldukça düşüş olduğu görülür [68].

Sinir hücrelerinin koruyucu tabakası olan myelinin zarar gördüğü peroksisomal hastalarında DHA eksikliği olduğu grlmş ve bu hastalara günde 100-600 mg DHA verilmesi sonucu kandaki DHA seviyesinin artması sağlanarak myelinin zarar görmesi engellenebilmiştir [68].

Kalp krizlerinin %60'ı önceden hiçbir belirti vermeden yaşanır. Kandaki DHA oranının yeterli seviyede olması bu tür kalp hastalıklarını engeller. DHA balık yağlarında bulunmasına rağmen direk DHA alımı balık yağından daha faydalıdır. Çünkü balık yağları DHA'in yanı sıra EPA da içerir. DHA balık yağlarını pek çok yönden faydalı kılarken, EPA bağışıklık sistemini baskılamak, kanın viskozitesini arttırmak ve lipid peroksidasyonuna sebep olmak gibi bazı olumsuz etkilere de sahiptir [11,62].

Omega 3 yağ asitleri düzenli olarak kullanıldığında kandaki LDL (kötü kolesterol) seviyesini düşürürken, HDL (iyi kolesterol) seviyesini arttırmaya yardım eder. Düşük kolesterol seviyesini normal değere çıkartır. Kanı incelterek damar içerisinde pıhtılaşmasını engeller. Kan basıncını düzenler, kalp krizi riskini azaltır. Bağışıklık sistemini güçlendirir, romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılır, cildi

güzelleştirir, yaşlılık etkilerini geciktirir. DHA'nın olumlu etkilerinin olduğu hastalıklar arasında depresyon, multiple skleroz, astım, alerji de bulunur [68,69].

DHA bebeklerde ve hamilerde sağlık açısından oldukça önemlidir. Bebekler üzerinde yapılan araştırmalarda bebeklerin besinler yolu ile aldıkları alfa linolenik asitten enzimatik dönüşümler ile DHA sentezleme oranının çok düşük olduğu görülmüştür (Şekil 3.3). Bebeğin gelişiminde etkili olan araşidonik asit ve DHA'nın bebeğe verilmesinin en iyi yolu anne sütüdür [62,70-73]. Hamilelik döneminin özellikle ilk birkaç haftasında bebeğin anne karnında aldığı DHA miktarı çok önemlidir, çünkü bu dönemde beyin hücre zarı bölünmeleri en aktif durumdadır. Hamileliğin ikinci yarısında ise görme sistemi oluşmaya başlar, son üç ayında ise beyin ve sinir hücrelerinde DHA depolanması başlar [11,74]. Bu sebeple özellikle hamilelik ve emzirme döneminde annenin alacağı DHA miktarı hem çocuğun hem de kendisinin ihtiyacı olan miktarı karşılayacak kadar çok olmalıdır. Bir grup hamile kadın üzerinde yapılan araştırmada bir gruptakilere düzenli olarak mısır yağı içirilirken diğer gruptakilere balık yağı verilmiştir. Doğum sonrası üç ayda da bu diyet devam ettirilmiştir. Daha sonra bu annelerin çocuklarına zeka testi yapılmış ve balık yağı alan grubun çocuklarının açık ara önde olduğu görülmüştür. Yapılan araştırmalara göre yeterli DHA alımı prematüre doğumları da engeller. Eğer anne yeteri kadar DHA alamazsa çocuk, annenin DHA depolarını kullanarak azaltır ve bu durum annede psikolojik ve fizyolojik pek çok rahatsızlığa sebep olabilir [62,74]. Prematüre bebekler anne karnında yeterince beslenemediği ve gelişimini tamamlayamadığı için DHA açısından oldukça fakirdirler. İlerleyen yıllarda bu bebekler üzerinde yapılan zeka testlerinde bunların normal doğumlu bebeklerden ortalama 15 puan düşük aldıkları görülmüştür. Bu durumun engellenmesi için bu bebeklerin DHA açısından zenginleştirilmiş bebek mamaları ile beslenmeleri önerilmektedir [68].

İnsan doğası gereği Omega 6 / Omega 3 oranının yaklaşık 1 olması gerekir ancak günümüzde bu oran beslenme kültürüne göre 10/1 ile 25/1 arasında değişmektedir. Bu Omega 6 ağırlıklı dengesiz beslenme şekilleri pek çok hastalığa sebep olmaktadır [75].

DHA'nın önemli özelliklerinden biri antifriz niteliğe sahip olmasıdır. Bu yüzden genellikle soğuksu balıklarında (örn. Uskumru, somon, tuna, morina) DHA miktarı diğer balıklara göre daha yüksektir [76]. DHA ve EPA balıklar tarafından tüketilen

phytoplanktonlar tarafından sentezlenir. Yağlı balıklar DHA bakımından en zengin balıklardır .

Balık yağlarına göre düşük oranlarda da olsa keten tohumu, kanola, fındık yağı ve bazı mikroalglerde de DHA mevcuttur ve bunlar vejetaryenler için iyi birer DHA kaynağıdır.

Balık yağları oksijen ile kolayca bozulurlar, bu sebeple balık yağının içine bir miktar E vitamini ilave edilir. Doktorlar balık yağı kullanan hastalarına DHA ve EPA'ın vücuttaki oksidasyondan zarar görmemesi için E vitamini almalarını önerirler [77].

3.5 Balık Yağlarından DHA İzolasyonu Ve Zenginleştirilmesinde Kullanılan Yöntemler

Balık yağlarında çok miktarda bulunan Omega 3 yağ asitlerinin sağlık açısından öneminin anlaşılması üzerine DHA ve EPA açısından zengin diyet ürünlerinin hazırlanması ve bu yağ asitlerinin pek çok hastalığa karşı sağladığı olumlu etkiden yararlanmak için ilaç formülasyonunda kullanımı yönünde çalışmalar artmıştır [20].

Balık yağları kompleks yapıları nedeni ile işleme bitkisel yağlara uygulanan geleneksel yöntemlerle (kristalizasyon, distilasyon) yapılamamaktadır. Balık yağlarından yüksek saflıkta çoklu doymamış yağ asitleri elde etmek için tek bir fraksiyonlama metodu yeterli değildir, genellikle birkaç metodun kombinasyonu kullanılır. Hangi metodların kombinasyonlarının kullanılacağı balık yağının yağ asidi kombinasyonuna ve çoklu doymamış yağ asitlerinin istenilen saflık oranına bağlı olarak belirlenir. Balık yağlarından Omega 3 yağ asitlerinin izolasyonu ve zenginleştirilmesi üzerine literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Bunlar üre ile fraksiyonlama, kromatografik yöntemler, kristalizasyon ve distilasyon, süperkritik CO₂ ekstrasyon yöntemi ve enzimatik hidroliz ve esterleşme yöntemidir [78].

3.5.1 Üre ile Fraksiyonlama Yöntemi ile DHA Zenginleştirilmesi

Üre düz zincirli organik bileşiklerle katı bileşikler oluşturur. Yağ asitleri veya onların esterlerinin üre solüsyonuna ilave edilmesi ile yağ asitlerinin veya esterlerinin daha doymun olan kısımları ile kristal bileşikler oluşur. Oluşan bu kristaller ortamdan uzaklaştırılır ve geriye kalan kısım çoklu doymamış yağ asitleri veya esterleri

bakımından oldukça zengindir [78]. Üre fraksiyonlama yönteminin ilkeleri 1940 yılında Bengen tarafından keşfedilmiştir [78,79].

Wille ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmalarda , %30 oranında EPA ve DHA içeren sardalye yağ asitlerinden üre ile doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin uzaklaştırılması ile geriye kalan fraksiyonda EPA ve DHA'nın yüzdesi %90'a yükseltilmiştir. Yine aynı çalışmalarda EPA ve DHA'nın %80 saflıkta birbirinden ayrılabilirdiklerinden de bahsedilmektedir [20,80,81].

Balık yağı yağ asitlerinin etil esterlerinin yine üre fraksiyonlama yöntemi ile Etil EPA/Etil DHA oranı 20:1 olan EPA'ce zengin ürünün elde edilebileceği deneysel olarak saptanmıştır [20].

Swern ve Marklin üre ile fraksiyonlama yöntemini ayırma işlemlerinde ilk kez ve geniş ölçüde kullanmışlardır [78,82]. Üre ile fraksiyonlama basit ve ucuz bir teknoloji ile gerçekleştirilebilir ancak çok miktarda çözücü ve kimyasal kullanımı gerektirir, aynı zamanda çok miktarda yan ürün oluşur. Çoklu doymamış yağ asitleri çözeltiden filtrasyon yöntemi ile uzaklaştırılır. Ancak üre ile fraksiyonlama işlemi filtrattaki ürenin çoklu doymamış yağ asitlerinden ayrılabilmesi için hidrokarbon solvent ekstrasyonu gerektirir ki bu da çoklu doymamış yağ asitlerinin gıda ve ilaç endüstrisinde kullanımında istenmeyen bir işlemdir. Bunun yerine üre ile fraksiyonlama işleminin ardından süperkritik CO₂ yöntemi kullanılması tercih edilir.

3.5.2 Süperkritik CO₂ Ekstraksiyon Yöntemi İle DHA Zenginleştirilmesi

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, süperkritik akışkan kullanılarak yapılan bir ekstraksiyon çeşididir. Kritik sıcaklık noktasının üstünde bulunan akışkanlara süperkritik akışkan denir. Uygulanan basınç ne olursa olsun bu noktada akışkanın iki fazda birden bulunması sağlanamaz.

Karbondioksitin kritik sıcaklığı 31.1°C ve kritik basıncı 1071 psi'dir. Süperkritik durumda karbondioksit hem sıvı hem de gazlara ait özelliklere sahiptir. Gazlar gibi yüksek difüzyon katsayısına ve düşük viskoziteye sahipken sıvılar gibi yüksek çözücü gücüne sahiptir. Bu durum süperkritik akışkanları iyi bir çözücü yapar. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılabilecek pek çok akışkan vardır ancak toksik etkileri, reaktiviteleri, aşındırıcılıkları ve fiyatları göz önünde bulundurulduğunda en uygun olanı karbondioksit olduğu görülür [83,84].

Süperkritik karbondioksit trigliseridler ve pek çok organik madde için çok uygun bir çözücüdür. Süperkritik karbondioksitin çözücü gücü standart organik sıvı çözücülere (örn. Hegzan) oldukça yakındır. Karbondioksit toksik değildir ve alev almaz, bundan dolayı hem insan hem de çevre açısından zararsızdır ve atık maliyeti yoktur. İnert bir yapıya sahip olduğu için ekstraksiyon işlemi esnasında diğer maddelerle ve ekipman ile reaksiyona girmez. Kritik sıcaklık ve basınç değeri düşük olduğundan kolayca elde edilir. Diğer tipik organik çözücülere göre daha yüksek buhar basıncına sahip olması sayesinde ekstraktan kolayca uzaklaştırılır ve geriye zararlı hiçbir kalıntı bırakmaz. Karbondioksit etanol fermentasyonunun yan ürünü olarak gıdaya uygun olarak bol miktarda elde edilir ve ucuzdur [83,84].

Son yıllarda gıda ve farmasütik alanda omega 3 çoklu doymamış yağ asitlerinin konsantre edilmesinde kullanılan metodlara alternatif olarak süperkritik akışkan ekstraksiyonuna ilgi artmıştır.

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda ekstraksiyon işlemi öncesinde numune hazırlığı önemlidir. Küçük parçalar daha çabuk ekstrakte edildiği için numune önceden öğütülerek küçük parçalara ayrılır. Yağların ekstraksiyonunda ortamda suyun varlığı olumsuz etki yaratır [83].

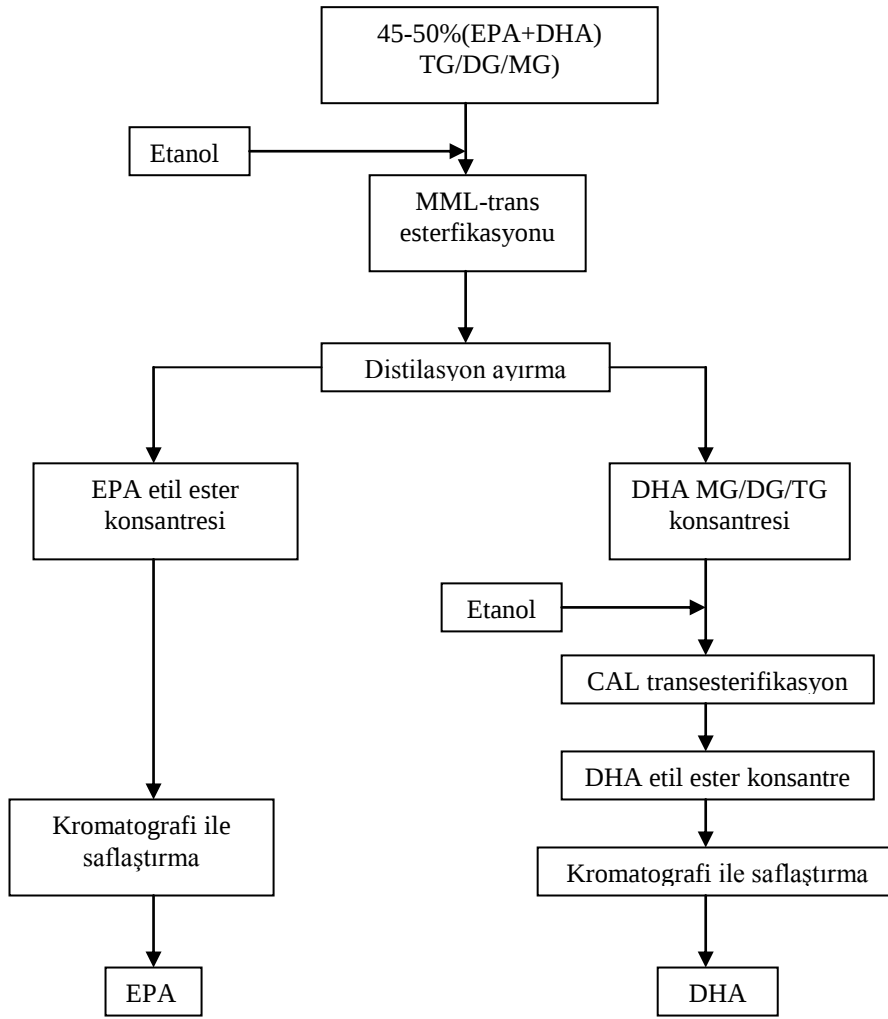
Uygun sıcaklık ve basınç uygulandığında süperkritik CO₂ genellikle hegzan dan daha seçici bir çözücüdür. Polar olmayan veya orta derecede polariteye sahip bileşikler için oldukça iyi bir çözücüdür. Ancak fosfolipidler gibi polar yapıdaki maddelerin ekstraksiyonu için co-solvent ihtiyacı vardır [83]. Genellikle co-solvent olarak Etanol kullanılır. Yapılan araştırmalar balık yağlarının ekstraksiyonunda trigliseridlerin CO₂ deki çözünürlüğünün az olmasının yağ veriminin düşük olmasına neden olduğunu ve trigliserid halinde EPA ve DHA'ce zenginleştirilmenin yapılama yacığını ortaya koymuştur. Eisenbach'in süperkritik CO₂ ekstraksiyonunda, yağ asitlerinin doymamışlık derecesinden bağımsız olarak sadece karbon sayısına göre fraksiyonlanabileceğini bulmasından sonra çalışmalarda başlangıç maddesi olarak üre ile ön zenginleştirilmesi yapılmış yağ asidi esterleri kullanılmaya başlanmıştır [85].

Süperkritik karbondioksit ekstrasyonu ile balık yağı yağ asitleri esterlerinin konsantre çoklu doymamış yağ asitleri fraksiyonunun eldesi yüksek basınç ve pahalı

ekipmanlar gerektirmesinden dolayı pek tercih edilmesede bu yöntemin endüstriye uygulanabilirliğinin artırılması yönünde çalışmalar devam etmektedir [83].

3.5.3 Kromatografik Yöntemlerle DHA Zenginleştirilmesi

Omega 3 yağ asitlerinin zenginleştirilmesi ve balık yağından izole edilmesi için kullanılan yöntemlerden biri de preparatif kromatografi yöntemidir. K.Hidajat ve arkadaşlarının kullandığı bir yöntemde, balık yağı trigliseridleri yağ asitlerine dönüştürüldükten sonra üre ile kristalizasyon yöntemi ile çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmiş ve elde edilen bu ürün mikro Bondopak phenyl silika kolonda, asetonitril:su:tetrahidrofuran (45:35:20 hacimce)'dan oluşan mobilfaz kullanılarak izokratik yöntemle Omega3 yağ asitlerince zengin kısımlarına ayrılmıştır. Ayırma işlemi geri dönüşümsüz yaklaşık 60 dakika da tamamlanmıştır. Elde edilen fraksiyonlar daha sonra analitik likit kromatografide analiz edilmiştir [86]. Çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmiş yüksek saflıkta ürün eldesi için son saflaştırma işlemi olarak genellikle kromatografik yöntem kullanılır (Şekil 3.2). Bu yöntemin ekonomik açıdan maliyetini yükselten en önemli faktör kullanılan hareketli fazdır. Eğer preparatif kromatografide kullanılan hareketli faz yerine süperkritik akışkan kullanılırsa yöntem ekonomik açıdan daha uygun hale gelebilir [78].



Şekil 3.2. EPA ve DHA'nın TG, DG ve MG'lerden distilasyon ve kromatografi ile ayrılması. [78]

Abe ve Tanaka sardalye yağı yağ asitleri etil esterlerinden molekül elek 10x dolgulu kolonu kullanılarak %84.5 oranında Etil eikosapentaenoik asit içeren bir fraksiyon elde etmişlerdir [87].

Kromatografik yöntemlerle her ne kadar yüksek oranda konsantre EPA ve DHA fraksiyonları elde edilebilmekte ise de verim düşüktür ve yöntemlerin endüstriyel boyutta uygulanması zordur. Kromatografik yöntemlerin analitik amaçlı uygulamalar için elverişli olduğu söylenebilir.

3.5.4 Kristalizasyon Ve Distilasyon Yöntemi İle DHA Zenginleştirilmesi

Stout ve arkadaşlarının incelemesine göre balık yağı yağ asitlerinden EPA ve DHA'nın zenginleştirilmesi için düşük sıcaklık kristalizasyonu olumlu sonuç vermektedir [88,89]. Literatürde balık yağının asetonlu çözeltisinin -25°C de soğutulmasıyla çöken kristallerin ayrılması ile ele geçen filtratta EPA'nın konsantre olduğu , yine asetonlu çözeltinin -40°C ye soğutulması halinde ise EPA ve DHA'nın birbirinden ayrılabilirdiği sonuçlarının sunulduğu çalışmalar yer almaktadır [20,89,90].

EPA ve DHA doymuş veya teklidoymamış etil esterlerden distilasyon yöntemi ile ayrılabilirler. Bu konuda yapılan araştırmaların birinde balık yağı ve etanol karışımına enzim ilave edilerek manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında 50 saat karıştırılarak hidroliz edilir. Lipazı bu karışımdan ayırmak için elde edilen bu ürün santrifüj de (5000 rpm, 10 dakika) tutulur. Daha sonra ayrılan kısım 80°C de vakum altında distilasyon ile degase edilir bu esnada uçucu bileşenlerin ayrılarak ester karışımının oluşması sağlanır. Bu karışım 125°C, 0.005 mbar da distilasyona tabi tutularak DHA ve EPA'ca zengin fraksiyon elde edilir [78].

Ancak bu proses koşullarında doymamışlık derecesi yüksek olan omega 3 çoklu doymamış yağ asitlerinin termal polimerizasyonunun önüne geçilemediği de vurgulanmıştır [78].

3.5.5 Enzimatik Hidroliz ve Esterleşme Yöntemi ile DHA Zenginleştirilmesi

Omega-3 yağ asitlerinden Dokosahekzaenoik asidin insan sağlığına pek çok olumlu etkisinin olduğu ortaya çıkarıldıktan sonra balık yağların da bolca bulunan bu maddenin zenginleştirilerek elde edilmesi için pek çok metotlar denenmiştir. Özellikle son 20 yıldır üzerinde en çok durulan metotlardan biri de enzimatik hidroliz yolu ile balık yağlarının DHA açısından zenginleştirilmesidir. Lipazın seçici ve spesifik olması yağların DHA bakımından zenginleştirilmesin de önemli bir etkiye sahiptir [91,92].

Çoklu doymamış yağ asitlerinin konsantre edilmiş formlarının tüketilmesinin direk balık tüketiminden daha faydalı olduğunun anlaşılması üzerine çoklu doymamış yağ asitlerinin zenginleştirilmesinde kullanılabilecek pek çok metot geliştirilmiştir. Distilasyon, kromatografi, üre ile fraksiyonlama, süperkritik CO₂ ve enzimatik hidroliz bunlardan bazılarıdır. Ancak enzimatik hidroliz yönteminin diğer yöntemlere

nazaran daha avantajlı olduğu görölmüştür. Bu yöntem cis-omega 3 çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyon ile kısmi zarar görmesine, cis-trans izomerizasyonuna veya çift bağın yer değişimine sebep olacak kadar uç noktalarda pH ve yüksek sıcaklık kullanımı gerektirmez. Diğer metotlara kıyasla enerji tasarrufu sağlar ve ürün seçiciliğini artırır. Enzimatik hidroliz yöntemi ile acylgliserol formunda omega 3 yağ asitleri elde edilir, bu da beslenme açısından metil veya etil esterlere göre daha çok tercih edilir [93].

Yağların enzimatik hidrolizi ile DHA mono, di ve trigliseridler içinde zenginleştirilir. Hidroliz reaksiyonu boyunca mono, di ve trigliserid yüzdeleri değişir. Hidroliz işlemi sonunda elde edilen ürün ekstrakte edilerek serbest yağ asitleri ortamdan uzaklaştırılır ve monogliserid, digliserid ve trigliserid'lerden oluşan gliserid karışımı elde edilir. Elde edilen bu karışımdan ekstraksiyon çözücüsü evaporasyonla uzaklaştırıldıktan sonra karışım esterleştirilerek gaz kromatografide analiz yapılır. Gaz kromatografisi yağ asitlerinin analizinde kullanılan vazgeçilmez bir tekniktir. Yaklaşık yarım asırdır yağ asitlerinin analizinde en çok tercih edilen metottur. James ve Martin tarafından serbest yağ asitlerinin ilk kez ayrılmasının ardından birkaç yıl içinde gaz kromatografi metodu yağ asitlerinin küçük ölçekli çalışmalar ile pek çok alanda incelenmesinde çok uygun bir metot olarak görölmüş ve yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır [94]. Yapılan pek çok çalışma sonunda hidroliz reaksiyonunda etkili olan faktörlerin sıcaklık, ortam pH'ı, enzim türü ve miktarı, su miktarı ve karıştırma hızı olduğu görölmüştür [95,96].

Tamatsu Hoshino, Tsuneo Yamane ve Shoichi Shimizu 1989 yılında altı değişik lipaz kullanarak yaptıkları deneylerle Morina balığının karaciğer yağını DHA bakımından zenginleştirmeye çalışmışlar ve sıcaklığın hidroliz ile DHA bakımından konsantre ürün elde edilmesine etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak *Candida cylindracea* ve *Aspergillus niger* lipazının orijinal yağa göre hidroliz ürününde 2 kat daha fazla DHA eldesini sağlayarak diğer lipazlardan daha etkili olduğunu görmüşler. Ancak *Aspergillus niger* lipazının sadece DHA'ı değil beraberinde EPA ve DPA (doksapentaenoik asit) artışına da sebep olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca düşük sıcaklıklarda lipaz aktivitesinin de düşük olmasına bağlı olarak DHA zenginleştirilmesinin yeterince iyi olmadığı ancak kötü koku oluşumunun engellendiği görölmüştür [97].

Yuji Shimada ve arkadaşları ton balığıyağını 30°C de, 16 saatte değişik lipazlar kullanarak (*Candida cylindracea*, *Geotricuim candium*, *R. delemor* ve *F. heterosporum*) hidroliz etmişler ve *Candida cylindracea* lipazı ile gerçekleştirilen hidroliz sonunda %48.7 oranında DHA ve EPA içeren ürün elde etmişlerdir. Elde edilen bu ürünün ekstraksiyon sonrası ikinci kez aynı lipaz ile hidrolizi sonucu bu oran %58.7'ye yükseltilebilmiştir [98].

1990 yılında Matthew J.Hills ve arkadaşları çalışmalarında bütanol ile lipaz katalizörlüğünde seçici esterleştirme yöntemini kullanarak morina balığının karaciğer yağı ile denemeler yapmışlardır. Küçük şalgam fidesinden elde edilen lipaz (*Brassica rapus cx Ceres*) ve *Mucor miehei*'den elde edilen lipaz (*Lipozyme*) kullanılarak DHA bakımından zenginleştirme yapıldığında 48 saat sonunda şalgam fidesi lipazı ile yapılan çalışmalarda yağ asitleri içinde DHA miktarının %9.4'ten %16.6'ye yükseldiği görülmüştür. *Lipozyme* ile yapılan çalışmalarda ise 16 saat sonunda bu değerin yaklaşık %54'e yükseldiği belirtilmiştir [99].

Yukihisa Tanaka ve arkadaşlarının 1992 yılında yayınlanan makalelerinde DHA'nin gliserid karışımı (mono, di, trigliserid) içinde konsantre edilmesine yönelik çalışmalarına yer verilmiştir. Bu çalışmalarda Tanaka ve arkadaşları altı çeşit lipaz (*Candida cylindracea*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonos sp.*, *Rhizopus delemar*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizopus javanicus*) kullanarak Ton balığını 37°C'de 500devir/dakika'da 40 saat süre ile hidroliz etmişlerdir. Elde edilen ürünü ekstrakte ettikten sonra ekstraksiyon solventini uçurup BF₃-MeOH ile esterleştirerek gaz Kromatografi cihazında analiz etmişlerdir. Sonuç olarak *Candida cylindracea* lipazı ile gliserid karışımı içindeki DHA miktarı orijinal yağa oranla 3 kat arttırılırken diğer lipazların gliserid karışımı içinde DHA zenginleştirilmesi yapmadığı görülmüştür [100].

Ton balığından DHA'ce zengin ürün elde edilmesi için Yuji Shimada ve arkadaşlarının yaptığı diğer çalışmalarda da ton balığı önce NaOH-etanol çözeltisinde hidroliz edilmiş ve elde edilen yağ asidi karışımı daha sonra *Rhizopus delemar* lipazı kullanılarak 30°C'de 500 devir/dakika hızda karıştırılarak esterleştirilmiş ve gaz kromatografide analiz edilmiştir. Analiz sonrası DHA'nin ağırlıkça %23'den %65'e zenginleştirildiği görülmüştür [101].

Yukihisa Tanaka ve arkadaşları DHA'nın Trigliseridlerin lipaza karşı daha dirençli olmalarını sağlayıcı bir etkisinin olup olmadığını araştırmışlardır. *Candida cylindracea* lipazı kullanarak ton balığını hidroliz etmişler ve %70 hidroliz tamamlandığında gliserid karışımındaki DHA miktarının orijinal yağa göre 2 kat arttığını görmüşlerdir. Ancak DHA bakımından zengin Trigliserid ve Digliserid elde edilirken monogliseridlerin olmadığı görülmüştür. İncelemeler sonucu *Candida cylindracea* lipazının genel bir değişle trigliserid spesifik olduğu ve özellikle içerdiği DHA miktarı arttıkça lipazın trigliseridleri hidrolize etmesinin güçleştiği görülmüştür [92]. Gerek spesifik olmayan *Candida cylindracea* lipazı gerekse 1,3 spesifik enzimlerin kullanıldığı hidroliz reaksiyonlarında çokludoymamış yağ asitlerinin trigliserid ve digliserid fraksiyonlarında konsantre olması tüm bu enzimlerin çokludoymamış yağ asitlerini özellikle DHA'ı hidrolize edememesi veya diğer yağ asitlerine kıyasla çok zor hidrolize edilmesi ile açıklanabilmektedir. *Candida cylindracea*, *Rhizomucor miehei* ve *Amona P (pseudomonas)* lipazlarının özellikle Dokosahekzaenoik aside karşı negatif bir spesifiklik gösterdiği yapılan çalışmalarda kesin olarak belirlenmiştir [92,102-106]. Araştırmacılara göre bu yağ asitlerinde yağ asitlerinin üç boyutlu yapısı ve son çift bağın karboksil grubuna olan yakınlığı reaksiyonda sterik engel oluşturmaktadır.

1997 yılında Yuji Shimada ve arkadaşları enzimatik hidroliz sonucu elde edilen serbest yağ asitlerindeki DHA'nın geri kazanımı için iki basamaklı hidroliz ve seçici esterleştirme yöntemini kullanmışlardır. Ton balığı *Pseudomonas* lipazı ile 40⁰C de 48 saat süre ile hidroliz edildikten sonra gliseridler n-hekzan ile alkali ortamda ekstrakte edilerek ayrılır, suda kalan serbest yağ asitleri ise asidik ortamda n-hekzan ile yeniden ekstrakte edilir. Elde edilen serbest yağ asitleri lauryl alkol kullanılarak *Rhizopus* lipazı ile 30⁰C' de 500 devir/dakika'da 20 saatte esterleştirilmiştir ve serbest yağ asitlerindeki DHA miktarının 24%'ten 72%'ye yükseldiği görülmüştür. DHA miktarını daha da artırmak için elde edilen üründen serbest yağ asitleri ekstrakte edilerek yeniden esterleştirildiğinde bu oranın %91 e kadar ulaştığı görülmüştür. Ayrıca bu çalışmalarda lauryl alkol yerine kısa zincirli (metanol, etanol gibi) alkoller kullanıldığında esterleşme veriminin düştüğü görülmüştür [107].

4. ENZİM ve LİPAZ HAKKINDA GENEL BİLGİ

4.1.Enzimler Hakkında Genel Bilgi

Kimyasal reaksiyonlarda, reaksiyon hızını arttıran ve reaksiyonun daha ılımlı koşullarda meydana gelmesini sağlayan maddelere katalizör denir. Katalizörler tepkimeye giren maddelerin bir veya birkaçına bağlanarak aktivasyon enerjisini düşürürler. Ancak reaksiyona girmezler ve reaksiyon sonucu oluşacak yan ürünü etkilemezler.

Bugüne kadar bilinen tüm enzimler kimyasal bakımdan protein veya protein sınıfı maddelerdir ve doğal olarak yalnız canlılar tarafından sentezlenirler. Hücre içerisinde meydana gelen binlerce tepkimenin hızını ve özgünlüğünü düzenlerler. Çok defa hücre dışında da etkinliklerini korurlar. Canlılarda gerçekleşen solunum, büyüme, kas kasılması, sinirdeki iletim, fotosentez, azot bağlanması, deaminasyon ve sindirim gibi pek çok olayın temelini oluştururlar [108-109].

Enzimin etki ettiği bileşiğe ‘substrat’ denir ve saniye de etki ettiği substrat molekül sayısı enzimin etkinlik değerini gösterir. Enzim aktivitesi genellikle aktivite ünitesi şeklinde ifade edilir, standart şartlar altında dakikada 1 μ mol substratı ürüne çevirmek için gerekli olan enzim miktarına 1 ünite enzim denir [110]. Bazı enzimler çok özgül olup yalnız bir substrata etki ederken bazıları çeşitli substratlara etki edebilirler. Enzim - sustrate ilişkisi, anahtar-kilit ilişkisine benzer. Bu durum enzimlerin sadece bir substrata veya aynı yapıya sahip birkaç substrata özgü olmasının nedenini açıkça ortaya koyar. Enzim-substrate ilişkisini bozarak enzimin aktivitesini engelleyen maddelere ‘inhibitör’ denir. İnhibitörler yapıları doyalayısı ile enzim üzerinde substratla aynı noktaya bağlanmaya uygun olduğu için sustratın enzim ile bağlanmasını engelleyerek tepkimenin hızlanmasını ve ilerlemesini engellerler. Ancak sustratın miktarı yeteri kadar arttırılırsa inhibitörün etkisi yavaş yavaş azalır [108,111,112].

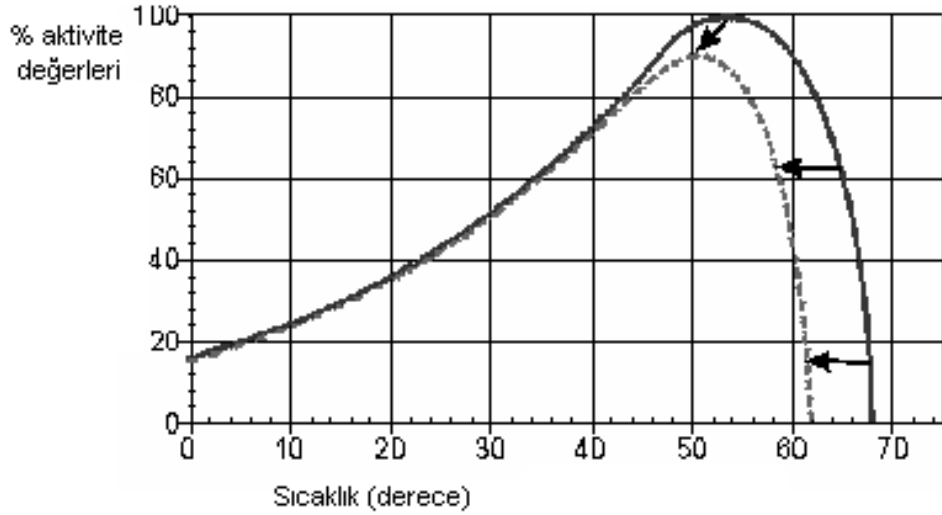
Her enzimin dört rakamlı bir numarası vardır. Örneğin; 3,6,1,3 ‘ATP fosfohidrolaz’ da birinci numara sınıfını, ikinci numara alt sınıfını, üçüncü numara gurubunu, son

numara ise kendine özgü sıra numarasını verir [108]. Bütün enzimler 'az' son ekini alırlar. Birden fazla enzimden oluşan enzim sistemleri 'az sistem' şeklinde isimlendirilirler. Enzimler kendilerince katalizlenen reaksiyona uygun olarak adlandırılır ve sınıflandırılırlar. Birbirinden farklı tipte birden fazla reaksiyon adımı katalizleyen enzim, adlandırılırken katalizlediği ilk reaksiyon adımı esas alınır [113]. Katalizledikleri reaksiyon tipine göre enzimleri altı grupta toplamak mümkündür [108,112,114].

1. Oksidoredüktazlar : Redoks tepkimelerinin katalizler.
2. Transferaz enzimler : Hidrojenin dışında bir atomun veya atom grubunun (metil, karboksil, glikozil, amino ve fosfat grupları) bir molekülden diğerine aktarılmasını sağlar.
3. Hidrolaz enzimler : Bir molekül su sokmak sureti ile yada su molekülü aracılığı ile moleküllerin yıkılmasını sağlayan enzimlerdir.
4. Liyazlar : Su molekülü çıkarmadan molekülleri yıkan enzimlerdir.
5. İzomerazlar : Molekül içinde değişiklik yaparak onun uzayda dizilişini değiştiren enzimlerdir.
6. Ligazlar (=sentetazlar) : Enerji kullanarak substrat moleküllerinin birbirlerine bağlanmasını örneğin amino asitlerin yağ asitlerinin aktifleşmesini sağlar.

Enzimlerin Çalışmasına Etki Eden Faktörler;

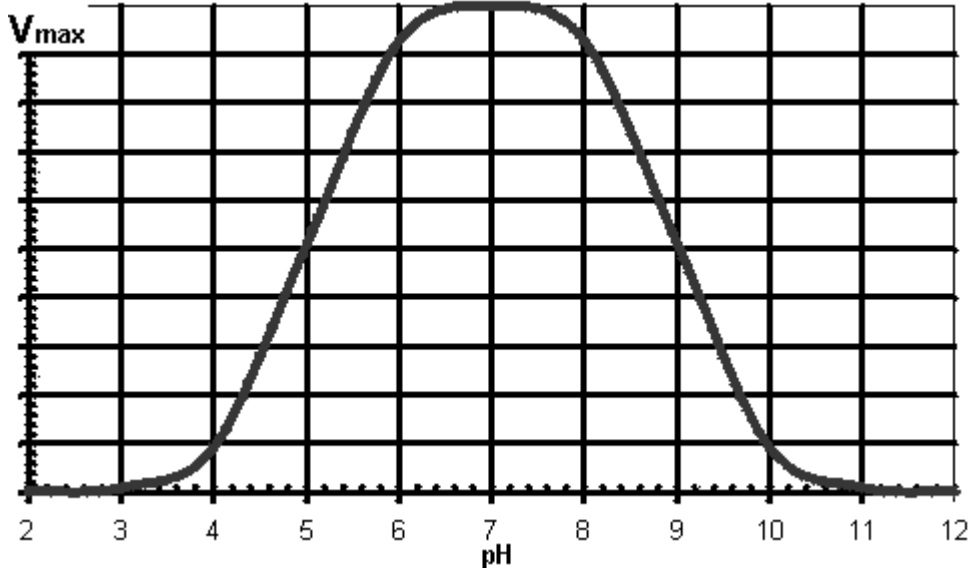
Enzimlerin çalışmasında etkili faktörler arasında sıcaklık, ortam pH'ı , enzim/substrat oranı ve su miktarı vardır. Sıcaklığın enzimatik reaksiyonlardaki etkisi şematik olarak şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Sıcaklığın enzim aktivitesine etkisi [112].

Tepkime hızının yükselmesi sıcaklıkla doğru orantılıdır, fakat belirli noktadan itibaren tepkime hızı önce duraklar sonra düşmeye başlar ve tamamen durur. Enzimlerin en iyi çalışabilecekleri sıcaklığa ‘optimum sıcaklık’ denir. Yüksek sıcaklıklarda (genellikle 55-60°C) enzimler etkisizdirler. Düşük sıcaklıklar enzimin etkinliğini azaltır. 0°C’de enzim ya hiç yada çok az işlev gösterir. Fakat soğğun enzim yapısını bozduğu görülmemiştir. Sıcaklık eski hale geldiğinde etkinlik yine başlar. Depolama sırasında enzimin aktivitesinin azalmasını minimuma indirmek için 0-4°C arasında depolanması gerekir. 0°C altına soğuttuğumuz zaman daha stabil olur ancak buzlanmayı önlemek için uygun bir katkı maddesi kullanılmalıdır [108,113,115].

Enzimler pH değişimine karşı çok duyarlıdır. H^+ iyonu konsantrasyonundaki değişme özellikle aktif merkezinde asidik veya bazik gruplar taşıyan enzimler ve hidrolazlar için çok etkindir ve enzimin aktivite gösterdiği pH skalası oldukça dardır. Genellikle çok fazla asidik ve alkali ortamda etkisizdirler. Bazı durumlarda enzimler en yüksek etkinliği belirli bir pH derecesinde gösterir. Bu pH derecesine ‘optimum pH’ denir. Aktivitenin pH ile ilgili olmasının nedeni yapılarında proteinleri taşımalarındandır. Şekil 4.2’de enzimatik reaksiyon hızının pH’a bağlı olarak değişiminin genel gösterimi verilmiştir.



Şekil 4.2 Enzimatik reaksiyon hızının pH'a bağlı olarak değişiminin genel gösterimi [112].

Enzimlerin katalizör olarak kullanıldığı tepkimelerde, Enzim/Substrat derişimi arasındaki orana bağlı olarak tepkime hızı değişir. Bol substrat bulunan ortama eklenecek enzim, son ürün miktarının artmasını sağlar. Diğer kimyasal maddelerin varlığı ve su miktarı da enzim aktivitelerini etkileyen faktörler arasındadır. Genellikle %15'in altında su içeren ortamlarda, enzimler işlev göstermezler [108].

4.2.Lipaz Hakkında Genel Bilgi

Lipazlar, bitki ve hayvan hücrelerinden oluşan geniş bir enzim grubunu içerirler ve Hidrolaz grubu enzimlerdir [116]. Lipazlar suda çözünmeyen trigliseridleri hidroliz ederek yağ asitlerine ve kısmi gliseridler veya gliserol'e dönüştüren enzimlerdir. Lipazlar yağ-su ara yüzeyinde çalıştıkları için suda çözünen esterlere etkili olan sıradan esterazlardan farklıdır [117].

Lipaz spesifikliği yağ asitleri spesifitesi ve pozisyonel spesifiteyi içerir. Pozisyonel spesifitesine göre lipazlar iki gruba ayrılırlar [118]. Birinci grup lipazlar trigliseridlerin dış ester bağlarını kırarlar ve 1,3 spesifik lipazlar olarak adlandırılırlar. İkinci grup ise tüm ester bağları üzerinde etkilidirler ve spesifik olmayan lipazlar olarak adlandırılırlar [118].

Lipazları hayvansal, bitkisel ve mikrobiyel lipazlar olarak üç grupta toplamak mümkündür. En önemli hayvansal lipaz pankreas lipazıdır. Diğer bir hayvansal lipaz ise süt lipazı olup moleküler ağırlığı en küçük lipaz olarak bilinir [119].

Günümüzde lipazlar organik sentezinde çok yönlü katalizörler olarak kullanılmaktadırlar. Sadece geleneksel su bazlı sistemlerde çözünen substratlar için kullanılmazlar, aynı zamanda susuz sistemlerde de kullanılırlar. Son yıllarda mikrobiyal lipazların yağ kimyası, organik kimya ve deterjan formülasyonunda kullanımı hız kazanmıştır [120-124]. Lipazların hidrolitik spesifitelerinin kullanıldığı diğer bir alanda gıda endüstrisinde trigliseridlerin di ve mono gliseridlere çevrilmesidir. Lipazın endüstrideki diğer kullanım alanları Tablo 4.1’de özetlenmiştir [125].

Tablo 4.1 Lipazın endüstrideki diğer kullanım alanları. [125]

Kullanım Alanı	Son Ürün
Günlük süt endüstrisi	Süt yağlarının hidrolizi
Doğal yağlar	Katı yağlar için sıvı yağların transesterifikasyonu.
Deri üretimi	Yüzeyden yağların uzaklaştırılması
Deterjan endüstrisi	Yağ lekelerinin uzaklaştırılması

Bu endüstriyel alandaki uygulamaların gelişmesi lipaz üzerinde yapılan akademik çalışmalara olan ilgiyi canlandırmıştır.

4.2.1. *Candida Rugosa* Lipazı

Candida rugosa lipazı (EC3.1.1.3) ham toz halinden saflaştırılır. Trigliseridleri zincir uzunluğu sipesifitesi göstermeksizin hidroliz eder. Spesifik aktivitesi yaklaşık 800 U/mg dır. Bu değer 37 °C ve pH 8 de triolein veya tributyrin’nin substrat olarak kullanılması ile yapılan çalışmalar sonucu hesaplanmıştır [126].

Tablo 4.2 *Candida rugosa* lipazının özellikleri. [126]

Kaynak	Orijin	Optimum Sıcaklık (°C)	Pozisyonel pH	Spesifite
<i>Candida Rugosa</i>	Maya	30 – 50	7.0	Yok

5.DENEYSEL ÇALIŞMALAR

5.1.Kullanılan Malzeme, Cihazlar ve Metot

5.1.1. Kullanılan Malzemeler

- Metanol
- Etanol
- n-Heptan
- n-Hegzan
- Saf Su
- BF₃ - Metanol kompleksi
- Fosforik Asit
- Sodyum Klorür
- Susuz Sodyum Sülfat
- Sitrik Asit Monohidrat
- Di Sodyum Hidrojen Fosfat
- Sodyum Hidroksit
- Potasyum Hidroksit
- Siyah Bant Süzgeç Kağıdı
- Kaynama Taşı
- Dokosahekzaenoik asit Standardı
- *Candida rugosa* Lipazı (819 U/mg)
- Morina Balığı Karaciğer Yağı

5.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Hassas Terazî
- pH Metre
- Manyetik Karıştırıcı
- Döner Vakum Evaporatör
- Geri Soğutucu
- Gaz Kromatografi Cihazı

5.1.3. Metot

Balık yağı ekstraktının hazırlanması ve analizinin yapılmasında temel işlemler;

- Enzimatik hidroliz
- Asit değeri ve % hidroliz değeri bulunması
- Ekstraksiyon
- Vakum Evaporasyonu
- Metil Ester Hazırlama
- Gaz Kromatografisi
- hidroliz ürününün HPLC ile TG, DG, MG ve YA % bileşiminin bulunması
- Kolon kromatografisi

5.1.3.1. Enzimatik Hidroliz

Hidroliz yolu ile yağlar gliserol ve yağ asitlerine dönüşürler. Hidroliz reaksiyonunda katalizör olarak lipaz kullanılması enzimatik hidroliz olarak adlandırılır. Yağların DHA ve EPA gibi önemli yağ asitleri bakımından zenginleştirilmesinde enzimatik hidroliz en etkin yöntemlerdendir. Hidroliz reaksiyonu sonrası, kullanılan lipazın türüne göre, elde edilen ürünün mono, di ve tri gliserid yüzdeleri değişebilir. DHA gibi önemli yağ asitleri özellikle trigliseridler ve digliseridler içinde zenginleştirilir. Hidroliz işlemi sonunda elde edilen ürün ekstrakte edilerek alt faz uzaklaştırılır ve mono, di ve trigliserid bakımından zengin karışım elde edilir.

5.1.3.2. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon bir ayırma tekniğidir. Ayırmak istediğimiz maddelerin sulu çözeltilerine, karışmayan bir organik çözücü (hegzan, kloroform vb) ilave edilir. Organik çözücü seçimi Ayırmak istediğimiz maddenin kimyasal özelliğine göre belirlenir. Bu çözücü karışımdan ayırmak istediğimiz maddeleri organik faza alır. Ayırma hunisi içinde iki ayrı faz oluşturmak suretiyle çözeltideki istenen maddeler ve istenmeyen maddeler ayrı ayrı elde edilir [127].

5.1.3.3. Evaporasyon

Evaporasyon, bir çözeltilen uçucu olan çözücünün uzaklaştırılması yada çözücünün uçurulmasıyla çözeltinin daha derişik hale getirilmesidir. Endüstriyel uygulamalarda genellikle su olmakla beraber çözücü olarak organik çözücüler de kullanılır [14].

Bu çalışmada döner vakum evaporatörü kullanılarak Morina karaciğer yağının Enzimatik hidroliz ürününün ekstraksiyonundan sonra elde edilen çözeltiler, çözücüleri uçurularak daha derişik hale getirilmiştir.

5.1.3.4. Metil Ester Hazırlama

Yağ asitlerinin tanımlanması için uygulanan yöntem olan gaz kromatografisinde ilk olarak örneğin metil esterlerinin hazırlanması gerekir. Yağ asitlerinin metil esterlerinin kaynama noktaları saf yağ asitlerinin kaynama noktalarından yaklaşık 30⁰C daha düşüktür. Gaz kromatografisinde yağ asitleri yerine yağ asitlerinin metil esterlerinin kullanılmasının nedeni metil esteri hazırlanan yağ asitlerinin homolog sırasında yada yapılarında hiçbir değişikliğin meydana gelmemesidir. Böylece gaz kromatografisinin uygulamasında çok yüksek sıcaklıklarda çalışmaya gerek duyulmamaktadır [128].

Morina karaciğer yağının yağ asitlerinin metil esterlerin hazırlanmasında BF₃-Metanol kompleksi, n-Heptan, doygun tuz çözeltisi ve susuz sodyum sülfat kullanılmıştır [129].

5.1.3.5. Gaz Kromatografisi

Yağ asitlerinin tanımlanmasında kullanılan yöntemlerden en geçerlisi gaz kromatografisidir. Gaz kromatografisi analizine başlamadan önce fırın sıcaklığı, dedektör sıcaklığı ve enjektör sıcaklığı gibi değerlerin belirlenmesi gerekir. Daha sonra analizi yapılacak olan numunenin metil esteri gaz kromatografisi cihazına enjekte edilerek integratör yardımı ile sonuç alınır. Alınan GC pikleri standartlara göre yorumlanarak numunenin yağ asidi içeriği belirlenir. Bu çalışmada HP6890 marka gaz kromatografi cihazı kullanılmıştır.

5.2. Kullanılan Enzimin Hidroliz Aktivitesinin Belirlenmesi

Hidroliz deneylerinde kullanılmış olan lipaz enziminin hidroliz spesifik aktivitesi, 1gr enzim tarafında 1dakika içerisinde trigliseridlerden açığa çıkarılan yağ asitlerinin μmol cinsinden miktarı olarak tarif edilir.

Aktivite tayininde, trigliserid substratı olarak zeytinyağı (riviera tipi) kullanılmıştır. 1ml zeytinyağı 0.5 ml 0.1M CaCl_2 çözeltisi, 3ml fosfat tampon çözelti (pH 7) ve 5ml distile su karışımı önce çalkalayıcılı su banyosunda 10 dakika, 37°C 'de karıştırılmıştır. Böylece reaktanların sıcaklığı 37°C 'ye getirilmiştir. Daha sonra bu karışıma 1ml lipaz çözeltisi (içerisinde 10-20mg lipaz bulunan) ilave edilmiş ve 20 dakika 37°C 'de magnetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Süre sonunda bu karışıma 20ml etanol:aseton, 1:1 hacmen, ilavesi ile enzim inaktive edilmiştir. Hidroliz reaksiyonu sonucu zeytinyağından açığa çıkan yağ asitlerinin miktarı 0.02N NaOH çözeltisiyle timolftalein indikatörlüğünde titre edilerek bulunmuştur. Paralel koşullarda enzim çözeltisi içermeyen şahit deneme de yapılmıştır. Enzimin spesifik aktivitesi ($\text{U/g}_{\text{enzim}}$)($\mu\text{mol/dak.g}$) formül 5.1'e göre hesaplanmıştır [130].

$$\text{Spesifik aktivite} = (V_1 - V_2) \cdot 1000 \cdot N / (20 \cdot E) \dots\dots\dots(5.1)$$

V_1 :Numune için sarfedilen NaOH miktarı (ml)

V_2 : Şahit için sarfedilen NaOH miktarı (ml)

N: NaOH çözeltisinin normalitesi

E: 1ml enzim çözeltisi içinde bulunan enzim miktarı (g).

5.3. Morina Balığının Karaciğer Yağının Enzimatik Hidrolizi

Bu çalışmalarda kullanılan Morina karaciğer yağı Sanofi Synthelabo firması tarafından SIRH SA'dan (Fransa) temin edilmiştir. Morina karaciğer yağının standart yöntemlere göre belirlenmiş bazı karakteristik özellikleri Tablo 5.1'de verilmiştir.

Morina balığının karaciğer yağının enzimatik hidroliz reaksiyonu için 50ml'lik erlen ve ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanılmıştır. Hidroliz deneylerinde spesifik olmayan *Candida rugosa* lipazı (EC3113) kullanılmıştır. Bu lipaz Sigma chemical company'den alınmıştır ve aktivitesi 819 U/mg'dır.

Tablo 5.1 Morina karaciğer yağının karakteristik özellikleri.

ÖZELLİK	DEĞERLER
Sabunlaşma değeri	161.38
Asit değeri	0.48
İyot indisi	117.68
Kırılma indisi (refraktif indeks)	1.48
Yoğunluk	0.924 g/ml

Enzimatik hidroliz denemeleri sabit pH ortamında gerçekleştirilmiş olup pH ayarlaması sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat tampon çözeltileri ile yapılmıştır. Farklı pH değerlerine sahip tampon çözeltilerin hazırlanış şekli aşağıdaki Tablo 5.2’de verilmiştir [131].

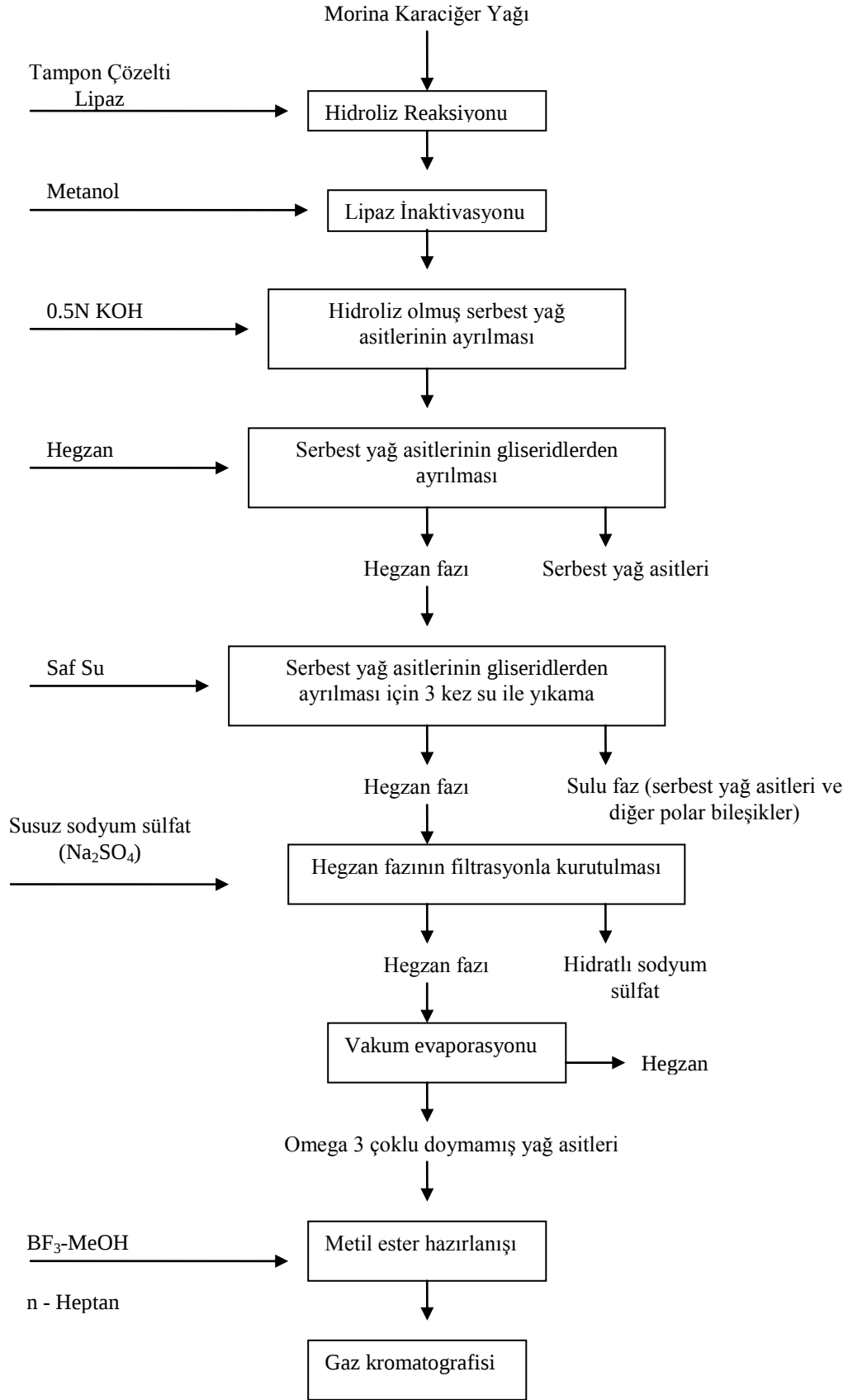
Tablo 5.2 : Farklı pH değerlerinde tampon çözeltilerin hazırlanması. [131]

pH	Sitrik asit çözeltisi (a) (ml)	Di sodyum hidrojen fosfat çözeltisi, Na ₂ HPO ₄ (b) (ml)
3	80.3	19.7
5	50.0	50.0
7	37.4	62.6
8	4.6	95.4
9	-	100

(a) Sitrik asit çözeltisi, litrede 21.014 g sitrik asit monohidrat çözülmesi ile hazırlanır.

(b) Litrede 28.4 g Di sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄) çözülmesi ile hazırlanır.

Hazırlanan bu çözeltilerin pH ayarı NaOH veya H₃PO₄ ile yapılır.



Şekil 5.1 Morina karaciğer yağının enzimatik hidroliz ile ‘DHA’ bakımından zenginleştirilmesi yönteminin akım şeması.

Morina karaciğer yağı ve tampon çözeltisi oranları 1:1.5 olacak şekilde 50 ml'lik erlene konmuş ve üzerine belirli miktarda enzim ilave edilmiştir. Erlen, ısısı önceden ayarlanmış manyetik karıştırıcıya konulup hızı 600devir/dakika'ya ayarlanarak hidroliz reaksiyonu başlatılmıştır [92,93,97,98,100,107]. Reaksiyon boyunca belirli aralıklarla sıcaklık ölçümü yapılarak reaksiyonun istenen sıcaklıkta gerçekleşmesi sağlanmıştır. Morina karaciğer yağının enzimatik hidroliz ile 'DHA' bakımından zenginleştirilmesi yönteminin akım şeması Şekil 5.1'de görülmektedir.

Bu çalışmada morina karaciğer yağının enzimatik hidroliz ile 'DHA' bakımından zenginleştirilmesinde, hidroliz reaksiyonuna enzim miktarı ve hidroliz süresinin etkilerinin yanısıra tampon çözeltinin pH'sının, reaksiyon sıcaklığının, ve karıştırma hızının etkileri de incelenmiştir.

5.4.Morina Karaciğer Yağının Enzimatik Hidroliz Reaksiyonunda Hidroliz Değerlerinin Bulunması

5.4.1.Asit Değeri Bulunması

Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile hidroliz reaksiyonu esnasında zamana göre hidrolizlenme miktarındaki değişimi bulmak için hidroliz ürününün asit değeri hesaplanır

1g balık yağına daha önceden 0.5ml fenolftalein indikatörlüğünde 0.1M KOH ile nötrale edilmiş Etanol:Eter (1:1 hacimce) karışımından 5 ml ilave edilir ve iyice karıştırılır. Daha sonra bu karışım 0.1M KOH ile pembe renk 15 dakika sabit kalana kadar titre edilir. Yapılan 0.1M KOH sarfiyatına göre asit değeri hesabı formül 5.2 ile yapılır;

$$AD = 5.61 \times (V/W) \dots \dots \dots (5.2)$$

V : 0.1M KOH sarfiyatı (ml)

W : Tartılan balık yağı miktarı (g)

AD : Asit değeri

Hidroliz ürününün asit değeri hesaplandıktan sonra orijinal yağın asit değeri ve sabunlaşma değeri hesaplanır [131].

5.4.2 Sabunlaşma Değerinin Bulunması

2g balık yağına 200ml'lik balonjojede 25ml 0.5N etanolik KOH çözeltisi ilave edilir ve geri soğutucu altında 1 saat kaynatılır. Solüsyon sıcakken alkali fazlası 0.5M HCl ile 1ml fenolftalein indikatörlüğünde titre edilir. Aynı işlem balık yağı konulmadan hazırlanan çözeltiye de yapılarak (boş deney) formül 5.3 ile hesaplanır.

$$\text{Sabunlaşma Değeri} = 28.05 \times (V_{\text{num}} - V_{\text{boş}}) / W \dots\dots\dots(5.3)$$

V_{num} : Numune için yapılan sarfiyat (ml)

$V_{\text{boş}}$: Boş deney için yapılan sarfiyat (ml)

W : Numune ağırlığı (g)

5.4.3. % Hidroliz Değerinin Bulunması

Hidroliz yüzdesini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılır [93];

$$\% \text{Hidroliz} = 100 \times \frac{A - B}{C - B} \dots\dots\dots(5.4)$$

A: Hidroliz olan yağın asit değeri

B: Hidroliz olmayan yağın asit değeri

C: Hidroliz olmayan yağın sabunlaşma değeri

5.5.Morina Karaciğer Yağının Enzimatik Hidroliz Ürünününün Ekstraksiyonu

Hidroliz reaksiyonu sırasında belirli aralıklarla erlenden 2 ml numuneleme yapılmış ve enzimi inaktive etmek için üzerine 2ml metanol ilave edilerek ayırma hunisine alınmıştır. Serbest yağ asitlerini nötralize etmek için 25 ml 0.5N etanolik potasyum hidroksit çözeltisi karışıma ilave edilmiştir. Serbest yağ asitlerini acylglyserollerden ayırmak için 50ml hegzan ayırma hunisindeki karışım üzerine ilave edilmiş ve iki faz oluşumu sağlanmıştır. Serbest yağ asitlerini içeren alt faz atılarak hegzan fazı üç kez 50 ml saf su ile yıkanmış ve böylece serbest yağ asitleri ve diğer polar maddelerin ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra susuz sodyum sülfattan geçirilen hegzan fazı döner vakum evaporatöre alınarak burada hegzanın uçması sağlanmıştır [93,98,107].

5.6. Metil Ester Hazırlama

Morina karaciğer yağının Enzimatik hidroliz ürününün yağ asidi bileşenlerinin gaz kromatografi ile tanımlanabilmesi için metil esterleri hazırlanmıştır. Ekstraksiyon sonrası elde edilen hegzan fazının döner vakum evaporatörde hegzanın uçurulmasından sonra geriye kalan kalıntı 2 ml hegzan ile çözülmüş ve buradan 600mg alınarak bir erlene konmuştur. Bunun üzerine 9ml BF₃-Methanol kompleksi ilave edilmiştir. Madde miktarına göre eklenmesi gereken BF₃-Methanol kompleks değerleri Tablo 5.3’ de verilmiştir. Erlene kaynama taşı atıp geri soğutucu altında su banyosunda 2 dakika kaynatılmış ve bu süre sonunda geri soğutucu üstünden 5 ml n-Heptan eklenerek reaksiyona 1 dakika daha devam edilmiştir. Bu süre sonunda erlen geri soğutucu ve su banyosundan çıkartılarak reaksiyon durdurulmuştur. Erlendeki çözelti balonjojeye aktarılmış ve üzerine doymuş tuz çözeltisi ilave edilip bir süre bekletilerek faz ayrımı sağlanmıştır. Bu çözelti içindeki suyu tutabilmek amacı ile bir flakona bir miktar susuz sodyum sülfat konarak üzerine 1 ml n-heptan ve balonjojedeki çözeltinin üst fazı eklenmiştir. Elde edilen örnek etiketlenerek gaz kromatografi cihazına enjekte edilebilecek hale getirilmiştir [14,100].

Tablo 5.3 : Metil esteri hazırlanacak madde miktarına karşılık gelen BF₃-Metanol kompleksi miktarı.

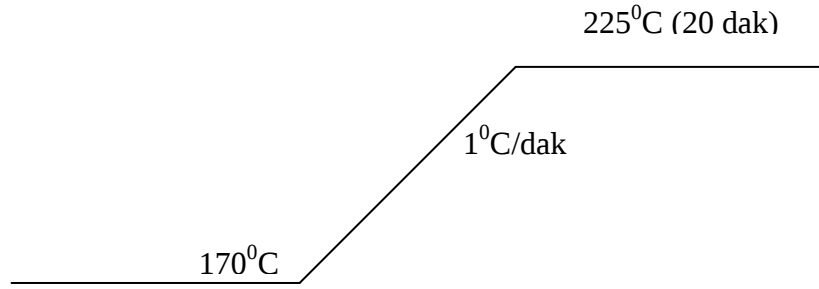
Ekstrakt (mg)	Balonjoje (ml)	BF ₃ -Metanol kompleksi (ml)
100-250	50	5
250-500	50	7
500-750	125	9
750-1000	125	12

5.7. Metil Esterlerin Gaz Kromatografisi Analizi

Bu çalışmada HP6890 marka gaz kromatografi cihazı kullanılmıştır. Morina karaciğer yağının yağ asitleri bileşiminin en iyi şekilde ayrılıp bulunabilmesi için EP’de (Avrupa Farmakopesi) sayfa 958-959’da verilen gaz kromatografisi metodu kullanılmıştır. Analize başlamadan önce cihazın gerekli ayarları yapılmıştır. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanılmıştır. Gaz kromatografisi fırın programı Şekil 5.2’de görülmektedir [131].

Gaz kromatografisi koşulları;

Dedektör tipi	: FID
Dedektör sıcaklığı	: 280 ⁰ C
Enjektör tipi	: Dağıtım (1:200)
Enjektör sıcaklığı	: 250 ⁰ C
Kolon	: ZB1 (kapilar kolon, 30m x 0.25mm x 0.25µm)
Fırın sıcaklık programı	: 170- 225 ⁰ C (1 ⁰ C / dk) 225 ⁰ C (20 dk)
Taşıyıcı gaz (N ₂) akış hızı	: 4.5 ml/dk
Hava akış hızı	: 400 ml/dk
H ₂ akış hızı	: 30 ml/dk



Şekil 5.2 Gaz kromatografisi fırın programı

Metil esterleri hazırlanan örnekler ve orjinal morina karaciğer yağı gaz kromatografide analiz edilmiştir. Elde edilen kromatogramda Dokosahekzaenoik asidin kesin olarak tanımlanması için sigma chemical company'den alınan %90 Saflıktaki Dokosahekzaenoik Asit metil esteri standardı da aynı koşullarda gaz kromatografide analiz edilmiştir. Numune kromatogramında gözlenen diğer yağ asiti piklerinin tanımlanmasında 8:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 20:0 yağ asitlerinden ibaret standart yağ asitleri metil esterlerinin gaz kromatografide analizi sonucu elde edilen kromatogram ve EP'de sayfa 959'da [131] verilen morina karaciğer yağının gaz kromatografisi ile analizinden elde edilen kromatogram referans alınmıştır.

5.8. Hidroliz Ürünlerinin TG, DG, MG ve YA Bileşiminin Saptanması

Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile hidrolizi sonucu elde edilen ürün ekstrakte edildikten sonra döner vakum evaporatörde hegzanı uçurulmuştur. Kalıntı 5ml tetrahidrofuronda (THF) çözülerek TG, DG ve MG bileşimini tespit etmek üzere HPLC (yüksek basınçlı likit kromatografi)'de aşağıda verilen koşullarda analiz edilmiştir;

Kolon: PL-Gel 50 A

Yöntem: İzokratik

Kolon ısısı: 35°C

Akış hızı: 0,5 ml/ dk

Hareketli faz: %100 THF

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

Morina karaciğer yağının enzimatik hidroliz reaksiyonunun deneysel olarak saptanmış en uygun koşullarda elde edilen hidroliz ürünü kolon kromatografisi ile fraksiyonlanmış ve elde edilen her fraksiyonun (TG, DG, MG ve YA) kapiler gaz kromatografisi ile içerdiği yağ asitleri bileşimleri de saptanmıştır. Böylece her fraksiyonda hangi yağ asitlerinin zenginleştirildiği belirlenerek hidrolizin son değerlendirilmesi yapılmıştır.

Serbest yağ asitleri fraksiyonunu karışımdan ayırmak için karışım hegzanda çözüldükten sonra etanolik KOH çözeltisi ile titre edilmiş ve serbest yağ asitlerinin potasyum tuzları elde edilmiştir. Daha sonra bu karışım içinde su bulunan ayırma hunisine aktarılmıştır. TG, DG, MG fraksiyonlarını içeren hegzan fazı ile yağ asitleri potasyum sabunlarını içeren sulu fazın ayrılması için bir süre beklenmiştir. Ayırma hunisinden alınan sulu faza daha sonra damla damla %3'lük H₂SO₄ çözeltisi, çözeltinin pH'ı 3 olana kadar ilave edilmiştir. Asit ilavesi ile tekrar serbest hale geçen yağ asitleri ortamdan hegzanla ekstrakte edilerek ayrılmıştır. Böylece hidroliz ürünündeki yağ asitleri fraksiyonu saf olarak elde edilmiştir. Ayırma hunisinde kalan ve içerisinde TG, DG, MG fraksiyonları bulunan hegzan fazı ise döner vakum evaporatörde çözücüsü tamamen uçana kadar tutulmuştur. Evaporasyon sonucu ele

geçen gliserit karışımına daha sonra kolon kromatografisi uygulanarak TG, DG ve MG fraksiyonlarının saf olarak birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Kolon kromatografisi ile gliserid karışımından Mono, di ve trigliserid fraksiyonlarının ayrılmasında, 18 mm iç çapında, 30 cm uzunluğunda ve içerisinde 25 g slika jel bulunan cam kolon kullanılmıştır. Slika jel dietileterle karıştırıldıktan sonra kolona doldurulmuştur. Tartılan 1g numune 10 ml hegzanda çözülerek kolona beslenmiştir. TG fraksiyonunu ayırmak için 250 ml hegzan:dietileter (85:15 hacmen), DG fraksiyonunu ayırmak için 250 ml hegzan:dietileter (50:50 hacmen) ve MG fraksiyonunu ayırmak için ise 250 ml dietileter 2ml/dk hızla kolondan geçirilmiştir. Kolondan alınan elüatlar 50 ml'lik porsiyonlar halinde toplanmış ve içerikleri TLC ile kontrol edilmiştir. Slika jel G (merck) kaplanmış tabakalara elüatlardan alınmış örnekler tatbik edildikten sonra, tabakalar hegzan:dietileter:asetikasit (70:30:2 hacmen) çözücü sisteminde doyurulmuştur. Daha sonra bu tabaka, içerisinde iyot buharı bulunan cam küvete yerleştirilmiştir. Böylece tabaka üzerindeki TG, DG ve MG spotları görünür hale getirilmiştir. Kolondan alınan tüm elüatların TLC incelemesi yapıldıktan sonra sadece saf olarak TG, DG veya MG içeren fraksiyonlar bir araya toplanmıştır. Bunların çözücülerini uçurulmuş ve böylece gliserid bileşiklerini saf olarak elde edilmiştir [20,130].

Elde edilen TG, DG, MG ve YA fraksiyonları daha sonra MeOH kompleksi ile metil esterlerine dönüştürülmüştür ve yağ asitleri bileşimi kapılar gaz kromatografisinde Bölüm 5.7'de açıklanan analiz koşullarında belirlenmiştir.

5.10. Morina Karaciğer Yağının Enzimatik Hidroliz Ürününün Yağ Asidi Bileşimi

Numunelerin bölüm 5.7'de anlatıldığı şekilde Gaz kromatografisi ile analizi sonucu elde edilen pikler sigma chemical company'den temin edilen Dokosahekzaenoikasit metil ester standardı ve 8:0, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:1, 20:0 yağ asitlerinden ibaret standart yağ asitleri metil esterlerinin gaz kromatografide analizi sonucu elde edilen kromatogramlarla ve aynı balık yağına ait EP'de sayfa 959'daki gaz kromatografisi kromatogramı [131] ile karşılaştırılarak tanımlanmıştır. Orijinal yağa oranla Enzimatik hidroliz ürününün yağ asidi bileşenlerinin ne kadar değiştiğini belirlemek için orijinal morina karaciğer yağı aynı koşullarda gaz kromatografide analiz edilmiş, yağ asidi yüzdeleri hesaplanmıştır.

5.10.1.Morina Karaciğer Yağının *Candida Rugosa* Lipazı İle Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne Enzim Miktarının ve Hidroliz Süresinin Etkisi

Bu bölümde Morina karaciğer yağının hidroliz reaksiyonunun yürüyüşüne enzim miktarı ve hidroliz süresinin etkisi araştırılmıştır. Öncelikli olarak orjinal morina karaciğer yağı gaz kromatografisi cihazında analiz edilerek yağ asitleri bileşimi belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler Tablo 5.4.'de, örnek kromatogram ise Ek A'da verilmiştir.

Tablo 5.4. Orjinal Morina karaciğer yağının yağ asitleri bileşimi.

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

Morina karaciğer yağı pH 7.0, T=35⁰C, yağ : tampon çözelti, 12g:18ml koşullarında sırası ile 400U/g_{yağ}, 1000U/g_{yağ}, 2000U/g_{yağ}, 5000U/g_{yağ} ve 10.000U/g_{yağ} enzim kullanılarak 48 saat süre ile hidroliz edilmiştir. Elde edilen hidroliz ürünlerinin metil esterlerinin gaz kromatografi cihazında analizi sonucu gözlemlenen pikler standartlarla kıyaslanarak ürünün yağ asitleri bileşimi saptanmış ve örnek kromatogramlar EK A'da verilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen yağ asidi bileşimi verileri Tablo 5.5, Tablo 5.6, Tablo 5.7, Tablo 5.8 ve Tablo 5.9'da verilmiştir.

Tablo 5.5. Morina karaciğer yağının pH 7.0, T=35⁰C, E=400 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

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

Tablo 5.5 ‘in incelenmesiyle, 400 U enzim kullanılarak pH 7.0 ve 35⁰C koşullarında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonrası Orjinal yağda %10.72 olan DHA miktarının hidroliz ürününde 3 saat içinde herhangi bir değişme göstermediği ancak 12 saat sonrasında % 12,60’a yükseldiği görülmüştür. Reaksiyon süresinin 48 saate uzatılması ile ise belirgin bir artış gözlenmemiş ve orijinal yağa göre 1.21 kat artış elde edilebilmiştir.

Tablo 5.6. Morina karaciğer yağının pH 7.0, T=35⁰C, E=1000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

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

1000 U enzim kullanılarak pH7.0 ve 35⁰C’de gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonrası DHA miktarı 24 saat sonrasında orijinal yağa göre 1,34 kat yükseltilmiştir. Reaksiyon süresinin 48 saate uzatılması ile DHA miktarındaki artışın 1,48 kata ulaştığı görülmüştür. Tablo 5.5 ve Tablo 5.6’nın değerlendirilmesi sonucu, 400U enzim kullanımında ilk 3 saat boyunca DHA miktarında herhangi bir artış görülmezken 1000U enzim kullanıldığında reaksiyonun ilk saatlerinden itibaren DHA miktarında artış olduğu görülmüş ve enzim miktarını 400 U’dan 1000U’ye yükseltmenin DHA artışında etkili olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 5.7. Morina karaciğer yağının pH 7.0, T=35⁰C, E=2000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

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

Enzim miktarının 1000 U'den 2000 U'ye çıkarılması sonucu pH7.0 ve 35⁰C koşullarında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonrası DHA miktarı 12 saat sonrasında orijinal yağa göre 1,36 kat yükselirken , 48 saat sonrasında bu değerin 1.55 kata ulaştığı görülmüştür.

Tablo 5.8. Morina karaciğer yağının pH 7.0, T=35⁰C, E=5000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

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

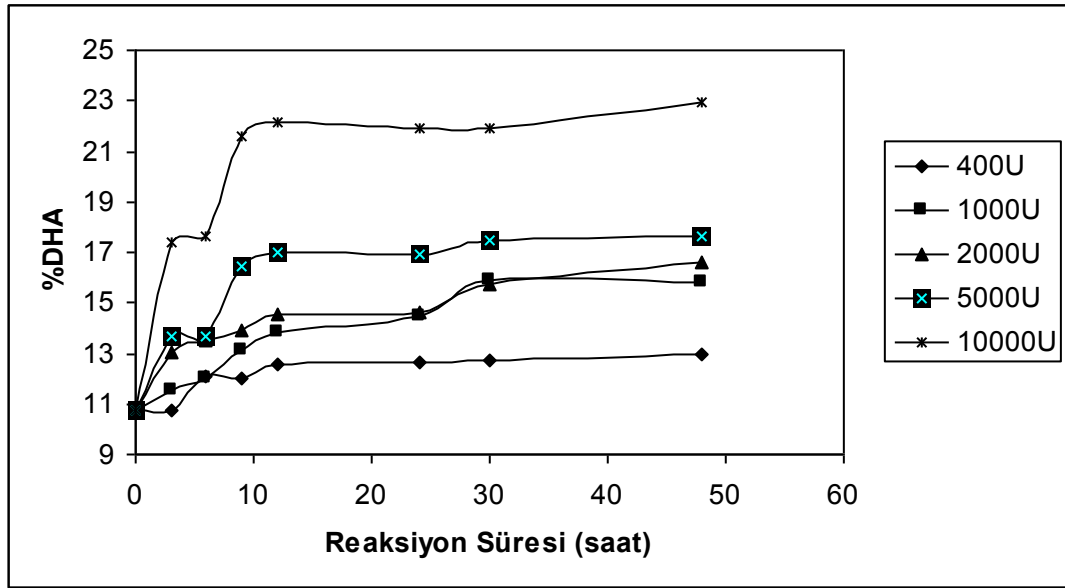
Tablo 5.8'in incelenmesi sonucu enzim miktarı 5000 U'ye yükseltilerek pH7.0 ve 35⁰C koşullarında gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu ile DHA miktarında daha hızlı bir artış gözlenmiştir. DHA miktarı 9 saat gibi kısa bir süre sonunda orijinal yağa göre 1.53 kat artarken sürenin 48 saate yükseltilmesi ile artışın ancak 1.65 kata çıktığı görülmüştür.

Tablo 5.9. Morina karaciğer yağının pH 7.0, T=35⁰C, E=10.000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

Yağ asitleri	Reaksiyon süresi (saat)						
	3	6	9	12	24	30	48
	%Bileşim						
14:00	10,50	4,47	3,12	3,32	3,45	3,87	3,56
15:00	-	1,81	2,43	2,29	1,73	1,25	2,14
16:00	21,98	8,59	5,58	6,24	6,58	7,60	6,92
16:1 n-7	2,49	3,92	5,33	5,16	4,35	3,01	5,60
16:4 n-1	-	-	-	-	-	-	-
18:00	1,56	3,99	3,64	3,71	3,43	3,91	3,10
18:1 n-9	5,26	4,64	3,50	4,01	4,11	4,80	4,66
18:1 n-7	4,35	1,77	1,15	1,20	1,30	1,47	1,19
18:2 n-6	1,60	2,23	3,26	3,19	3,05	2,03	4,08
18:3 n-3	-	0,72	0,99	-	0,73	0,47	0,99
18:4 n-3	0,89	1,02	1,34	1,12	0,97	0,63	1,14
20:1 n-9	7,08	13,12	10,51	10,60	10,60	11,73	8,80
20:1 n-7	0,77	0,88	0,64	-	0,71	0,79	0,59
20:5 n-3	9,79	7,63	5,32	5,73	7,63	8,98	6,88
20:4 n-6	3,28	6,59	10,84	10,63	6,96	4,86	6,67
20:3 n-3	-	0,71	0,52	-	0,65	0,69	0,53
20:4 n-3	3,71	4,41	6,56	6,35	5,75	3,59	6,43
22:1 n-11	8,12	14,10	12,33	12,93	14,46	16,42	12,33
22:1 n-9	1,25	1,73	1,34	1,39	1,65	1,98	1,41
22:6 n-3	17,36	17,64	21,60	22,13	21,90	21,94	22,98

Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile hidroliz reaksiyonuna enzim miktarı ve sürenin etkisini incelediğimiz 1.seri deneylerde enzim miktarı 10.000U'ye yükseltilerek enzim miktarındaki büyük artışların % DHA artışını nasıl etkileyeceği incelenmiş ve ilk saatlerden itibaren % DHA miktarında hızlı bir artış olduğu görülmüştür. 9 saat gibi kısa bir süre sonunda %DHA miktarı %21,60'a ulaşmış ve orijinal yağa göre 2.02'lik bir artış sağlanmıştır. Ancak reaksiyon süresinin 48 saat boyunca devam ettirilmesinin %DHA artışına belirgin bir etkisi olmamış ve orijinal yağın 2.14 katına ulaştığı görülmüştür.

Hidroliz ürünündeki 'DHA' miktarının kullanılan enzim miktarına bağlı olarak zamana göre değişim grafiği düzenlenmiş ve Şekil 5.3'de sunulmuştur.



Şekil 5.3. Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün DHA içeriğine enzim miktarının etkisi (pH 7, T=35⁰C, yağ : tampon çözelti, 12g:18ml, 600devir/dakika).

Şekil 5.3.'de yer alan tüm eğrilerin değerlendirilmesi sonucu enzim miktarının g_{yağ} başına 400 U'den 1000 U'ye artırılmasının DHA içeriğinin artmasına büyük etkisi olduğu görülmüştür. Orijinal balık yağına göre DHA miktarı 48 saat sonunda 400 U/g_{yağ} kullanımında 1,21 katına çıkarken, 1000 U/g_{yağ} kullanımında 1,48 kat artış görülmüştür. Enzim miktarının 2000 U/g_{yağ} ve 5000 U/g_{yağ} olarak artmasında 1000 U/g_{yağ}'a oranla çok büyük farklılıklar olmadığı görülmüştür. 48 saat sonunda DHA artışı 2000 U/g_{yağ}'da 1,55 kat olurken 5000 U/g_{yağ}'da 1,65 kat artış elde edilmiştir. Enzim miktarı 10.000 U/g_{yağ}'a yükseldiğinde ise DHA miktarında daha yüksek artış elde edilmiştir. 9 saat gibi kısa bir süre sonunda orijinal yağa göre DHA miktarı 2,02 kat artmıştır, fakat devam eden süreler boyunca bu değerde fazla bir değişme görülmeyip 48 saat sonunda ancak 2,14 katına ulaşabilmiştir.

Farklı enzim miktarları kullanılarak yürütülen bu deneylerde reaksiyon süresi ile % hidroliz miktarının değişimi de incelenmiştir. % Hidroliz değerleri bölüm 5.4'de anlatıldığı şekilde bulunmuştur ve sonuçlar tablo 5.10'da verilmiştir.

Tablo 5.10. Morina karaciğer yağının pH 7.0, T=35⁰C, E=400-1000-2000-5000-10.000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde %hidroliz miktarının zamana göre değişimi

Reaksiyon süresi (saat)	% Hidroliz				
	400 U	1000 U	2000 U	5000U	10.000 U
3	28,12	35,18	42,30	55,35	67,16
6	55,74	65,09	70,15	77,68	80,12
9	65,36	72,04	76,32	83,33	88,92
12	72,14	74,30	82,64	84,47	89,31
24	73,18	79,97	83,17	84,98	89,55
30	74,02	80,06	83,42	85,52	90,07
48	76,04	80,56	84,05	86,41	90,24

% Hidroliz tablosunun incelenmesi ile enzim miktarının % hidroliz miktarının artışında etkili olduğu görülmüştür. Enzim miktarının artırılması ile balık yağının daha hızlı hidroliz olduğu anlaşılmıştır. 400 U/g_{yağ} enzim kullanımı ile 48 saat sonunda %76,04 hidroliz gerçekleşirken bu değer 1000 U/g_{yağ} enzim kullanımı ile 24. saatte %79,97'ye ulaşmış ve fazla bir yükselme göstermeden 48 saat sonunda %80,56 olduğu görülmüştür. 2000 U/g_{yağ} enzim kullanımı ile 12 saatte % 82,64 hidroliz gerçekleşmiş ve bu saatten sonra belirgin bir artış gözlenmemiştir. 5000 U/g_{yağ} ve 10.000 U/g_{yağ} enzim kullanımında ise 9 saat sonunda sırası ile % 83,33 ve % 88,92 hidroliz gerçekleşmiş ve 48 saat sonuna kadar belirgin bir artış gözlenmemiştir.

Amacımız ekonomik boyutuda göz önünde bulundurarak en uygun koşulları bulmak olduğu için, arada çok büyük farklılıkların bulunmaması sebebi ile 5000 U/g_{yağ} ve 10.000 U/g_{yağ} gibi yüksek enzim miktarlarının kullanımı tercih edilmemiştir. 1000 ve 2000 U/g_{yağ} enzim kullanımında hidroliz reaksiyonu süresince DHA miktarında meydana gelen değişimler incelenmiş ve 2000 U/g_{yağ} enzim kullanımı ile 12 saat sonunda DHA miktarında 1,36 kat artış görülürken 1000 U/g_{yağ} enzim kullanımı ile 24 saat sonunda DHA miktarının 1,35 katına ulaştığı anlaşılmıştır. Sürenin 48 saate uzatılması durumunda ise % DHA miktarında ve % hidroliz miktarında dikkate değer bir artış olmadığı görülmüş ve sürenin 48 saate uzatılmasının gerekli olmadığı anlaşılmıştır.

Candida rugosa lipazı ile yürütülen birinci seri denemeler sonucunda morina karaciğer yağının hidroliz denemelerinin diğer parametrelerinin incelenmesine 1000U/g_{yağ} enzim kullanılarak 24 saatlik reaksiyon süresi ile devam edilmesinin daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

5.10.2. Morina Karaciğer Yağının *Candida Rugosa* Lipazı ile Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne pH Etkisi

Lipaz enzimlerinin protein yapısında olmalarından dolayı aktivitelerinde pH'ın etkisi çok büyüktür. Enzimler pH değişimine karşı çok duyarlıdırlar ve aktivite gösterdikleri pH skalası dardır. Genellikle çok fazla asidik ve bazik ortamlarda etkisizdirler. Bu sebeple çalışmalarımızda ikinci step olarak *Candida rugosa* lipazının hidroliz aktivitesinin en yüksek olduğu pH'ın saptanması için çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, Morina karaciğer yağı ile tampon çözelti oranı 12g:18ml olacak şekilde, 1000U/gyağ enzim ilavesi ile, 35⁰C'de, 600 devir/dakika ve 24 saat süre ile sırası ile pH 3.0, pH 5.0, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0'da hidroliz deney serileri yürütülmüştür.

Bu deneye ait sonuçlar Tablo 5.11, Tablo 5.12, Tablo 5.6, Tablo 5.13 ve Tablo 5.14' de verilmiştir. Bu verilere ait gaz kromatografi örnek kromotogramları Ek A'da görülmektedir.

Tablo 5.11. Morina karaciğer yağının pH 3.0, T=35⁰C, E=1000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

Yağ asitleri	Reaksiyon süresi (saat)						
	1	2	3	6	9	12	24
	%Bileşim						
14:0	7,70	7,74	7,68	7,58	8,60	9,62	6,73
15:0	0,25	0,29	0,39	0,58	0,22	0,44	-
16:0	21,93	23,05	20,52	19,84	21,76	24,00	25,47
16:1 n-7	0,97	0,89	1,77	1,60	0,51	1,06	0,22
16:4 n-1	0,27	0,28	0,28	0,35	0,35	0,37	0,17
18:0	2,38	2,33	2,63	2,95	3,11	2,84	1,41
18:1 n-9	14,72	14,79	14,07	13,80	14,65	14,42	17,26
18:1 n-7	2,79	2,91	2,65	2,85	2,97	2,79	-
18:2 n-6	0,65	0,55	1,25	1,14	-	-	-
18:3 n-3	0,16	-	0,33	0,27	-	-	-
18:4 n-3	0,15	0,13	0,33	0,21	0,33	0,52	3,23
20:1 n-9	13,51	13,61	14,01	13,27	13,34	12,94	12,00
20:1 n-7	0,39	0,38	0,41	0,64	0,50	0,36	0,29
20:5 n-3	9,96	8,63	7,88	9,20	9,14	7,56	10,57
20:4 n-6	0,48	0,62	0,87	1,22	0,32	0,60	-
20:3 n-3	0,17	0,17	0,19	0,27	0,24	-	-
20:4 n-3	0,47	0,28	1,01	0,63	0,23	0,28	-
22:1 n-11	11,42	11,83	12,03	11,17	11,97	10,44	9,81
22:1 n-9	0,95	0,92	0,95	1,13	1,05	0,73	0,76
22:6 n-3	10,68	10,58	10,75	11,30	10,73	11,03	12,08

Tablo 5.11'in incelenmesi ile hidroliz reaksiyonunun pH3.0'de gerçekleştirilmesi ile % DHA miktarında 12 saat boyunca artış olmadığı ve 24 saat sonunda ise orijinal yağa göre yalnızca 1,12 kat artış sağlandığı görülmüştür.

Tablo 5.12. Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=35⁰C, E=1000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

Yağ asitleri	Reaksiyon süresi (saat)						
	1	2	3	6	9	12	24
	% Bileşim						
14:0	8,68	9,99	8,76	7,85	8,44	4,37	5,55
15:0	0,41	0,57	0,27	0,22	0,48	-	0,11
16:0	22,17	19,96	20,49	17,73	18,06	26,24	19,97
16:1 n-7	1,59	1,64	0,60	0,36	1,24	0,71	0,63
16:4 n-1	2,34	-	0,28	0,24	0,25	-	0,12
18:0	12,28	3,37	3,04	3,46	3,46	0,91	1,39
18:1 n-9	2,81	8,97	10,86	8,73	8,38	15,40	8,19
18:1 n-7	0,90	2,60	2,98	2,95	2,78	2,97	2,62
18:2 n-6	0,23	0,62	0,35	0,19	0,51	0,28	0,26
18:3 n-3	0,23	-	-	-	-	-	-
18:4 n-3	13,34	-	-	-	-	-	-
20:1 n-9	0,41	15,84	14,82	16,20	15,52	12,45	15,82
20:1 n-7	9,35	0,41	0,55	0,61	0,48	-	0,32
20:5 n-3	0,48	8,79	10,29	11,28	10,40	10,39	11,53
20:4 n-6	0,73	0,79	0,57	0,42	1,05	0,37	0,84
20:3 n-3	0,16	-	0,21	0,29	0,25	-	-
20:4 n-3	0,88	0,94	0,26	0,12	0,58	-	0,60
22:1 n-11	10,92	13,39	12,57	14,73	13,70	10,67	15,44
22:1 n-9	0,88	0,90	1,08	1,34	1,17	1,03	1,06
22:6 n-3	11,20	11,21	12,03	13,29	13,26	14,21	15,55

Hidroliz reaksiyonunda ortam pH'ının 5.0'a yükselmesi ile Morina Karaciğer yağının hidrolizinde yükselme gözlenmektedir. % DHA miktarında 1saat sonunda değişme görülmezken 24 saat sonunda DHA miktarının orijinal yağa göre 1,45 kat arttığı görülmüştür. Tablo 5.6 ile kıyaslama yapıldığında pH'ın 7.0 olması durumunda hidroliz miktarının pH 5.0'e göre biraz daha düşük olduğu ve orijinal yağa göre DHA miktarında 1.34 kat artış elde edildiği görülmüştür.

Tablo 5.13. Morina karaciğer yağının pH 8.0, T=35⁰C, E=1000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

Yağ asitleri	Reaksiyon süresi (saat)						
	1	2	3	6	9	12	24
	% Bileşim						
14:0	5,90	4,37	3,75	6,05	5,59	6,21	3,85
15:0	3,01	-	0,65	2,00	2,20	2,31	3,57
16:0	19,57	21,41	29,11	22,30	18,22	22,05	12,21
16:1 n-7	10,89	2,66	4,04	10,30	9,54	11,64	12,30
16:4 n-1	-	-	-	-	-	-	-
18:0	0,87	1,46	1,01	0,89	1,08	-	1,08
18:1 n-9	11,42	19,20	14,49	11,10	10,25	10,04	7,48
18:1 n-7	1,59	2,95	1,98	1,49	1,63	1,41	1,49
18:2 n-6	6,82	1,43	2,12	5,69	5,77	6,22	7,72
18:3 n-3	1,87	-	0,71	1,75	1,70	2,01	2,45
18:4 n-3	0,92	-	2,90	0,87	1,11	-	1,77
20:1 n-9	7,71	15,54	9,54	8,92	9,61	8,06	7,14
20:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-
20:5 n-3	4,87	5,95	6,61	4,53	4,95	3,55	4,98
20:4 n-6	5,72	1,36	2,59	4,57	5,67	5,58	8,26
20:3 n-3	-	-	-	-	-	-	-
20:4 n-3	3,02	0,89	1,26	3,02	3,57	2,86	6,10
22:1 n-11	4,74	10,57	7,00	5,41	6,95	5,85	5,37
22:1 n-9	-	1,13	1,14	-	0,36	-	0,53
22:6 n-3	11,09	11,07	11,10	11,11	11,78	12,21	13,69

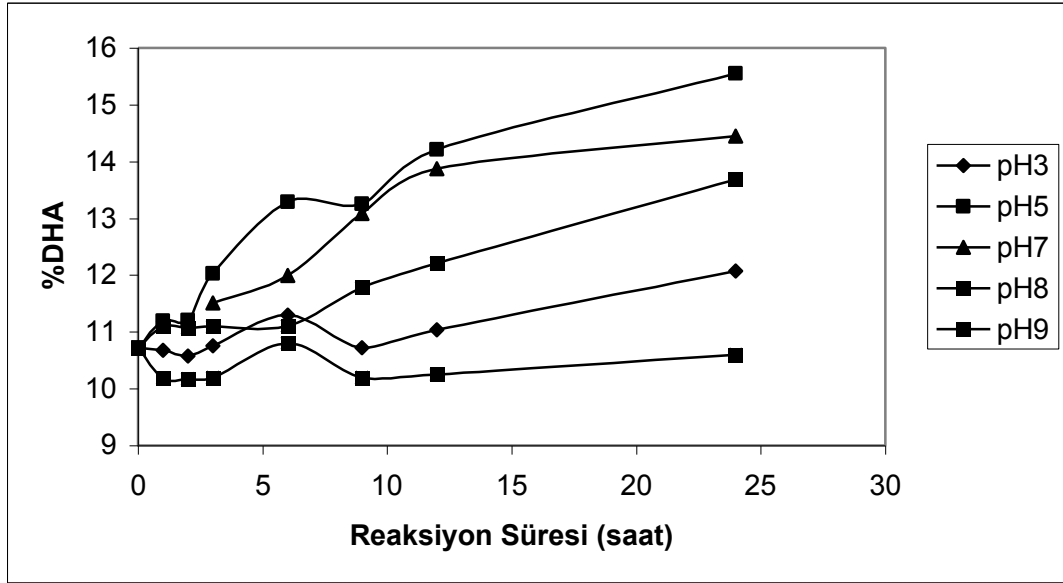
Tablo5.13 incelendiğinde pH'ın 8.0'a yükseltilmesi ile % DHA artışlarında pH 5.0 ve 7.0'a göre azalma olduğu görülmüş ve 24 saat sonunda ulaşılan %13,69 DHA miktarı ile orijinal yağa göre 1.28 kat artış gerçekleşmiştir. pH 7.0'nin üstüne çıkıldığında enzim aktivitesinin azalmaya başladığı anlaşılmıştır.

Tablo 5.14. Morina karaciğer yağının pH 9.0, T=35⁰C, E=1000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

Yağ asitleri	Reaksiyon süresi (saat)						
	1	2	3	6	9	12	24
	% Bileşim						
14:0	7,06	9,39	8,53	8,41	7,93	7,95	8,79
15:0	-	0,43	0,30	0,35	-	-	0,26
16:0	25,86	24,56	22,79	21,99	26,63	26,53	22,42
16:1 n-7	0,25	1,99	0,82	0,96	0,99	1,55	0,69
16:4 n-1	0,21	-	0,28	0,31	-	-	0,31
18:0	1,69	2,03	2,65	2,83	1,57	1,77	2,79
18:1 n-9	16,20	15,09	14,65	14,29	15,76	15,02	14,73
18:1 n-7	3,19	2,69	3,01	2,94	2,85	2,64	3,00
18:2 n-6	-	1,09	0,49	0,59	0,31	0,87	0,42
18:3 n-3	-	-	-	-	-	-	-
18:4 n-3	-	-	-	-	-	-	-
20:1 n-9	13,01	12,68	13,32	13,28	12,80	12,80	13,17
20:1 n-7	0,31	-	0,45	0,53	0,30	-	0,47
20:5 n-3	9,21	7,27	8,95	8,86	8,46	7,46	9,10
20:4 n-6	0,21	0,68	0,58	0,74	0,33	0,79	0,54
20:3 n-3	-	-	0,19	0,21	-	-	0,23
20:4 n-3	-	0,79	0,32	0,40	-	0,57	0,38
22:1 n-11	11,54	10,26	11,41	11,39	10,87	10,90	11,00
22:1 n-9	1,08	0,89	1,08	1,13	1,01	0,91	1,12
22:6 n-3	10,18	10,17	10,19	10,80	10,19	10,25	10,60

Tablo 5.14’de verilen değerler incelendiğinde %DHA miktarında orijinal yağa göre hiç artış olmadığı görülmüş ve Morina Karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde ortam pH’ı 9.0 olduğunda enzimin inaktif olduğu anlaşılmıştır.

Farklı pH ortamlarında elde edilmiş sonuçların karşılaştırmalı değerlendirilmesi için zamana göre farklı pH’lardaki %DHA artış grafiği Şekil 5.4 ’de verilmiştir.



Şekil 5.4. Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün DHA içeriğine pH'nın etkisi ($T=35^{\circ}\text{C}$, $E=1000\text{U/gyağ}$, yağ:tampon çözelti, 12gr:18ml).

Tüm pH denemelerindeki % DHA artışının bir arada kıyaslamalı olarak gösterildiği şekil 5.4 incelendiğinde Morina Karaciğer yağının hidrolizinde *Candida rugosa* enziminin çok asidik ve çok bazik ortamlarda aktif olmadığı görülmüştür. Bu çalışmada en yüksek %DHA artışının pH 5.0 ortamında gerçekleştiği görülmüş ve enzimin bu pH'ta daha iyi çalıştığı düşünülerek en uygun pH olarak deney serilerinin geri kalanına pH5.0'te devam edilmiştir.

5.10.3. Morina Karaciğer Yağının *Candida Rugosa* Lipazı İle Hidroliz Reaksiyonunun Yürüyüşüne Sıcaklığın Etkisi

Enzimlerin katalizör olarak kullanıldığı tepkimelerde tepkime hızının yükselmesi belirli bir noktaya kadar sıcaklıkla doğru orantılıdır. Ancak belirli bir noktadan sonra tepkime hızı önce duraklar sonra düşmeye başlar ve tamamen durur. Enzimler yüksek sıcaklıklarda etkisizdirler (genellikle $55-60^{\circ}\text{C}$ üstünde). Lipaz enzimlerinin genel olarak $30-55^{\circ}\text{C}$ arasında aktivite gösterdiği ifade edilse de maksimum aktivite sıcaklığı lipazın cinsine göre farklılık gösterir. Bu çalışmanın üçüncü seri deneylerinde *Candida rugosa* lipazının maksimum aktivite gösterdiği sıcaklığın bulunması amaçlanmıştır.

Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile yürütülen üçüncü seri deneylerinde 24 saat süre ile sırası ile 30 , 35 , 45 , 50 ve 65°C sıcaklıklarda

çalışılmıştır. Tüm deneylerde enzim miktarı 1000U/g_{yağ} , pH 5.0, yağ:tampon çözelti oranı, 12gr:18ml, ve karıştırma hızı 600devir/dakika olarak sabit tutulmuştur.

Bu deneylere ait hidroliz ürünlerinin yağ asidi bileşimleri Tablo 5.12, Tablo 5.15, Tablo 5.16, Tablo 5.17 ve Tablo 5.18’de verilmiştir. Bu sonuçlara ait örnek kromotogramlar Ek A’da görülmektedir.

Tablo 5.15. Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=30⁰C, E=1000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

Yağ asitleri	Reaksiyon süresi (saat)						
	1	2	3	6	9	12	24
	% Bileşim						
14:0	7,51	7,29	7,38	6,73	6,54	6,08	6,29
15:0	0,41	0,47	0,33	0,72	0,83	0,93	0,10
16:0	19,61	17,64	17,07	16,99	13,90	12,68	12,95
16:1 n-7	1,28	1,38	0,79	2,30	2,19	2,28	0,28
16:4 n-1	0,51	0,52	0,65	0,53	0,44	0,51	0,47
18:0	3,07	3,66	4,04	3,16	3,99	4,18	4,55
18:1 n-9	12,34	10,34	9,34	7,65	6,76	6,69	7,03
18:1 n-7	2,97	2,87	2,90	2,07	2,41	2,30	2,69
18:2 n-6	0,76	0,81	0,45	1,07	1,10	1,21	0,28
18:3 n-3	0,20	0,22	0,15	0,42	0,34	0,43	-
18:4 n-3	0,14	0,23	-	0,40	0,40	0,53	-
20:1 n-9	13,52	14,56	15,81	15,82	15,82	15,66	17,10
20:1 n-7	0,62	0,80	0,92	0,56	0,80	0,86	1,17
20:5 n-3	9,85	9,69	9,63	7,93	9,18	8,44	11,40
20:4 n-6	1,02	1,33	0,83	2,72	2,78	3,15	0,41
20:3 n-3	0,36	0,44	0,52	0,31	0,47	0,55	0,70
20:4 n-3	0,46	0,72	0,44	1,62	1,73	2,13	0,38
22:1 n-11	11,46	12,85	15,00	15,31	14,85	16,11	17,21
22:1 n-9	1,32	1,52	1,66	1,31	1,62	1,66	2,12
22:6 n-3	12,58	12,68	12,09	12,38	13,86	13,64	14,88

Hidroliz reaksiyonuna enzim miktarı ve pH’ın etkilerinin araştırıldığı denemelerimizde sıcaklık 35⁰C olarak sabit tutulmuştur 3.seri denemelerimize geçildiğinde ise sıcaklık ilk önce 30⁰C’ye düşürülerek bu değişimin hidroliz reaksiyonuna etkisi incelenmiştir. Tablo 5.15’de görüldüğü gibi sıcaklığın 30⁰C’ye düşürülmesi ile DHA artışında da düşüş olmuş ve 24 saat sonunda orijinal yağa göre 1.39 kat artış sağlanmıştır.

Tablo 5.16. Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=45⁰C, E=1000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

Yağ asitleri	Reaksiyon süresi (saat)						
	1	2	3	6	9	12	24
	% Bileşim						
14:0	7,29	6,47	6,57	6,78	6,69	6,57	6,78
15:0	0,13	0,75	0,61	0,26	0,09	0,21	0,10
16:0	17,21	14,58	15,56	14,74	14,36	14,53	14,09
16:1 n-7	0,63	2,05	1,93	0,55	0,37	0,30	0,15
16:4 n-1	0,46	0,42	0,42	0,47	0,44	0,45	0,44
18:0	3,98	3,87	3,68	4,31	4,23	4,30	4,45
18:1 n-9	10,87	8,53	9,34	8,37	8,13	8,43	7,99
18:1 n-7	2,82	2,73	2,75	2,81	2,97	2,91	2,96
18:2 n-6	0,47	1,20	1,17	0,34	0,24	0,16	0,12
18:3 n-3	0,14	0,38	0,36	0,12	-	-	-
18:4 n-3	0,17	0,40	0,32	0,18	-	0,12	-
20:1 n-9	15,69	14,85	14,82	16,95	16,84	16,99	17,29
20:1 n-7	0,96	0,92	0,90	1,03	1,03	1,05	1,06
20:5 n-3	9,57	9,74	9,66	10,03	11,33	10,64	11,23
20:4 n-6	0,52	1,96	1,71	0,46	0,53	0,31	0,09
20:3 n-3	0,54	0,58	0,51	0,62	0,62	0,62	0,64
20:4 n-3	0,71	1,47	1,25	0,61	0,24	0,31	0,13
22:1 n-11	14,69	13,50	13,38	16,32	16,15	17,10	16,65
22:1 n-9	1,82	1,72	1,67	1,96	1,95	1,91	2,00
22:6 n-3	11,32	13,87	13,39	13,10	13,78	13,08	13,82

Tablo 5.16'nın incelenmesi ile reaksiyon sıcaklığının 45⁰C'ye yükseltilmesi sonucu hidroliz miktarının azaldığı ve 24 saat sonunda ancak 1,29 kat artış sağlandığı görülmektedir.

Tablo 5.17. Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=50⁰C, E=1000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

Yağ asitleri	Reaksiyon süresi (saat)						
	1	2	3	6	9	12	24
	% Bileşim						
14:0	6,69	7,05	6,86	6,60	6,01	6,80	7,00
15:0	0,93	0,80	0,96	1,00	1,34	0,62	0,35
16:0	17,05	16,60	15,06	15,19	13,38	15,27	15,68
16:1 n-7	2,78	2,39	2,72	2,89	3,89	1,95	1,29
16:4 n-1	0,56	0,57	0,58	0,45	0,48	0,53	0,56
18:0	3,32	3,36	3,63	3,27	3,37	3,70	3,85
18:1 n-9	10,79	9,63	8,58	8,89	7,73	8,50	8,84
18:1 n-7	2,83	2,82	2,65	2,72	2,31	2,71	2,94
18:2 n-6	1,81	1,43	1,60	1,80	2,37	1,05	0,60
18:3 n-3	0,53	0,45	0,55	0,56	0,95	0,36	0,21
18:4 n-3	0,50	0,48	0,63	0,62	1,00	0,42	0,25
20:1 n-9	12,86	13,57	13,94	13,47	13,35	15,11	15,29
20:1 n-7	0,81	0,83	1,30	0,91	0,81	0,86	0,89
20:5 n-3	9,16	9,52	8,88	9,74	7,92	9,25	10,17
20:4 n-6	2,48	1,98	2,48	2,84	3,87	1,74	0,96
20:3 n-3	0,47	0,45	0,53	0,49	0,50	0,56	0,58
20:4 n-3	1,51	1,67	2,13	2,28	3,49	1,82	1,07
22:1 n-11	10,84	12,07	12,64	11,15	12,52	14,54	14,78
22:1 n-9	1,38	1,45	1,53	1,54	1,46	1,70	1,78
22:6 n-3	12,72	12,88	12,79	13,60	13,25	12,53	12,90

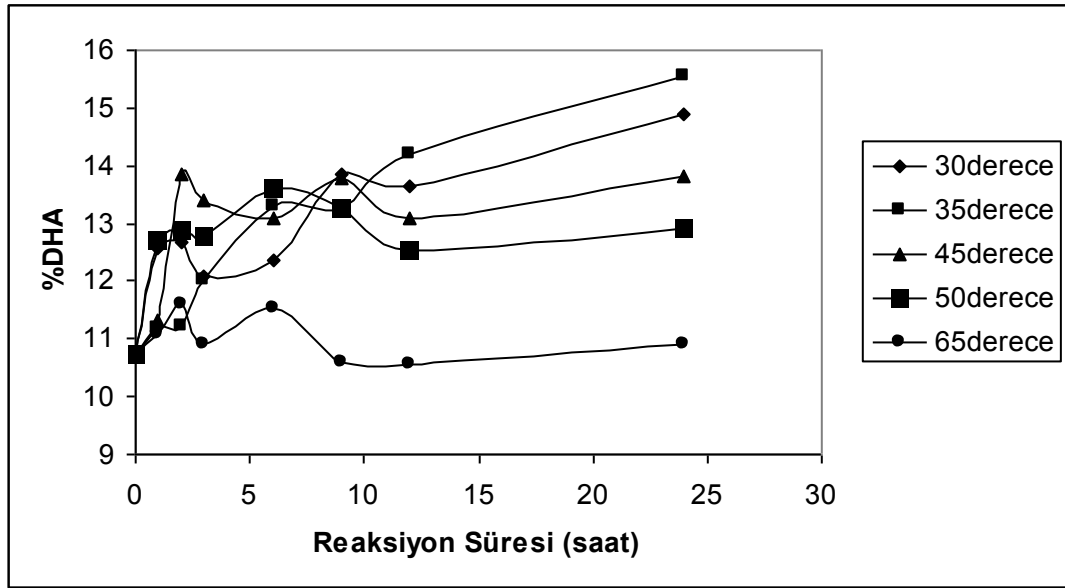
Sıcaklığın 50⁰C'ye yükseltilmesi ile enzimin 1.saatten sonra belirgin bir aktivite göstermediği ilk 1saat sonunda 1.19 kat olan DHA artışının ilerleyen saatlerde fazla değişim göstermeyip 24 saat sonunda orijinal yağın 1.20 katına ulaştığı görülmüştür.

Tablo 5.18. Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=65⁰C, E=1000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 600 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

Yağ asitleri	Reaksiyon süresi (saat)						
	1	2	3	6	9	12	24
	% Bileşim						
14:0	7,27	7,24	6,69	7,74	7,99	7,86	8,03
15:0	0,14	1,07	1,23	1,02	0,21	0,35	0,25
16:0	18,56	18,02	15,35	18,04	19,03	18,89	19,95
16:1 n-7	0,36	1,75	4,11	3,62	1,01	1,37	0,37
16:4 n-1	0,53	0,47	0,52	0,53	0,55	0,61	0,62
18:0	3,68	3,47	3,38	3,85	3,73	3,57	3,65
18:1 n-9	12,36	12,18	10,17	12,14	11,83	11,84	12,81
18:1 n-7	2,91	2,92	2,28	2,78	2,72	2,76	3,02
18:2 n-6	0,28	0,13	2,86	2,64	0,55	0,77	0,17
18:3 n-3	-	-	0,85	0,75	0,18	0,24	-
18:4 n-3	0,09	-	0,84	0,87	0,17	0,22	-
20:1 n-9	15,10	14,14	13,12	14,56	15,08	14,50	13,61
20:1 n-7	0,93	0,86	0,73	0,91	0,88	0,83	0,83
20:5 n-3	9,55	9,76	7,03	9,02	8,23	8,18	9,41
20:4 n-6	0,32	1,12	3,04	2,58	0,38	0,69	0,23
20:3 n-3	0,57	0,52	0,46	0,53	0,52	0,49	0,51
20:4 n-3	0,37	0,11	2,81	2,83	0,64	0,89	0,19
22:1 n-11	14,22	13,06	12,29	2,46	14,15	13,99	13,87
22:1 n-9	1,68	1,60	1,36	1,60	1,55	1,39	1,58
22:6 n-3	11,08	11,59	10,90	11,54	10,60	10,55	10,91

Enzimin inaktif olduğu sıcaklık değerinin saptanabilmesi için reaksiyon sıcaklığı 65⁰C'ye yükseltilerek denemelere devam edilmiş ve tablo5.18'de görüldüğü gibi 24 saat devam ettirilen hidroliz reaksiyonu sonunda DHA miktarında artış gerçekleşmemiştir.

Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile farklı sıcaklıklarda elde edilmiş sonuçlarının karşılaştırılmalı değerlendirilmesi için farklı sıcaklıklardaki DHA artışının zamana bağlı grafiği Şekil 5.5'de verilmiştir.



Şekil 5.5 Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün DHA içeriğine sıcaklığın etkisi (pH 5.0 E=1000U/gyağ, yağ:tampon çözelti, 12gr:18ml)

Şekil 5.5'in incelenmesi sonucu *Candida rugosa* Lipazının Morina Karaciğer yağının hidrolizinde en iyi aktivite gösterdiği sıcaklık değerinin 35⁰C olduğu görülmüştür. Sıcaklığın 30⁰C'ye düşürülmesi ile enzimin aktivitesini koruduğu ancak 50⁰C'den itibaren sıcaklık arttıkça aktivitesinde azalma göstererek 65⁰C'de inaktive olduğu söylenebilir.

5.10.4. Morina Karaciğer Yağının *Candida Rugosa* Lipazı İle Hidroliz Reaksiyonuna Karıştırma Hızının Etkisi

Enzimatik hidroliz reaksiyonunda enzim miktarı, reaksiyon süresi, pH ve sıcaklığın yanı sıra etkili olan parametrelerden biri de reaksiyonun karıştırma hızıdır. Literatürde yer alan çalışmalarda karıştırma hızının reaksiyon veriminde etkili olduğu ve düşük hızlarda gerçekleştirilen reaksiyonlarda hidrolizin de daha yavaş ilerlediği belirtilmektedir. Bu sebeple çalışmalarımızın bu bölümünde birinci, ikinci ve üçüncü seri denemeler sonucu elde edilen en uygun pH, sıcaklık ve enzim miktarı ile karıştırma hızı 200 devir/dakika olacak şekilde azaltılarak 24 saat süre ile hidroliz reaksiyonu gerçekleştirmek ve karıştırma hızının hidroliz ürünündeki yağ asidi bileşimini nasıl etkilediğini saptamak amaçlanmıştır.

Morina karaciğer yağının pH 5.0, E=1000U/gyağ, T=35⁰C ve 200 devir/dakikada 24 saat süre ile devam ettirilen enzimatik hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen veriler

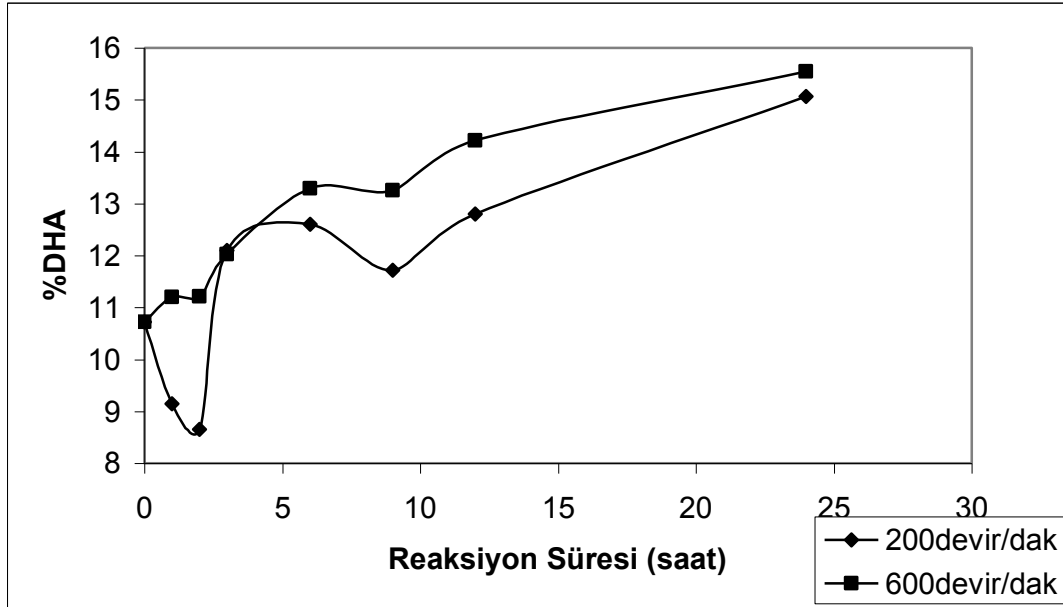
Tablo 5.19’da, bu verilerin elde edildiği örnek kromotogram ise Ek A’da görülmektedir.

Tablo 5.19. Morina karaciğer yağının pH 5.0, T=35⁰C, E=1000 U/g_{yağ}, yağ : tampon çözelti (12 gram : 18 ml), 200 devir/dakika koşullarında enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün yağ asidi bileşiminin zamana göre değişimi.

Yağ asitleri	Reaksiyon süresi (saat)						
	1	2	3	6	9	12	24
	% Bileşim						
14:0	7,99	8,02	6,81	6,69	7,19	6,35	5,87
15:0	0,45	0,39	1,09	1,03	0,49	1,56	1,89
16:0	18,92	19,29	15,80	15,34	15,98	13,32	12,81
16:1 n-7	1,98	1,74	3,24	2,83	1,75	3,81	4,60
16:4 n-1	0,48	0,51	0,40	0,44	0,40	0,52	0,40
18:0	3,65	3,88	3,49	3,47	3,88	3,59	3,09
18:1 n-9	11,83	11,31	10,17	9,58	9,48	7,92	7,38
18:1 n-7	2,47	2,43	2,58	2,70	2,75	2,31	2,43
18:2 n-6	1,29	1,05	2,30	2,07	1,17	2,26	2,77
18:3 n-3	0,38	0,32	0,67	0,55	0,38	0,81	0,93
18:4 n-3	0,45	0,35	0,71	0,62	0,57	1,14	0,90
20:1 n-9	14,55	15,26	12,95	13,06	14,85	12,98	11,76
20:1 n-7	0,77	0,61	0,81	0,82	0,81	0,66	0,69
20:5 n-3	7,54	7,37	8,53	9,17	9,33	8,78	8,73
20:4 n-6	0,97	0,83	2,52	2,48	1,32	3,51	4,74
20:3 n-3	0,45	0,48	0,46	0,47	0,54	1,43	0,43
20:4 n-3	1,46	1,24	2,47	2,07	1,95	3,07	3,47
22:1 n-11	13,92	14,92	11,58	12,52	13,84	11,97	10,38
22:1 n-9	1,32	1,34	1,33	1,48	1,59	1,20	1,34
22:6 n-3	9,14	8,65	12,10	12,60	11,71	12,79	15,07

Belirlenen en uygun koşullarda 600 devir/dakikada gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonuna ait DHA değerlerinin 200 devir/dakika karıştırma hızı ile elde edilenlerle kıyaslamalı grafiği Şekil 5.6’da görülmektedir.

Reaksiyonun karıştırma hızının düşürülmesi ile reaksiyon hızında ve hidroliz miktarında düşüş gözlenmiştir. Reaksiyonun ilk 2 saati boyunca DHA miktarında artış gözlenmemiş ancak 3.saatten itibaren DHA artışı başlamış ve 24 saat sonunda orijinal yağa göre DHA miktarı 1.40 kat artmıştır.



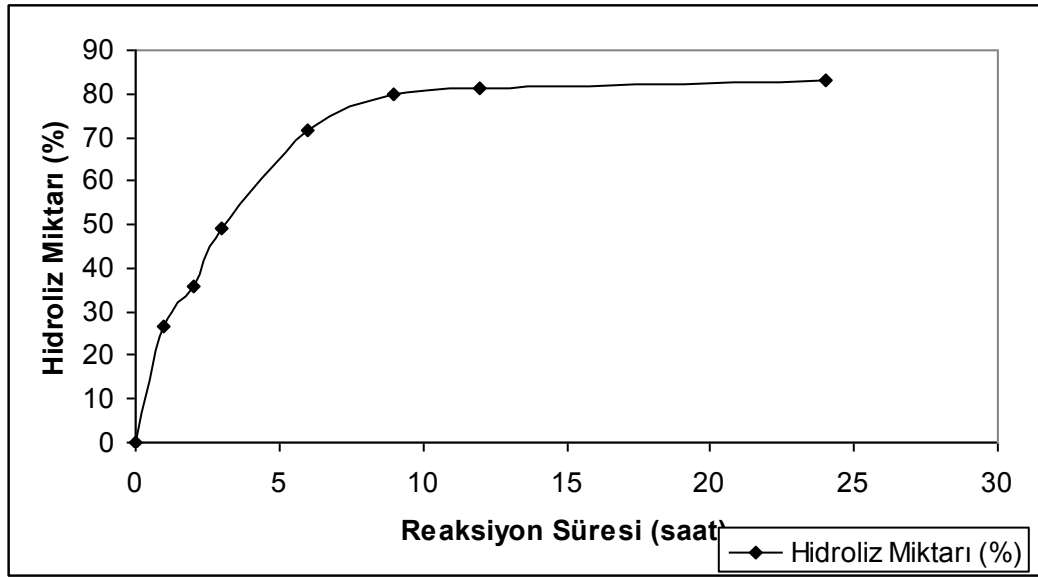
Şekil 5.6. Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde hidroliz ürününün DHA içeriğine karıştırma hızının etkisi.

5.10.5. Morina Karaciğer Yağının En Uygun Koşullarda *Candida Rugosa* Lipazı İle Hidroliz Reaksiyonu Süresince %Hidroliz Miktarının Saptanması

Enzimatik hidroliz reaksiyonu süresince hidroliz miktarında artış görülür ancak belli bir süre sonunda bu artış azalarak sabit kalır. Hidroliz miktarının zamana göre değişim miktarı Tablo 5.20 ve Şekil 5.7’de görülmektedir.

Tablo5.20. Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile belirlenen uygun koşullarda (pH5.0, E=1000 U/g_{yağ}, T=35⁰C, 600devir/dakika) enzimatik hidrolizinde hidroliz miktarının zamana göre değişim

Reaksiyon Süresi (saat)	Hidroliz Miktarı (%)
1	26.5
2	35.6
3	49.1
6	71.8
9	80.0
12	81.3
24	83.1



Şekil 5.7. Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile enzimatik hidrolizinde hidroliz miktarının zamana göre değişimi

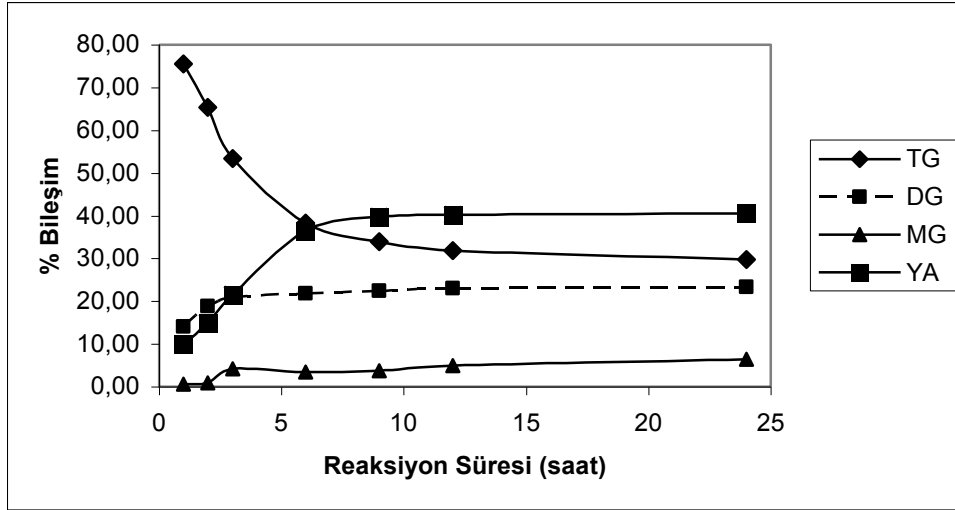
Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile en uygun koşullarda hidroliz reaksiyonunun gerçekleştirilmesi esnasında % hidroliz miktarındaki değişimler takip edilmiş ve şekil 5.7'nin incelenmesi sonucu ilk 9 saat içinde % hidroliz miktarında hızlı bir artış olduğu ancak devam eden saatlerde bu artışın azalarak sabit kaldığı görülmüştür.

5.10.6. Morina Karaciğer Yağının *Candida Rugosa* Lipazı İle Belirlenen Uygun Koşullarda Hidroliz Reaksiyonundan Elde Edilen hidroliz ürünününün TG, DG, MG Bileşiminin Saptanması

Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile en uygun koşullardaki (pH 5.0, T=35°C, yağ:tampon çözelti, 12g:18ml) hidroliz reaksiyonunda elde edilen ürünün TG, DG, MG ve YA bileşiminin saptanması için bölüm 5.8'de anlatılan yöntem kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo5.21 ve Şekil 5.8'de verilmiştir.

Tablo 5.21. Morina karaciğer yağının belirlenen uygun koşullardaki enzimatik hidroliz ürününün TG, DG, MG ve YA bileşimi.

Reaksiyon süresi (saat)	% Bileşim (ağırlıkça)			
	TG	DG	MG	YA
1	75,5	14,0	0,6	9,9
2	65,3	18,8	0,9	15,0
3	53,4	20,9	4,1	21,6
6	38,3	21,8	3,4	36,5
9	33,9	22,5	3,8	39,8
12	31,8	23,0	5,0	40,3
24	29,7	23,4	6,4	40,5



Şekil 5.8. Morina karaciğer yağının belirlenen uygun koşullardaki Enzimatik hidroliz ürününün TG, DG, MG ve YA bileşiminin zamanla değişimi.

Hidroliz ürünündeki TG, DG, MG ve YA bileşiminin zamanla değişiminin kıyaslamalı olarak verildiği Şekil 5.8 incelendiğinde Reaksiyon boyunca TG miktarı azalırken DG ve YA'da artış olduğu görülmüştür. MG miktarında ise oldukça az miktarda bir artış sağlanabilmiştir. 24 saat sonunda hidroliz ürününün TG : DG: MG : YA oranının sırası ile 29,70 : 23,40 : 6,40 : 40,50 olduğu görülmüştür.

5.10.7. Morina Karaciğer Yağından Belirlenen Uygun Koşullarda Enzimatik Olarak Üretilen hidroliz ürününün Fraksiyonlarına Ayrılması ve Her Fraksiyonun Yağ Asitleri Bileşiminin Saptanması

Morina karaciğer yağı *Candida rugosa* lipazı ile pH 5.0, T=35°C, yağ:tampon çözelti, 12g:18ml oranında 24 saat süre ile hidroliz edilmiş ve elde edilen hidroliz ürünü Bölüm 5.9'da anlatıldığı şekilde trigliserid, digliserid, monogliserid ve yağ asidi fraksiyonlarına ayrılmıştır. Bu fraksiyonların yağ asitleri metil esterlerine dönüştürülerek %bileşimleri bulunmak üzere gaz kromatografisi cihazı ile Bölüm 5.7'de anlatıldığı gibi analiz edilmiştir. TG, DG, MG ve YA fraksiyonlarının yağ asidi bileşimleri Tablo 5.22, Tablo 5.23 ve Tablo 5.25'de görülmektedir.

Tablo 5.22 Morina karaciğer yağı Enzimatik hidroliz ürününün 1. saatteki TG, DG, MG ve YA bileşenlerinin yağ asitleri bileşimi.

Yağ Asidi	% Bileşim			
	TG	DG	MG	YA
14:00	8,34	8,81	13,88	14,05
15:00	0,38	0,59	-	-
16:00	21,8	23,72	27	27,82
16:1 n-7	3,08	3,22	6,02	6,27
16:4 n-1	1,16	1,62	-	2,25
18:00	2,3	2,26	4,56	4,72
18:1 n-9	10,8	9,55	15,48	12,24
18:1 n-7	1,89	1,65	2,54	2,68
18:2 n-6	5,89	7,89	5,82	4,22
18:3 n-3	1,18	1,02	0,69	3,07
18:4 n-3	1,17	0,99	-	-
20:1 n-9	6,89	6,56	-	-
20:1 n-7	0,36	0,34	0,52	0,56
20:5 n-3	7,54	7,2	6,66	4,6
20:4 n-6	2,25	2,01	1,98	1,87
20:3- n-3	0,09	0,11	-	0,29
20:4 n-3	4,21	3,57	3,44	1,88
22:1 n-11	8,02	6,89	0,97	6,58
22:1 n-9	0,9	0,78	-	-
22:6 n-3	11,75	11,22	10,44	6,9
Doymuş yağ asitleri	32,82	35,38	45,44	46,59
Mono doymamış yağ asitleri	31,94	28,99	25,53	28,33
Didoymamış yağ asitlei	5,89	7,89	5,82	4,22
Poli doymamış yağ asitleri	29,35	27,74	23,21	20,86
DHA	11,75	11,22	10,44	6,9

Morina Karaciğer yağı enzimatik hidrolizinde 1. saat sonunda alınan numunenin fraksiyonlanması sonucu TG, DG, MG ve YA içerisindeki % DHA miktarının sırası ile %11,75, %11,22, %10,44 ve % 6,9 olduğu görülmüştür.

Tablo 5.23 Morina karaciğer yağı Enzimatik hidroliz ürününün 12. saatteki TG, DG, MG ve YA bileşenlerinin yağ asitleri bileşimi.

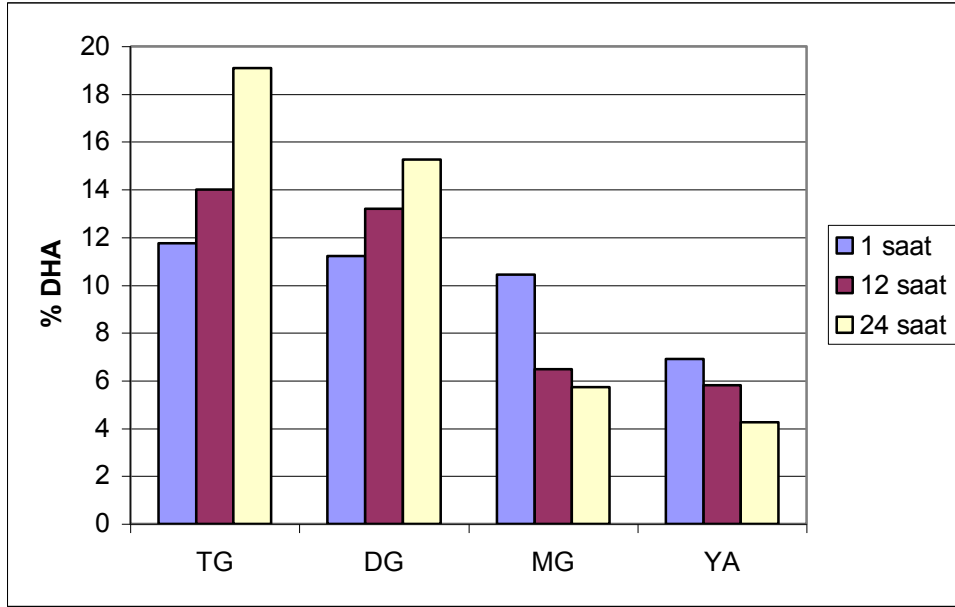
Yağ Asidi	% Bileşim			
	TG	DG	MG	YA
14:00	7,9	8,03	11,14	12,85
15:00	0,32	0,48	0,36	0,49
16:00	17	20	25,96	28,32
16:1 n-7	3,09	4,11	6,79	6,01
16:4 n-1	1,21	1,6	0,98	1,89
18:00	2,28	2,2	4,48	4,61
18:1 n-9	9,6	9,42	14,96	12
18:1 n-7	1,65	1,42	2,24	2,56
18:2 n-6	6,02	7,24	4,36	4,01
18:3 n-3	1,99	1,01	1	2,27
18:4 n-3	1,65	1,23	1,46	1,39
20:1 n-9	6,46	7,25	3,32	3,34
20:1 n-7	0,2	0,24	0,48	0,52
20:5 n-3	10,06	9,08	6,44	4,01
20:4 n-6	3,36	2,21	1,65	1,52
20:3- n-3	0	0,05	0,16	0,24
20:4 n-3	4,89	3,2	3,58	1,95
22:1 n-11	7,2	7,03	3,97	5,89
22:1 n-9	1,12	1	0,18	0,32
22:6 n-3	14	13,2	6,49	5,81
Doymuş yağ asitleri	27,5	30,71	41,94	46,27
Mono doymamış yağ asitleri	29,32	30,47	31,94	30,64
Didoymamış yağ asitlei	6,02	7,24	4,36	4,01
Poli doymamış yağ asitleri	37,16	31,58	21,76	19,08
DHA	14	13,2	6,49	5,81

Hidroliz reaksiyonunun 12. saati sonunda alınan ürününün fraksiyonlanması ve bu fraksiyonların gaz kromatografide çalışılması ile elde edilen % yağ asitleri bileşiminin incelenmesi sonucu DHA'in TG ve DG fraksiyonları içindeki yüzdesi artarken , MG ve YA içinde azaldığı görülmüştür. 12 saat sonunda elde edilen ürünün TG, DG, MG ve YA fraksiyonları içindeki % DHA değerleri sırası ile %14,0 : %13,2 : %6,49 : %5,81 olarak bulunmuştur.

Tablo 5.24 Morina karaciğer yağı Enzimatik hidroliz ürününün 24. saatteki TG, DG, MG ve YA bileşenlerinin yağ asitleri bileşimi.

Yağ Asidi	% Bileşim			
	TG	DG	MG	YA
14:00	6,6	7,79	11,14	12,85
15:00	0,32	0,48	0,36	0,49
16:00	14,92	20,21	28	30
16:1 n-7	4,09	4,11	6,79	6,01
16:4 n-1	2,21	1,55	0,98	1,89
18:00	2,28	2,2	4,48	4,61
18:1 n-9	9,2	8,51	15,03	12,19
18:1 n-7	1,65	1,42	2,12	2,56
18:2 n-6	6,02	6,56	4,36	4,01
18:3 n-3	1,99	1,01	1	2,27
18:4 n-3	1,65	1,23	1,46	1,39
20:1 n-9	5,18	7,25	3,32	3,34
20:1 n-7	0,2	0,24	0,68	0,71
20:5 n-3	11,38	9,2	5,02	3,5
20:4 n-6	3,36	2,21	1,65	1,52
20:3- n-3	0	0,05	0,16	0,24
20:4 n-3	4,89	3,2	3,58	1,95
22:1 n-11	3,84	6,52	3,97	5,89
22:1 n-9	1,12	1	0,18	0,32
22:6 n-3	19,1	15,26	5,72	4,26
Doymuş yağ asitleri	24,12	30,68	43,98	47,95
Tekli doymamış yağ asitleri	25,28	29,05	32,09	31,02
Çiftli doymamış yağ asitlei	6,02	6,56	4,36	4,01
Çoklu doymamış yağ asitleri	44,58	33,71	19,57	17,02
DHA	19,1	15,26	5,72	4,26

24 saat sonunda DHA bakımından en zengin fraksiyonun TG olduğu görülmüştür. TG, DG, MG ve YA fraksiyonlarında % DHA miktarları sırası ile %19,1, %15,26, %5,72 ve %4,26 olarak bulunmuştur.



Şekil 5.9 Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde TG, DG, MG ve YA fraksiyonları içinde DHA zenginleşmesinin zamana göre değişimi.

Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile enzimatik hidrolizi sonucu 1., 12. ve 24. saatlerdeki TG, DG, MG ve YA fraksiyonlarının % DHA bileşimi şekil 5.8’de karşılaştırmalı olarak incelendiğinde DHA bakımından en yüksek zenginleşmenin hidrolize olmayan Trigliserid fraksiyonunda olduğu anlaşılmıştır. Orijinal Morina karaciğer yağında % 10,72 olan DHA miktarı Hidrolize olmayan TG fraksiyonunda %19,1’e yükselmiş ve %78’lik bir artış sağlanmıştır. Aynı fraksiyonda orijinal yağa göre polidoymamış yağ asitlerinde de en yüksek artış sağlanmış ve orijinal yağda %29,27 olan bu değer 44,58’e yükselmiştir.

DG fraksiyonunda da DHA zenginleştirilmesi yapılabilmiş ve DHA miktarı 1. saatte %11,22 iken 24 saat sonunda %15,26’ya yükselmiştir. MG fraksiyonunda ise DHA bakımından zenginleştirme gerçekleştirilememiş zamanla DHA ve polidoymamış yağ asitleri içeriği azalmıştır.

6.SONUÇLAR VE YORUMLAR

Bu çalışmada Sanofi Synthelabo firması tarafından SIRH SA'dan (Fransa) temin edilen ve soğuksu balığı olan Morina balığının karaciğer yağının enzimatik hidroliz ile DHA bakımından zenginleştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaların başında ilk olarak orijinal balık yağının yağ asitleri bileşimi belirlenmiş ve sonuçlar tablo 5.4'de verilmiştir. Orijinal balık yağında DHA miktarı %10,72 olarak bulunmuştur. Ayrıca EPA ve toplam çoklu doymamış yağ asidi miktarının da sırası ile %7,28 ve % 29,27 olduğu görülmüştür.

Morina karaciğer yağının enzimatik hidrolizinde *Candida rugosa* lipazı daha önce denenmediği için, enzim miktarı ve reaksiyon süresinin yanı sıra ortam pH'ı , sıcaklık ve karıştırma hızının hidroliz reaksiyonuna etkileri sistematik olarak incelenmiş bu yağdan DHA bakımından zengin ürün eldesi için gerekli uygun koşullar saptanmaya çalışılmıştır.

Enzim miktarı ve reaksiyon süresinin hidroliz reaksiyonuna etkileri 1.seri denemelerde incelenmiştir. Çalışmanın bu bölümünde 400U/g_{yağ} ile 10.000U/g_{yağ} arasında değişen enzim miktarları kullanılarak pH7.0 ve 35⁰C koşullarında 600devir/dakika karıştırma hızı ile denemeler yapılmıştır. Bu deneylerden elde edilen sonuçlar Tablo 5.5, Tablo 5.6, Tablo 5.7, Tablo 5.8 ve Tablo 5.9'da verilmiştir. 48 saat sürdürülen reaksiyonlar sonucu elde edilen ürünlerdeki % DHA bileşimleri 400U/g_{yağ}, 1000U/g_{yağ}, 2000U/g_{yağ}, 5000U/g_{yağ} ve 10.000U/g_{yağ} enzim kullanımında sırası ile %13,0, %15,83, %16,61, %17,65 ve %22,98 olarak bulunmuş ve orijinal yağla kıyaslandığında sırası ile 1,21, 1,48, 1,55, 1,65 ve 2,14 kat artış olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar incelendiğinde enzim miktarının 400U/g_{yağ}, 'dan 1000U/g_{yağ}, 'a yükseltilmesi ile DHA miktarında belirgin bir artış olduğu ancak enzim miktarının 10.000U/g_{yağ} gibi yüksek bir değere çıkarılması ile artışın aynı oranda devam etmediği görülmüştür. Bunun sebebinin ortamda yeteri kadar substrat bulunmaması yada enzimin kendi kendini parçalaması olduğu söylenebilir. Amacımız DHA bakımından zengin ürün elde etmek olduğundan ve 400U/g_{yağ} kullanılarak yapılan denemelerde de yeterince iyi zenginleştirme yapılamadığından

dolayı enzim denemelerinde 400U/g_{yağ}'ın altına inilmemiştir. Amacımız ekonomik boyutu da göz önünde bulundurarak en uygun koşulları bulmak olduğu için, arada çok büyük farklılıkların bulunmaması sebebi ile 5000 U/g_{yağ} ve 10.000 U/g_{yağ} gibi yüksek enzim miktarlarının kullanımı tercih edilmemiştir. 1000 ve 2000 U/g_{yağ} enzim kullanımında hidroliz reaksiyonu süresince DHA miktarında meydana gelen değişimler incelenmiş ve 2000 U/g_{yağ} enzim kullanımı ile 12 saat sonunda orijinal yağa göre 1,36 kat artış görülürken 1000 U/g_{yağ} enzim kullanımı ile 24 saat sonunda benzer bir artış ile DHA miktarının 1,35 kata ulaştığı anlaşılmıştır.

Farklı enzim miktarları kullanılarak pH7.0 ve 35⁰C koşullarında yürütülen bu deneylerde reaksiyon süresi ile % hidroliz miktarının değişimi de incelenmiştir. % Hidroliz değerleri tablo 5.10'da verilmiştir. % Hidroliz miktarı 1000 U/g_{yağ} enzim kullanımı ile 24. saatte %79,97'ye ulaşmış ve fazla bir yükselme göstermeden 48 saat sonunda %80,56 olduğu görülmüştür. Sürenin 48 saate uzatılması durumunda % hidroliz miktarında ve % DHA miktarında dikkate değer bir artış olmadığı görülmüş ve sürenin 48 saate uzatılmasının gerekli olmadığı anlaşılmıştır.

Candida rugosa lipazı ile yürütülen birinci seri denemeler sonucunda morina karaciğer yağının hidroliz denemelerinin diğer parametrelerinin incelenmesine 1000U/g_{yağ} enzim kullanılarak 24 saatlik reaksiyon süresi ile devam edilmesinin uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Morina Karaciğer yağının hidrolizinde 2.seri denemelerde ortam pH'ının hidroliz reaksiyonuna etkileri araştırılmış ve bu amaçla pH3.0, pH5.0, pH7.0, pH8.0 ve pH9.0'da çalışmalar yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde *Candida rugosa* lipazının pH5.0 – pH8.0 aralığında çalıştığı ancak ortamın çok asidik veya çok bazik olması durumunda aktivitesini kaybettiği görülmüştür. Bu çalışmada en yüksek %DHA artışının pH 5.0 ortamında gerçekleştiği ve 24 saat sonunda orijinal yağa göre 1,45 kat artış olduğu görülmüştür. Enzimin bu pH'ta daha iyi çalıştığı düşünülerek en uygun pH olarak deney serilerinin geri kalanına pH5.0'te devam edilmiştir.

Sıcaklığın enzimatik hidroliz reaksiyonuna etkileri 3.seri deneylerde incelenmiştir. Lipazımızın aktivite gösterdiği ve inaktif olduğu sıcaklıkları belirleyebilmek için 30⁰C – 65⁰C gibi geniş bir aralıkta çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde lipazın 30⁰C – 50⁰C aralığında çalıştığı ancak 65⁰C'de inaktive olduğu görülmüştür.

Lipazın en iyi aktivite gösterdiği sıcaklığın orijinal yağa göre 1,45 kat artışın elde edildiği 35°C olduğuna karar verilmiştir.

Morina karaciğer yağının *Candida rugosa* lipazı ile enzimatik hidrolizi için gereken en uygun koşullar 1000 U/g_{yağ} enzim, pH5.0 ve 35°C olarak belirlendikten sonra bu koşullarda gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonundan elde edilen ürünün TG:DG:MG:YA içeriği HPLC metodu ile saptanmıştır. 24 saat sonunda elde edilen TG : DG : MG : YA değerleri ise sırası ile %29,70: %23,40 : %6,40 : %40,50 olarak belirlenmiştir. Hidroliz reaksiyonundan elde edilen ürün önce TG, DG, MG ve YA fraksiyonlarına ayrılmış daha sonra elde edilen bu fraksiyonlar gaz kromatografisi ile analiz edilerek Yağ asitleri bileşimi bulunmuştur. 24 saat sonunda % DHA miktarlarının TG, DG, MG ve YA fraksiyonlarında sırası ile %19,1, %15,26, %5,72 ve %4,26 olduğu görülmüştür. Bu sonuçların incelenmesi ile DHA'nın özellikle TG ve DG fraksiyonlarında arttığı anlaşılmıştır. Orijinal morina karaciğer yağında % 10,72 olan DHA miktarı Hidrolize olmayan TG fraksiyonunda %19,1'e yükselmiş ve böylece %78'lik bir artış sağlanmıştır. Aynı fraksiyonda orijinal yağa göre çoklu doymamış yağ asitlerinde de en yüksek artış sağlanmış ve orijinal yağda %29,27 olan bu değer %44,58'e yükselmiştir. 24 saat sonunda % Hidroliz miktarının %83,12'ye ulaşmasına rağmen hidroliz ürününde yüksek oranda DHA içeren TG'lerin varlığının literatürde de [92] belirtildiği gibi DHA içeren TG'lerin diğerlerine göre çok zor hidrolize olması ile açıklanabilir. DG fraksiyonunda da DHA zenginleştirilmesi yapılabilmiş ve DHA miktarı 1. saat sonunda %11,22 iken 24 saat sonunda %15,26'ya yükselmiştir. MG fraksiyonunda ise DHA bakımından zenginleştirme gerçekleştirilememiştir.

Çalışmanın son bölümünde karıştırma hızının hidroliz reaksiyonuna etkileri incelenmiştir. 600 devir/dakika karıştırma hızı ile belirlenen en uygun koşullarda orijinal balık yağına göre 1,45 kat DHA artışı elde edilirken karıştırma hızı 200 devir/dakikaya düşürüldüğünde şekil 5.6'da da görüldüğü gibi hidroliz reaksiyonu daha yavaş ilerlemiş ve 24 saat sonunda 1.40 kat artış elde edilmiştir. Literatürde de benzer çalışmalar yapılmış ve karıştırma hızı arttıkça yağ ile enzim çözeltisinin iyice karışmasının sağlanmasından dolayı reaksiyon hızının da arttığı belirtilmiştir [93].

Sonuçları literatürdeki örnekleri ile karşılaştırdığımızda *Candida rugosa* Lipazının Morina Karaciğer Yağı üzerinde etkili olduğu ve bu yöntemin balık yağlarından DHA bakımından zengin gliserid karışımı eldesinde verimli olduğu söylenebilir. Bu

Çalışmanın devamı olarak yağ:tampon çözelti oranı ve tampon çözelti türü değiştirilerek bu değişimlerin enzim miktarı ve reaksiyon süresi üzerine etkileri incelenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Solomons, T.W. Grahan**, 1992, Organic Chemistry, pp. 1045, John Wiley and Sons, Florida.
- [2] www.healthnotes.com
- [3] **Anderson, J. and Deskins, B.**, 1995, The Nutrition Bible, William Marrow, New York.
- [4] **Willtenberg, M.M.**, 1995, The Comprehensive Food and Nutrition Resource, Crossing Pres, CA.
- [5] **Wills, J.**, 1998. Food Bible, Simon and Schuster, New York.
- [6] www.Omega-3information service.com
- [7] www.jefa.ca/pdf/prome-an.pdf
- [8] www.netrion.com/cgi/foods.cgi
- [9] www.vegansociety.com
- [10] www.infonto vision.com
- [11] www.omega-3info.com
- [12] www.acsh.org
- [13] www.cyberlipid.org
- [14] **Güvenilir, A.Y. ve Karakaş, S.**, 2003, Isırgan otu toprak altı ve toprak üstü kısımlarında ısırgan otu ekstraktının eldesi ve özelliklerinin incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [15] **Schomburg, G.**, 1974, Gas chromatography, A practice course, VCH Pub.Inc., NY.
- [16] **Stock, R. And Rice C.B.F.**, 1974, Chromatographic methods, John Willey and Sons Inc., NY.
- [17] **Gündüz, T.**, 1992, İncrumental analiz, Bilge yayıncılık, Ankara.
- [18] **Holman, R.T. and Lunderberg, W.O. and Malkin, T.** Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids, Pergament Pres, Oxford, Vol 5
- [19] **Swern, D.**, 1979, Bailey's Industrial Oil and Faty Products, Vol 1, Fourt ed. , pp 442-453, John Willey and Sons,
- [20] **Üstün, G. ve Arer, G.**, 1995, Hamsi yağından n-3 polidoymamış yağ asitlerinin enzimatik üretimi, Yüksek lisans tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [21] **Dyeberg, J. and Bang, H.O.**, 1979, Hemostatic function and platelet polyunsaturated faty acids in eskimos, Lancet, pp. 433-435.
- [22] **Leaf, A. and Webwe, P.C.**, 1988, Cardiovascular effects of n-3 faty acids, J.Med., New England, pp. 318:549.
- [23] **Hearn, T.L. and Sgoutas, S.A. and Hearn, J.A. and Sgoutas, D.S.**, 1987, Polyunsaturated fatty acids and fat in fish flesh selecting species for healty benefits, J.Food Science, **52**, pp.1209.
- [24] **Wang, Y.J. and Miller, L.A. and Peren, M. and Addis, P.B.**, 1990, Omega-3 fatty acids in lake superior fish, J.Food Science, **55**, pp.71.
- [25] www.vitaminuk.com

- [26] **Smith W. and Mitchell, P. and Leeder S.R.**, 2000, Dietary fat and fish intake and age-related maculopathy, *Arch Ophthalmol*, **118**, pp.401-404
- [27] **Australian National University**, National centre for epidemiology and population health, Australian capital territory.
- [28] **Charnock, J.S.**, October 1999, Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids And Ventricular Fibrillation, The Possible Involvement Of Eicosanoids.
- [29] **Axelrod, L. and Carmuso, J. and Williams, E. and Kleinman, K. and Briones, E. and Schoenfeld D.**, 1994, Effects of a small quantity of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors in NIDDM, Randomized, prospective, double blind, controlled study, *Diabetes care*, **17**, pp. 34-44.
- [30] **Eritsland, J. and Arnesen, H. and Granseth, K. and Fjeld, N.B. and Abdelnoor, M.**, 1996, Effect of dietary supplementation with n-3 fatty acid on coronary artery bypass graft patency, *Am J. Cardiol*, **77**, pp. 31-36
- [31] **Kromhout, D. and Bosschietter, E.B.**, 1985, The inverse relation between fish consumption and 20 year mortality from coronary heart disease, *English Journal Medicine*, **312**, pp. 1205-1209
- [32] **Shekelle, R.B, Missel L. and Paul, O. and Shryock, A.M. and Stamler, J.**, 1985, Fish consumption and mortality from coronary heart disease, *N Eng J Med.*, pp. 313-320.
- [33] **Kromhout, D. and Fesken, EJM, Bowles CH.**, The protective effect of a small amount of fish on coronary heart disease mortality in an elderly population, *Int J Epidemiol*, **24**, pp. 340-345
- [34] **Vollset, S.E., Heuch I, Bjelk E.**, 1985, Fish consumption and mortality from coronary heart disease, *N Eng J Med*, **313**, pp.820-821
- [35] **Curb J.D. and Reed, D.M.**, 1985, Fish consumption and mortality from coronary heart disease, *N Eng J Med*, **313**, pp.821-822
- [36] **Sacks, F.M. and Stone, P.H., and Gibson, C.M., and Silverman, D.I., and Rosner, B., and Pasternak, R.C.**, 1995, Controlled trial of fish oil for regression of human coronary atherosclerosis, *Harp Research Group, J Am Coll Cardiol*, **25**, pp.1492-1498.
- [37] **Siscouick D.S. and Raghunathan, T.E. and King, I. and Weinmann, S. and Wicklund, K.G., et al**, 1995, Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of primary cardiac arrest, *JAMA*, **274**, pp.1363-1367
- [38] **Rache, H.M. and Gibney, M.J.**, January 2000, Effect of Long Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acid on Fasting and Postprandial Triacylglycerol Metabolism, *Am. J Clin Nutrition*, **71**, 2325-2375.
- [39] **Simopoulos, A.P.**, May-Jun 1999, Evolution Aspect of Omega-3 Fatty Acid in The Food Supply Prostaglandins and Essential Fatty Acids, **60**, 421-429.
- [40] www.americanheart.org
- [41] **Weaver, B.J. and Holub, B.J.**, 1988, Health effects and metabolism of dietary eicosapentaenoic acid, progress in food and nutrition science, **12**, pp.111-150
- [42] **Darunton, L.G.**, 1988, Do diets rich in polyunsaturated fatty acids affect disease activity in rheumatoid arthritis, *Annual of rheumatoid disease*, **47**, pp.1697-1972.

- [43] **Nettleton, J.A.**, 1995, Omega-3 fatty acids and health, pp. 354, Chapman and Hall, New York.
- [44] www.oilofpisces.com/hearthealth.html
- [45] **Haris W.S.**, 1989, Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans, *A Critical Review J Lipid*, 30, pp. 785-807.
- [46] www.oilofpisces.com/weightcontrol.html
- [47] **Barber, M.D.**, et al., September 1999, The effect of oral nutritional supplementary enriched with fish oil on weight loss in patients with pancreatic cancer, *British journal of cancer*, **vol 81**, no 1, pp.80-86.
- [48] www.usaweekend.com/index.html
- [49] www.netrition.com/fish-oil-pope.html
- [50] www.hollandandbarrett.com
- [51] www.oilofpisces.com/generalhealtheffects.com
- [52] www.berkeywellness.com
- [53] **Gren, I.J.**, et al., October 1988, Boreal fresh water fish diets modifies the plasma lipids and prostanooids and membrane fatty acids in man, *Lipids*, Vol 23, No 10, pp. 924-929.
- [54] www.veinlase.com/prodcarlson.html
- [55] www.mercola.com/forms/foq.html
- [56] **Holman, R.T. and Lunberg, W.O.**, Progress in the chemistry of fats and other lipids, vol 5, Pergamon press, Oxford.
- [57] **Swern, D.**, 1979, Baileys industry oil and fat products, Vol 1, Fourth edition, John Wiley and sons, pp. 169-184
- [58] www.authentic-breathing.com/more.html
- [59] **Wigmore, S.J.**, et al., January 1996, The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer, *Nutrition*, vol 12, pp.27-30.
- [60] **Cleland, Leslie E.**, February 1992, Ethyl linoleate inhibits EPA incorporation from dietary fish-oil supplement in human subjects, *American journal of clinical nutrition*, **Vol 55**, pp.395-399
- [61] **Hu, F.B.**, et al., 2002, Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women, *Journal of the american medical association*, **vol 287**, April 10, pp.1815-1821.
- [62] www.benbest.com
- [63] **C. Leigh Broadhurst and Yigun Wang and Mihael A. Crawford and Stephen C. Cunnane and John E. Parkinton and Walter, F.**, 2002, Brain specific lipids from marine, lacustrine or terrestrial food resources, potential impact on early Africa hominids, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **131**, pp.659-673
- [64] www.royal_heath.com/dhaproma.html
- [65] **Jurkovski, J.J. and Cave, W.T.**, 1986, Dietary lipid effects on the growth, membrane composition and prolactin binding capacity of rat mammary tumors, *J Natl. Cancer Ins*, **76**, pp. 1223-1229
- [66] **Gabor, H. And Abraham, S.**, 1986, effects of dietary menhaden oil on tumor cell loss and the accumulation of mass of transplantable mammary in mice, *J Natl. Cancer Ins*, **76**, pp.1223-1229
- [67] www.focusnewsletter.org
- [68] www.healthwell.com
- [69] **Hamazaki, T. and Sawazaki, S. and Hamura, M. and Asako, E. et al**, 1996, The effect of docosahexaenoic acid on aggression in young adults.

- A placebo controlled double blind study. *J Clin Invest*, **97**, pp.1129-1133.
- [70] **Birch, E., et al, 1993**, Breast-feeding and optimal visual development. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, **30**, pp.33-38
 - [71] **Horby, J. M., et al.**, Visual activity and erythrocyte docosahexaenoic acid status in breast-fed and formula fed term infant during the first four months of life, *Lipids*, **31**, pp. 99-105
 - [72] **Carlos, S.E. and Werkman, S.H.**, 1996, A randomized trial of visual attention of preterm infants fed docosahexaenoic acid until two months, *Lipids*, **31**, pp.85-90.
 - [73] **Birch, E.E., et al**, 1998, Visual activity and the essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infants, *Pediatr Res.*, **44**, pp.201-209.
 - [74] www.newhope.com/nutritionsscience/news/NSN_backs.html
 - [75] **Barton, H.P. and Gastner, A. and Reddy, B.S. and Rao, C.V. and Scheppach, W. and Dusal, G. and Richter, A.**, 1995, Missing antiproliferative effect of fish oil on rectal epithelium in healthy volunteers consuming a high fat diet, potential role of the n-3:n-6 fatty acid ratio, *Eur J. Cancer*, **31**, pp. 231-237.
 - [76] www.mic_d.com/gallery/polarized/docosahexaenoicacid1.html
 - [77] www.gnc.com/health_notes/supp/DHA.html
 - [78] **Breivik, H. and Gudmundur, G. and Björn, K.**, Preparation of highly purified concentrates of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, *JAOCS*, Vol 74, pp.1425-1429
 - [79] **Bengen, M.F.**, 1940, The story of urea complexes, German patent appl, No:123438.
 - [80] **Wille, H.J. and Traitler, H. and Kelly, M.**, 1987, Production of polyunsaturated fish oil fatty acid by combined urea fraction and industrial scale preparative HPLC, *Rev. Fr. Corps Gras*, **34**, pp. 69-74.
 - [81] **Traitler, H. and Wille, H.J.**, 1992, Isolation of pure fatty acid from fats and oils, *Fett Wiss Tech.*, 5/6-11.
 - [82] **Swern, D.**, Techniques of separation. Urea complex in fatty acids, *Interscience*, , part 3, pp 2309-2358, New York.
 - [83] www.epax.org
 - [84] **Peter, C.K.**, 1999, Temperature and pressure effect on supercritical carbon dioxide extraction of n-3 fatty acids from red seaweed, *Food chemistry*, **65**, pp.399-403.
 - [85] **Eisenbach, W.**, 1984, Supercritical fluid extractions, A film demonstration, *Ber. Bunsenges Phys Chem*, **88**, pp 882-887.
 - [86] **Hidajati, K. and Ching, C.B. and Rao, M.S.**, 1995, Preparative scale liquid chromatographic separation of omega-3 from fish oil sources, *Journal of chromatography A*, volume 702, issue 1-2, 19 May, pp.215-221.
 - [87] **Abe, Y. and Tanaka, M.**, 1984, Concentration of ethyl eicosapentaenoate from Japanese sardine oil by a molecular sieve column, *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **86**(1), pp.8-10.
 - [88] **Stout, V.P. and Nilson, W.B. and Krzynowek, J. and Schlenk, H.**, 1990, Fractionation of fish oils and their fatty acids, In *Fish oils in nutrition*, Van Nostrand Reinhold pub, pp. 73-119, New York.

- [89] **Kreha Chemical Industry Co.Ltd.**, Concentration of eicosapentaenoic acid from fish oils, Jpn. Kokai Tokyo Koho FP 5059,644, 1984, CA 101:71394
- [90] **Latyshev, N.A. and Kasyanov, S.P. and Glushenko, T.V.**, 1990, Process for producing a concentrate of the ethyl esters of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids, USSR, SU1, 518,737, CA 114:8544.
- [91] **Halldorssan, A. and Carlos, D. and Magnusson and Gudmundur and Haraldsson, G.**, 2001, Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols, Tetrahedron letters, 42, pp. 7675-7672.
- [92] **Yukihisa Tanaka and Tadashi Funado and Jiro Hirano and Ran Hashizume**, 1993, Triglyceride specificity of *candida cylindracea* lipase: Effect of docosahexaenoic acid on resistance of triglyceride to lipase, JAOCS, Vol 70, no 10, October 1993, pp.1031-1034.
- [93] **Sun, T. and Pigott G.M. and Herwing R.P.**, 2002, Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids from viscera of farmed atlantic salmon (*salmo salar*), Journal of food science, vol 67, no 1, pp. 130-136
- [94] **Sepponen-laakso, T. And Laakso, I. And Hiltunen, R.**, 2002, Analysis of fatty acids by gas chromatography and its relevance to research on health and nutrition, Analytic Chimica Acta, vol **465**, Issue 1-2, 16 August 2002, pp.39-62.
- [95] **James, A.T. and Martin, A.J.P.**, 1952, Biochem J., 50, pp 679.
- [96] **Robles Mediana, A. and Esterban Gordon, L. and Gimenez, B. et al**, 1999, Lipase catalyzed esterification of glycerol and polyunsaturated fatty acids from fish and microalgae oils, Journal of Biotechnology, Vol 70, Issue 1-3, 30 April 1999, pp. 379-391.
- [97] **Tomatsu Hoshino and Tsuneo Yamane and Shoichi Sitimizu**, 1990, Selective hydrolysis of fish oil by lipase to concentrate n-3 polyunsaturated fatty acids, Agric. Biol. Chem., **54(6)**, pp.1459-1467.
- [98] **Yuji Shimada and Kazuaki Moruyama and Suguru Okazaki and Masaki Nakamura and Akiko Sugihara**, 1994, Enrichment of polyunsaturated fatty acids with *Geotrichum Condidum* lipase, JAOCS, Vol 71, no 9, September 1994, pp. 951-954.
- [99] **Matthew, J. Hills and Irmgard Klewitt and Kumar D. Mukherjee**, 1990, Enzymatic fraction of fatty acids : Enrichment of alpha lineolenic acid and docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed by lipase, JAOCS, vol 67, no 9, september 1990, pp.564.
- [100] **Yukihisa Tanaka and Jiro Hirano and Tadashi Funada**, 1992, Concentration of Docosahexaenoic acid in glyceride by hydrolysis of fish oil with *candida cylindracea* lipase, JAOCS, vol 69, no 12, pp.1210-1214.
- [101] **Yuji Shimado and Akiko Sugihara, Hirofumi Nakano, Takashi Kurumoto, Toshihiro Nagao and Munekazu Genbo and Yoshio Tominaga**, 1997, Purification of docosahexaenoic acid by selective esterification of fatty acids from tuna oil with *Rhizopus delemar* lipase, JAOC, Vol 74, no 2, pp. 97-101.
- [102] **Lie, Ö. And Lambertsen, G.**, 1986, Fatty acid specificity of *candida cylindracea* lipase, Fette Seifen Anstrichmittel, **88**, pp. 365-367.

- [103] **Langhol, Z. And Andersen, P. and Forskov, T. And Schmidtsdorff, W,** 1995 Application of a specificity of mucar miehei lipase to concentrate docosahexaenoic acid, J. Am. Oil Chem. Soc., 72, pp. 239-3.
- [104] **Haraldsson, G.G.,** 1992, Application of lipases in organic lipase catalized reaction synthesis, Chem. Acid. Deriv., 2, pp. 1395-1473.
- [105] **Pedersen, S.B. and Holmer, G.,** 1995, Studies of the fatty acid specificity of the lipase from rhizomucor mihei toward 20:1 n-3, 20:5 n-3, 22:1 n-3 and 22:6 n-3, J. Am. Oil Chem. Soc., 72, pp. 239-3.
- [106] **Maehr, H. and Zenchoff, G. and Coffen, D.L.,** 1994, Enzymic enhancement of n-3 fatty acid content in fish oils, J. Am. Oil Chem. Soc., 71, pp. 463-467.
- [107] **Yuji Shimado and Kazuaki Maruyama and Akiko Sugihara and Shigeru Mariyama and YoshioTominaga,** 1997, Purification of docosahexaenoic acid from tuna oil by a two step enzymatic method: Hydrolysis and selective esterification, JAOCS, Vol 74, no 11, pp. 1441-1446.
- [108] www.genetikbilimi.com/genbilim/enzimler.html
- [109] Swern, D., 1982, Bailey's industry oil and fat product, vol 2, 4.edition, pp. 97-113, John wiley, New York.
- [110] www.isbu.ac.uk/biology/enztech/units.htm
- [111] www.anyvitamins.com
- [112] www.isbu.ac.uk/biology/enztech/nomenclature.html
- [113] **Telefoncu, A.,** 1986, Temel ve uygulamalı enzimoloji, Biyokimya lisans üstü yaz okulu, İzmir.
- [114] **Grayson, M.,** 1980, Kirk-othmer, vol 9, 3. ed., John Wiley, New York.
- [115] www.isbu.ac.uk/biology/enztech/temperature.html
- [116] **Cood, L.W.,** 1972, Material and technology, longman-J.H. De baussy, vol 5, 1. ed, pp. 219-229, Amsterdam.
- [117] **Desnuelle, P.,** 1972, The lipases, The enzymes, Vol 7, 3rd edition, Acedemic pres, pp.575, New York.
- [118] **Okumura, S. and Iwai, M. and Tsujisaka, Y.,** 1976, Positional specificities of four kinds of microbial lipases, Agric. Biol. Chem, 40, pp. 655
- [119] **Shimada, Y. And Sugihara Akiko and Tominaga Yoshio,** 1994, Recombinant microbes for industrial and agricultural applications, Osaka municipal technical research institute, Osaka, Japan.
- [120] **Yamane, T.,** 1987, Enzyme technology for the lipids industry: on engineering overview, J. Am. Oil Chem. Soc., 64, pp.1657.
- [121] **Jones, J.B.,** 1986, Enzymes in organic synthesis, Tetrahedron, 42, pp.3351.
- [122] **Klibanov, A.M.,** 1990, Asymmetric transformations catalized by enziymes in organic solvents, Acc. Chem. Res., 23, pp. 114.
- [123] **Boel, E. and Huge Jensen, B. And Wöldike, H.F. and Gormsen, E.,** 1991, Cloning and expression of industrially important fungal lipases, Lipases : structure, mechanism and Genetic engineering, VCH, Weinheim, p.207.
- [124] **Kötting,J.,Eibl,H.,** 1993,structure and function of phospho lipase A₂, Rev.Physiol. Biochem. Pharmacol., pp.119-294.
- [125] **Kötting,J.,Eibl,H.,** 1993,structure and function of phospho lipase A₂, Rev.Physiol. Biochem. Pharmacol., pp.119-294.

- [126] **Mtibaa, H. and Sayarı, A.,** 2002, Biochemical characterization of *Candida rugosa* lipase, Corp. Gras, Lipides, number 9, volume 1, pp. 49-53.
- [127] **Skoog, D.A. and West, D.M. and Holler, F.J.,** Fundamentals of analytical chemistry, 7th edition, pp.592.
- [128] **Pattison, E.S.,** 1968, Fatty acids and their industrial applications, Marcel dekker inc., New York.
- [129] Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils, AOCS Official Method, Ce 2-66, 1973.
- [130] **Üstün, G. ve Erturhan, A.,** 2001, Menhaden balık yağından enzimatik hidroliz ile polidoymamış yağasitlerinin zenginleştirilmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [131] European Pharmacopeia, published by the directorate for the quality of medicines of the council of Europe (EDQM), ISBN: 92-871-4587-3, 4th Edn., 2002.

EK A

YAG ASİTLERİ KOMPOZISYONU
SAF DHA METİL ESTERİ

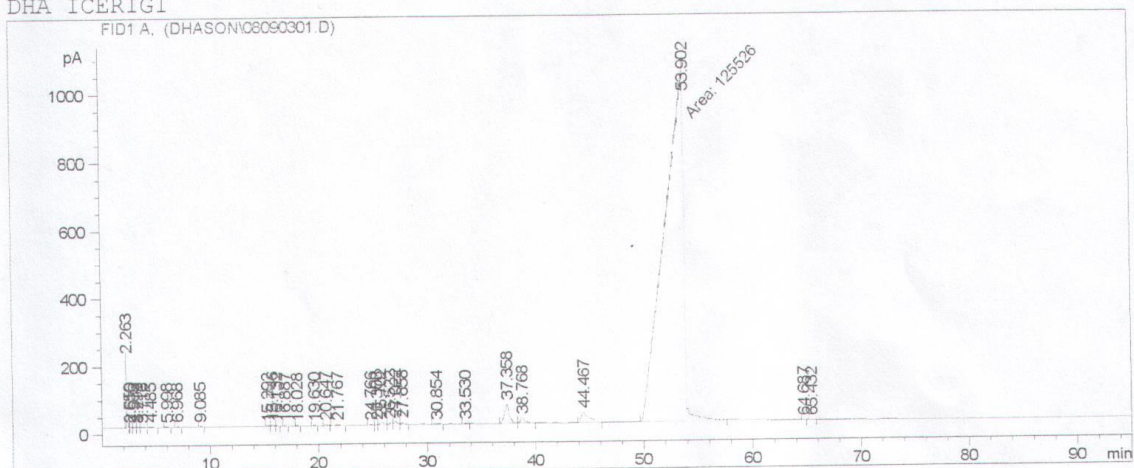
```

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

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

```

DHA ICERİĞİ



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

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

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

Totals : 1.30731e5 1423.08453

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

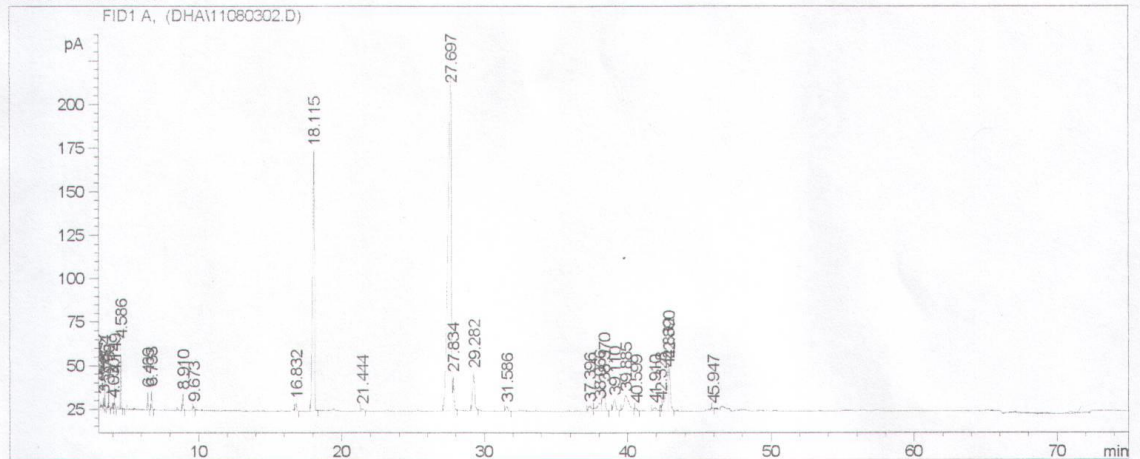
```

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

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

```

DHA ICERIGI



```

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

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

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

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

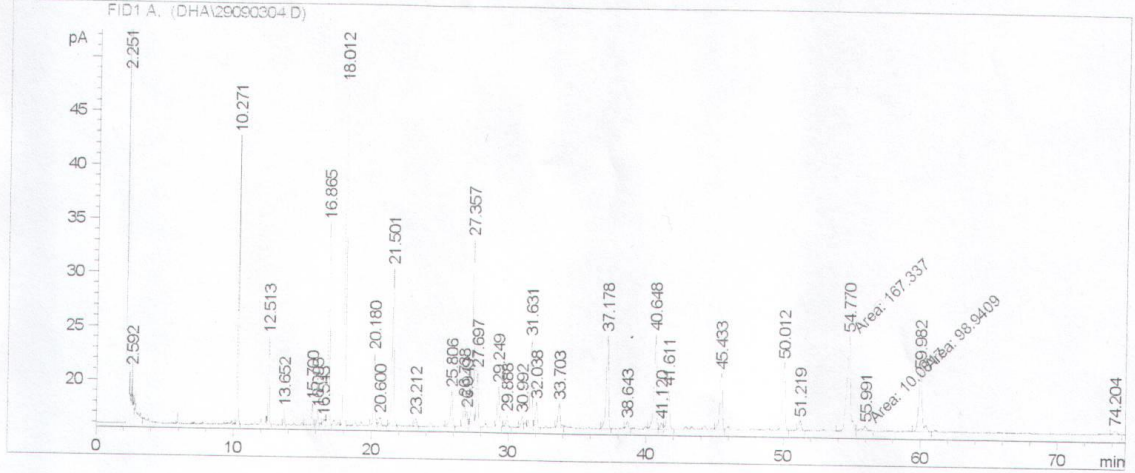
Totals : 9.26764e4 7.95579e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERİ KOMPOZISYONU
ORJİNAL BALIK YAGI 2mcl

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



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

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.251	BB S	0.0355	6.40449e4	4.81438e4	96.88999
2	2.592	BV X	0.0539	12.86498	3.26984	0.01946
3	10.271	VB	0.0732	121.93430	26.73293	0.18447
4	12.513	VB	0.0858	45.88951	8.13669	0.06942
5	13.652	PP	0.0926	8.24924	1.40308	0.01248
6	15.700	VV	0.1135	14.98950	2.04448	0.02268
7	16.095	VV	0.1153	10.18619	1.36104	0.01541
8	16.543	VV	0.1694	6.81976	5.47188e-1	0.01032
9	16.865	VB	0.1151	140.55878	18.81986	0.21264
10	18.012	VB	0.1141	260.47368	35.30859	0.39406
11	20.180	BV	0.1359	57.50918	6.71673	0.08700
12	20.600	VB	0.1658	9.14412	7.97124e-1	0.01383
13	21.501	BB	0.1363	130.85139	14.64308	0.19796
14	23.212	PB	0.1448	6.08330	6.52175e-1	0.00920

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

Totals : 6.61006e4 4.83617e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

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

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

pH:7, 35°C, 400 IU/GYAG,48.SAAT, 2mcl

```
=====
Injection Date   : 02.10.2003 16:29:16
Sample Name      :
Acq. Operator    : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
Vial :           : 1
Inj  :           : 1
Inj Volume : Manually

Method           : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed      : 25.09.2003 12:59:35 by OZLEM SIRIN
DHA ICERIGI
```



Area Percent Report

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

Signal 1: FID1 A,

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

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

Page 1 of 2

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

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

Totals : 1.02720e5 5.06923e4

Results obtained with enhanced integrator!

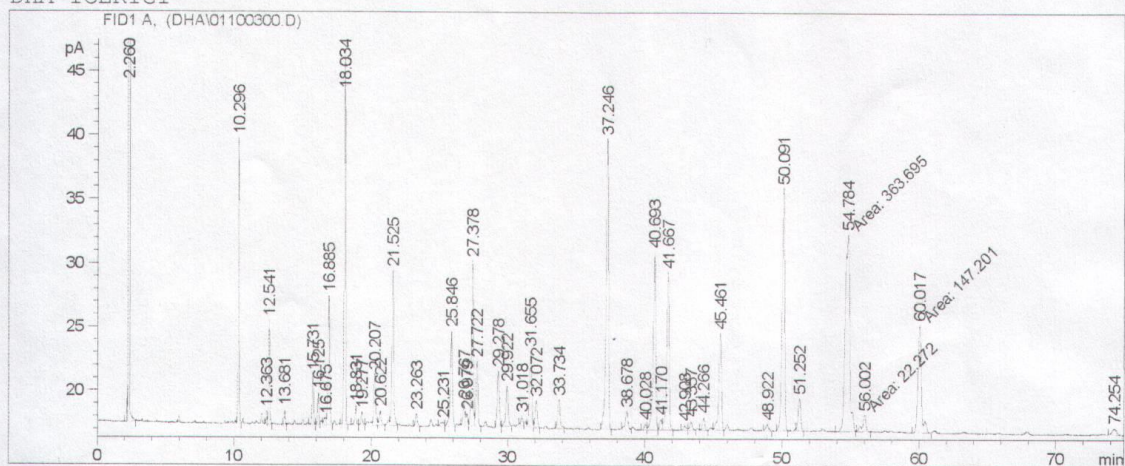
*** End of Report ***

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

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

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

=====
Injection Date : 01.10.2003 09:45:52
Sample Name : Vial : 1
Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 25.09.2003 12:59:35 by OZLEM SIRIN
DHA ICERIGI



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

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

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

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

Page 1 of 2

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

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
15	21.525	VB	0.1336	109.89856	12.13695	0.10308
16	23.263	PP	0.1407	9.38162	9.71419e-1	0.00880
17	25.231	VV	0.2509	5.95720	3.11796e-1	0.00559
18	25.846	VV	0.1639	79.42964	7.48127	0.07450
19	26.767	BV	0.1634	19.58753	1.85114	0.01837
20	26.979	VV	0.1438	9.13735	9.89036e-1	0.00857
21	27.378	VV	0.1595	132.81548	12.96227	0.12458
22	27.722	VB	0.1608	50.90067	5.08375	0.04774
23	29.278	PP	0.1641	44.83495	4.35558	0.04205
24	29.922	VP	0.1699	36.16971	3.15119	0.03393
25	31.018	BV	0.1662	8.87554	7.71766e-1	0.00833
26	31.655	VV	0.1666	66.81633	5.96742	0.06267
27	32.072	VB	0.1640	22.54768	2.12159	0.02115
28	33.734	BB	0.1691	27.44611	2.26981	0.02574
29	37.246	BB	0.1671	278.04544	22.67508	0.26080
30	38.678	BB	0.2116	19.83546	1.41446	0.01861
31	40.028	PV	0.1820	5.06988	4.16542e-1	0.00476
32	40.693	VV	0.1947	179.24466	13.87384	0.16813
33	41.170	VV	0.1819	9.74601	8.01142e-1	0.00914
34	41.667	VB	0.1923	156.11548	12.28176	0.14644
35	42.908	BV	0.2251	5.04306	3.32305e-1	0.00473
36	43.357	VB	0.2037	8.67638	6.49960e-1	0.00814
37	44.266	BP	0.1963	12.05388	9.74453e-1	0.01131
38	45.461	VV	0.2065	102.75777	7.56492	0.09639
39	48.922	BP	0.2050	6.54447	4.74381e-1	0.00614
40	50.091	BB	0.2073	252.00926	18.93194	0.23638
41	51.252	BB	0.1955	32.81361	2.52657	0.03078
42	54.784	MM	0.3932	363.69458	15.41703	0.34114
43	56.002	MM	0.2889	22.27199	1.28478	0.02089
44	60.017	MM	0.2923	147.20132	8.39275	0.13807
45	74.254	PB	0.3124	10.85260	4.71803e-1	0.01018

Totals : 1.06611e5 5.86992e4

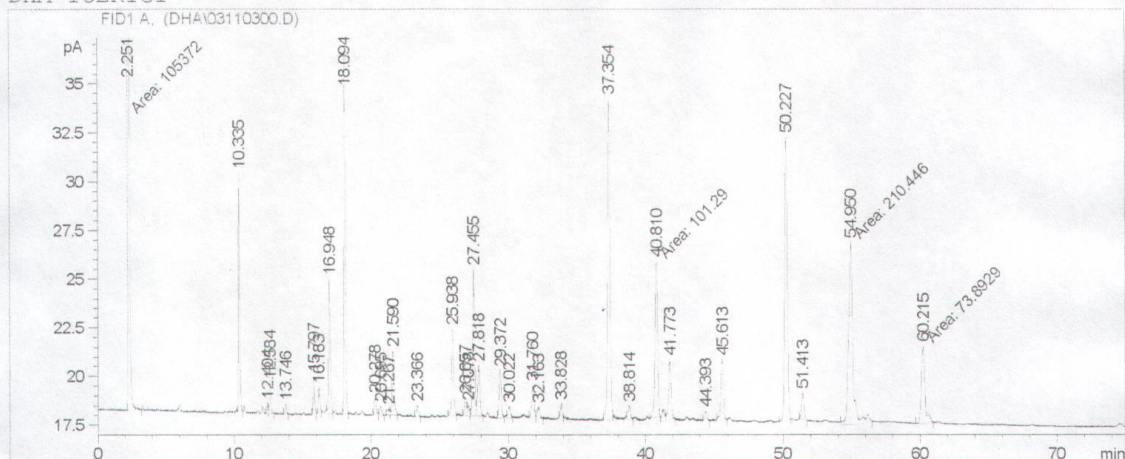
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

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

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



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

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

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

Page 1 of 2

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

Totals : 1.06869e5 7.74500e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

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

Injection Date : 29.09.2003 09:31:24

Sample Name : NUMUNE

Vial : 1

Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

Inj : 1

Inj Volume : Manually

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

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

DHA ICERIGI



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

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

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

Totals : 1.02485e5 6.40925e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

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

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

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

Injection Date : 01.10.2003 09:45:52

Sample Name :

Vial : 1

Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

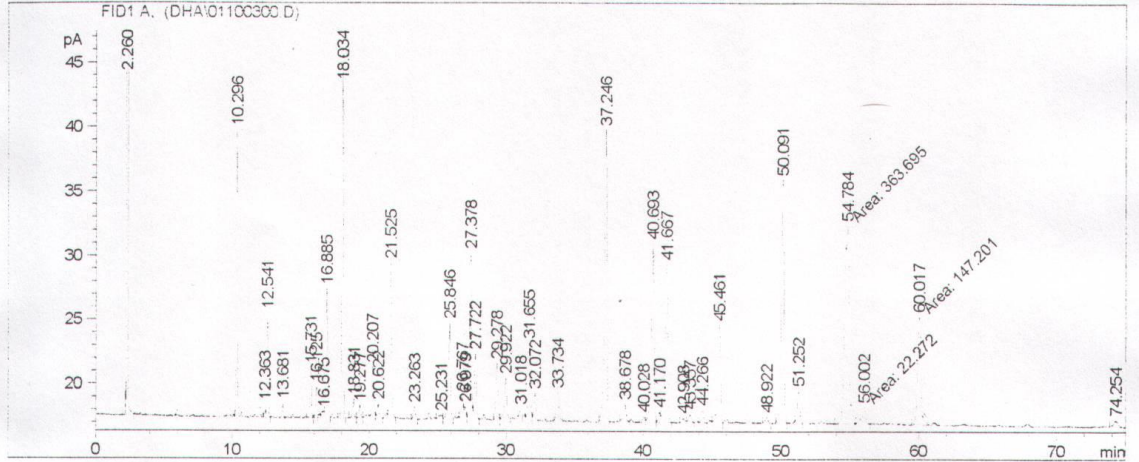
Inj : 1

Inj Volume : Manually

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

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

DHA ICERIGI



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

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

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

Page 1 of 2

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

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
15	21.525	VB	0.1336	109.89856	12.13695	0.10308
16	23.263	PP	0.1407	9.38162	9.71419e-1	0.00880
17	25.231	VV	0.2509	5.95720	3.11796e-1	0.00559
18	25.846	VV	0.1639	79.42964	7.48127	0.07450
19	26.767	BV	0.1634	19.58753	1.85114	0.01837
20	26.979	VV	0.1438	9.13735	9.89036e-1	0.00857
21	27.378	VV	0.1595	132.81548	12.96227	0.12458
22	27.722	VB	0.1608	50.90067	5.08375	0.04774
23	29.278	PP	0.1641	44.83495	4.35558	0.04205
24	29.922	VP	0.1699	36.16971	3.15119	0.03393
25	31.018	BV	0.1662	8.87554	7.71766e-1	0.00833
26	31.655	VV	0.1666	66.81633	5.96742	0.06267
27	32.072	VB	0.1640	22.54768	2.12159	0.02115
28	33.734	BB	0.1691	27.44611	2.26981	0.02574
29	37.246	BB	0.1671	278.04544	22.67508	0.26080
30	38.678	BB	0.2116	19.83546	1.41446	0.01861
31	40.028	PV	0.1820	5.06968	4.16542e-1	0.00476
32	40.693	VV	0.1947	179.24466	13.87384	0.16813
33	41.170	VV	0.1819	9.74601	8.01142e-1	0.00914
34	41.667	VB	0.1923	156.11548	12.28176	0.14644
35	42.908	BV	0.2251	5.04306	3.32305e-1	0.00473
36	43.357	VB	0.2037	8.67638	6.49960e-1	0.00814
37	44.266	BP	0.1963	12.05388	9.74453e-1	0.01131
38	45.461	VV	0.2065	102.75777	7.56492	0.09639
39	48.922	BP	0.2050	6.54447	4.74381e-1	0.00614
40	50.091	BB	0.2073	252.00926	18.93194	0.23638
41	51.252	BB	0.1955	32.81361	2.52657	0.03078
42	54.784	MM	0.3932	363.69458	15.41703	0.34114
43	56.002	MM	0.2889	22.27199	1.28478	0.02089
44	60.017	MM	0.2923	147.20132	8.39275	0.13807
45	74.254	PB	0.3124	10.85260	4.71803e-1	0.01018

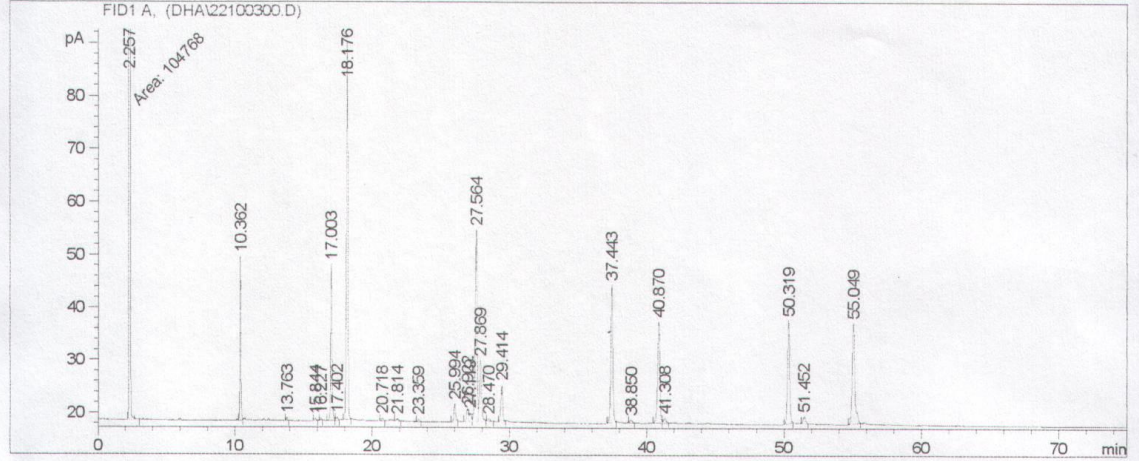
Totals : 1.06611e5 5.86992e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
1000 IU/GYAG, 35°C, pH:3, 24. SAAT, 2 mcl

=====
Injection Date : 22.10.2003 09:29:46
Sample Name : Vial : 1
Acq. Operator : OZLEM SIRIN- TUBA YASAR Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 21.10.2003 12:50:29 by OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
DHA ICERIGI



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

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.257	MM	0.0274	1.04768e5	6.36154e4	97.63242
2	10.362	VB	0.0708	143.79288	31.15759	0.13400
3	13.763	BB	0.0769	3.56090	5.73972e-1	0.00332
4	15.844	BP	0.1000	3.65187	4.48398e-1	0.00340
5	16.227	BB	0.0922	3.18142	4.25538e-1	0.00296
6	17.003	BB	0.1002	208.61179	29.61430	0.19440
7	17.402	BV	0.1198	5.82618	5.92073e-1	0.00543
8	18.176	VB	0.1055	544.04126	72.16449	0.50699
9	20.718	BB	0.1056	4.24167	4.77627e-1	0.00395
10	21.814	BB	0.1360	4.67824	4.10520e-1	0.00436
11	23.359	BB	0.1091	3.64210	4.04453e-1	0.00339
12	25.994	VB	0.1166	30.13902	3.34462	0.02809
13	26.922	BV	0.1187	23.26774	2.36690	0.02168

Instrument 1 22.10.2003 10:49:31 OZLEM SIRIN- TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
14	27.119	VV	0.1224	16.72481	1.63363	0.01559
15	27.564	VV	0.1451	368.59097	36.25179	0.34349
16	27.869	VB	0.1293	118.44170	11.53779	0.11037
17	28.470	BB	0.1385	6.41341	5.48235e-1	0.00598
18	29.414	BB	0.1307	68.99818	6.98958	0.06430
19	37.443	BB	0.1390	256.21512	26.10610	0.23876
20	38.850	BP	0.1270	6.12189	5.73865e-1	0.00570
21	40.870	BV	0.1631	225.84398	19.14257	0.21046
22	41.308	VB	0.1525	10.83768	8.48772e-1	0.01010
23	50.319	BB	0.1526	209.59856	19.53948	0.19532
24	51.452	BP	0.1442	16.24526	1.33784	0.01514
25	55.049	BB	0.1749	257.95026	19.18523	0.24038

Totals : 1.07309e5 6.39010e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

ata File C:\HPCHEM\1\DATA\DHA\21100300.D

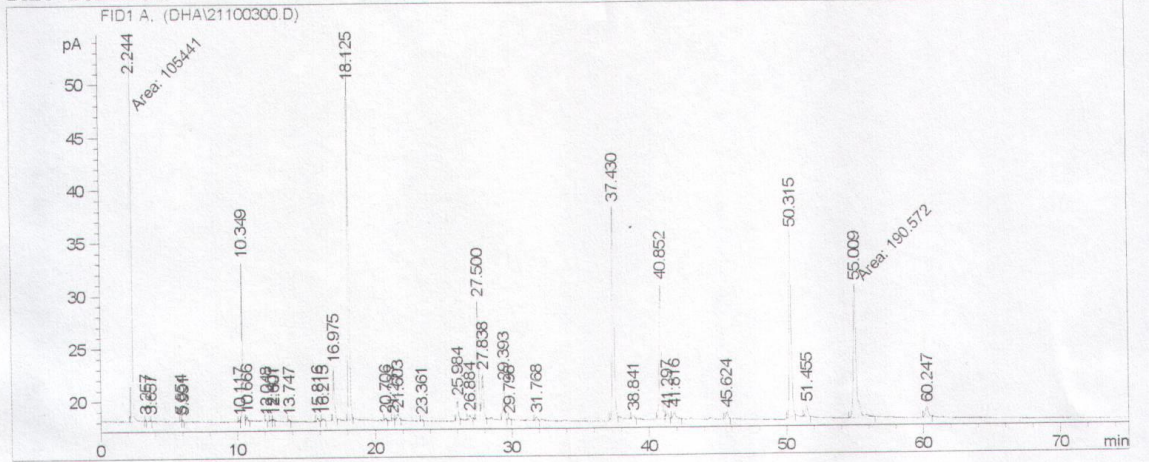
YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

1000 IU/GYAG, 35°C, pH:5, 24. SAAT, 2mcl

```
=====
Injection Date   : 21.10.2003 09:17:56
Sample Name      :
Acq. Operator    : OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
Vial             : 1
Inj              : 1
Inj Volume       : Manually

Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 20.10.2003 12:24:05 by OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 21.10.2003 10:46:21 by OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
                  (modified after loading)
=====
```

DHA ICERIGI



Area Percent Report

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

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.244	MM	0.0274	1.05441e5	6.42199e4	98.73312
2	3.257	BP	0.0341	6.61521e-1	2.79528e-1	0.00062
3	3.657	PP	0.0384	6.17917e-1	2.29829e-1	0.00058
4	5.854	BV	0.0498	6.69671e-1	2.52655e-1	0.00091
5	5.991	VB	0.0604	8.96751e-1	1.92455e-1	0.00084
6	10.117	PP	0.0620	1.05809e-1	2.05725e-1	0.00099
7	10.349	VB	0.0665	67.98116e-1	15.10585e-1	0.06366
8	10.666	BB	0.0823	2.57417e-1	3.83474e-1	0.00241
9	12.048	BB	0.0624	7.83641e-1	1.51310e-1	0.00073
10	12.407	BV	0.0644	1.00051e-1	1.87124e-1	0.00094

Instrument 1 21.10.2003 10:47:02 OZLEM SIRIN- TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
11	12.601	VB	0.0820	1.31131	1.93764e-1	0.00123
12	13.747	BP	0.0750	1.18302	1.90317e-1	0.00111
13	15.816	BB	0.1043	2.75175	3.13710e-1	0.00258
14	16.215	BB	0.1024	2.26364	2.63104e-1	0.00212
15	16.975	BB	0.1077	36.75886	5.00603	0.03442
16	18.125	BB	0.1031	244.80756	35.64228	0.22923
17	20.706	BB	0.0950	1.83011	2.30824e-1	0.00171
18	21.237	BV	0.1044	1.83901	2.12577e-1	0.00172
19	21.603	VB	0.1374	7.73411	6.97299e-1	0.00724
20	23.361	PB	0.1086	1.48060	1.62117e-1	0.00139
21	25.984	BB	0.1223	17.02485	1.87683	0.01594
22	26.884	BB	0.1513	5.09511	3.98051e-1	0.00477
23	27.500	BV	0.1288	100.36202	11.17158	0.09398
24	27.838	VB	0.1413	43.12451	4.20014	0.04038
25	29.393	BB	0.1204	32.14078	3.33479	0.03010
26	29.798	BP	0.0902	1.04523	1.39921e-1	0.00098
27	31.768	BP	0.1241	3.18576	3.05645e-1	0.00298
28	37.430	BB	0.1377	193.88205	20.16672	0.18155
29	38.841	BP	0.1241	3.93886	3.76355e-1	0.00369
30	40.852	BB	0.1571	141.39615	12.77908	0.13240
31	41.297	BB	0.1562	7.46014	5.64475e-1	0.00699
32	41.816	BB	0.1885	10.33929	6.46849e-1	0.00968
33	45.624	BB	0.1430	7.38740	6.20269e-1	0.00692
34	50.315	BB	0.1572	189.32988	17.63718	0.17728
35	51.455	BB	0.1544	12.97481	1.04793	0.01215
36	55.009	MM	0.2503	190.57249	12.69154	0.17845
37	60.247	BB	0.1816	15.18789	9.97498e-1	0.01422

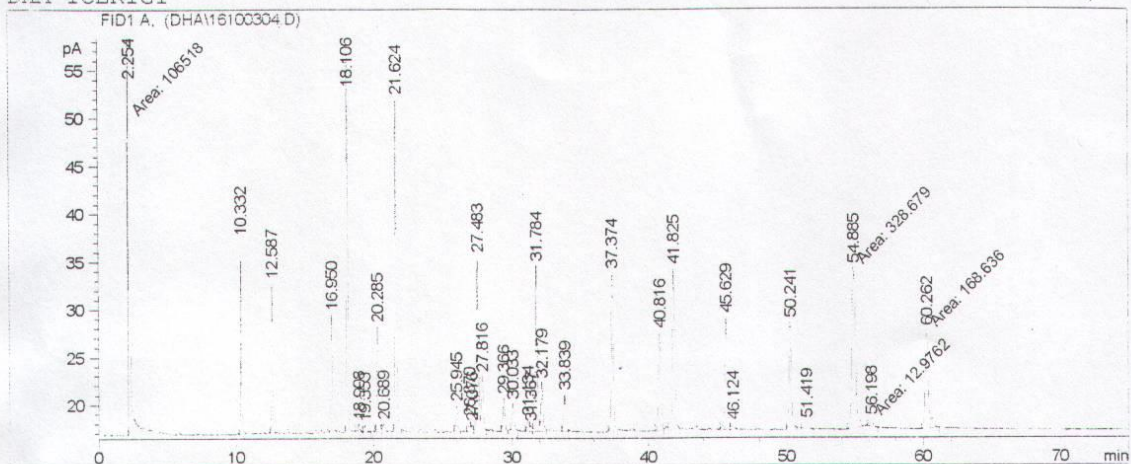
Totals : 1.06794e5 6.43687e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
1000 IU/GYAG, 35°C, PH:8, 24. SAAT, 2 mcl

=====
Injection Date : 16.10.2003 16:06:06
Sample Name : Vial : 1
Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 25.09.2003 12:59:35 by OZLEM SIRIN
DHA ICERIGI



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

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.254	MM	0.0275	1.06518e5	6.44829e4	97.32166
2	10.332	VB	0.0690	92.39330	20.32215	0.08442
3	12.587	VB	0.0874	85.65672	15.77395	0.07826
4	16.950	VB	0.1095	91.08929	12.42357	0.08322
5	18.106	BB	0.1146	293.32458	39.51659	0.26800
6	18.908	BV	0.1485	9.36689	8.77606e-1	0.00856
7	19.353	VB	0.1610	7.69100	6.74620e-1	0.00703
8	20.285	BV	0.1239	90.45128	11.00046	0.08264
9	20.689	VB	0.1766	10.27595	8.29334e-1	0.00939
10	21.624	BB	0.1271	295.36850	34.75652	0.26987
11	25.945	BB	0.1419	26.00253	2.75987	0.02376
12	26.870	BV	0.1488	11.39573	1.17847	0.01041
13	27.076	VV	0.1396	6.27406	6.55952e-1	0.00573
14	27.483	VV	0.1585	179.62704	18.29971	0.16412

Instrument 1 16.10.2003 17:22:38 OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
15	27.816	VB	0.1628	60.78051	5.77671	0.05553
16	29.366	BB	0.1544	35.84533	3.53195	0.03275
17	30.033	BB	0.1634	32.67276	2.99282	0.02985
18	31.134	BV	0.1665	14.00114	1.29098	0.01279
19	31.367	VV	0.1545	6.73507	6.41471e-1	0.00615
20	31.784	VV	0.1605	185.49078	17.38182	0.16948
21	32.179	VB	0.1726	58.79097	5.17360	0.05371
22	33.839	BB	0.1682	42.56853	3.87340	0.03889
23	37.374	BB	0.1606	171.46950	16.59436	0.15666
24	40.816	BV	0.1839	119.66079	10.27525	0.10933
25	41.825	VB	0.1809	198.34851	16.90364	0.18122
26	45.629	BV	0.1889	146.56682	11.79835	0.13391
27	46.124	VB	0.2188	7.56497	5.16864e-1	0.00691
28	50.241	BB	0.1726	128.93665	11.34526	0.11780
29	51.419	BB	0.2397	12.80103	7.63277e-1	0.01170
30	54.885	MM	0.3241	328.67914	16.90254	0.30030
31	56.198	MM	0.2457	12.97617	8.80047e-1	0.01186
32	60.262	MM	0.2726	168.63637	10.31187	0.15408

Totals : 1.09450e5 6.47789e4

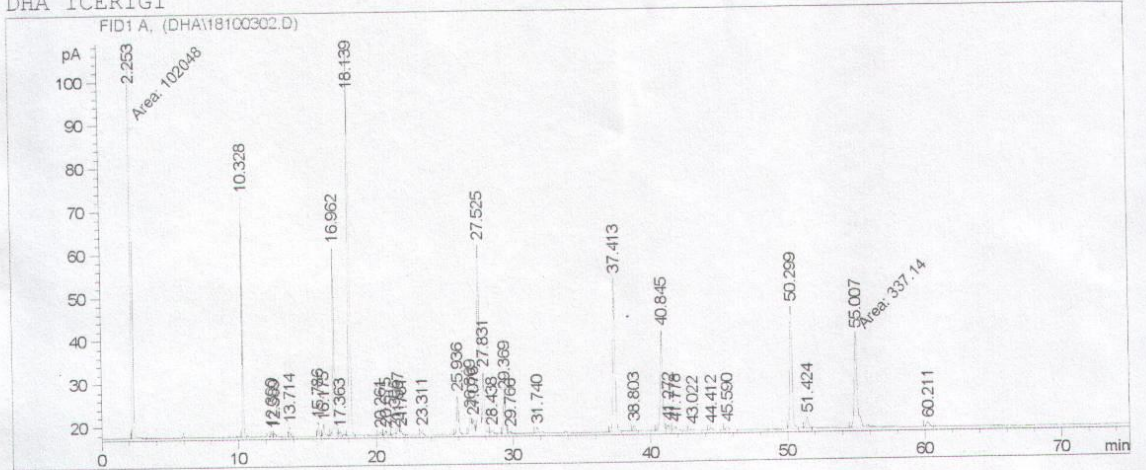
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

ata File C:\HPCHEM\1\DATA\DHA\18100302.D

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
1000 IU7GYAG, 35°C, pH:9, 24. SAAT, 2 mcl

=====
Injection Date : 18.10.2003 12:25:28
Sample Name :
Acq. Operator : OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
Vial : 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 25.09.2003 12:59:35 by OZLEM SIRIN
DHA ICERIGI



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

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.253	MM	0.0274	1.02048e5	6.21852e4	96.28172
2	10.328	VB	0.0785	279.55688	55.77767	0.26376
3	12.390	BV	0.0898	7.39101	1.31011	0.00697
4	12.569	VB	0.1263	8.29666	9.10619e-1	0.00783
5	13.714	BB	0.0933	13.81245	2.32368	0.01303
6	15.786	BB	0.1022	22.74741	3.39268	0.02146
7	16.175	BB	0.1296	24.68654	2.72745	0.02329
8	16.962	BV	0.1206	347.50015	43.75956	0.32786
9	17.363	VV	0.1380	9.76303	1.07503	0.00921
10	18.139	VB	0.1173	713.07855	89.15086	0.67278
11	20.261	PV	0.1338	6.52817	7.78899e-1	0.00616
12	20.675	VB	0.1522	11.40813	1.07122	0.01076
13	21.306	BV	0.1709	6.29720	5.61253e-1	0.00594

Instrument 1 18.10.2003 14:49:48 OZLEM SIRIN- TUBA YASAR

Page 1 of 2

ata File C:\HPCHEM\1\DATA\DHA\18100302.D

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
14	21.567	VV	0.1364	21.87180	2.35465	0.02064
15	21.761	VB	0.1578	10.57557	1.01268	0.00998
16	23.311	PB	0.1410	9.75322	1.08363	0.00920
17	25.936	BB	0.1474	88.79708	8.97477	0.08378
18	26.869	BV	0.1589	53.73362	5.10262	0.05070
19	27.076	VV	0.1463	33.70916	3.43979	0.03180
20	27.525	VV	0.1605	468.52893	43.89756	0.44205
21	27.831	VV	0.1574	149.46725	14.36607	0.14102
22	28.438	VB	0.2004	13.05718	9.26376e-1	0.01232
23	29.369	BV	0.1598	95.58094	9.30426	0.09018
24	29.766	VB	0.2460	7.82851	4.43403e-1	0.00739
25	31.740	PV	0.1672	13.51864	1.23990	0.01275
26	37.413	BB	0.1729	418.89304	35.69477	0.39522
27	38.803	BB	0.1797	14.94339	1.28504	0.01410
28	40.845	VV	0.1889	289.41956	23.30566	0.27306
29	41.272	VV	0.2154	18.18284	1.26704	0.01716
30	41.778	VB	0.2616	17.04265	9.13917e-1	0.01608
31	43.022	BB	0.2453	6.32869	3.74304e-1	0.00597
32	44.412	BB	0.2047	7.42745	5.26097e-1	0.00701
33	45.590	BB	0.2044	11.93877	8.47258e-1	0.01126
34	50.299	BB	0.1786	349.90512	28.63595	0.33013
35	51.424	BB	0.2112	35.49426	2.60093	0.03349
36	55.007	MM	0.2553	337.13986	22.01161	0.31809
37	60.211	BB	0.2373	16.77178	1.05606	0.01582

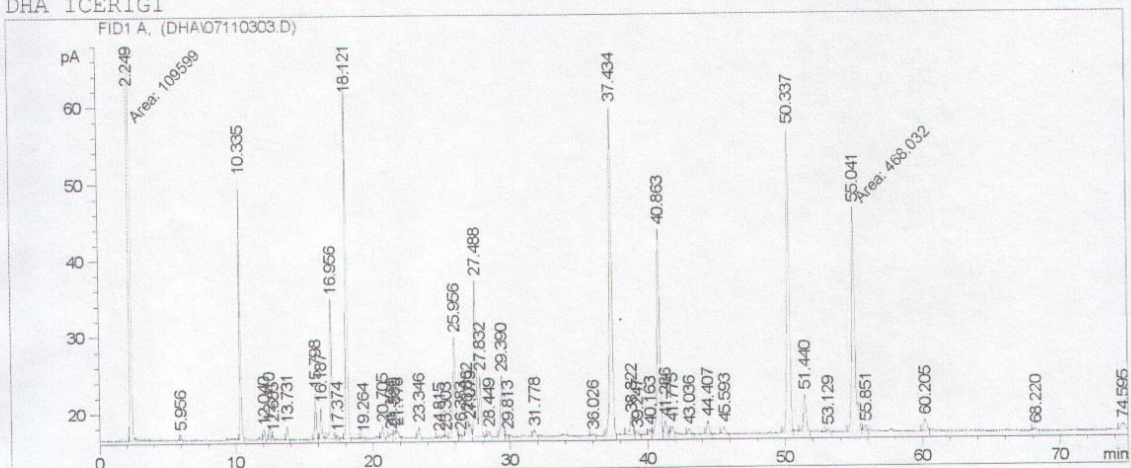
Totals : 1.05989e5 6.25987e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
1000 IU/GYAG, PH:5, 30°C, 24.SAAT, 2mcl

=====
Injection Date : 07.11.2003 14:04:32
Sample Name :
Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
Vial : 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 06.11.2003 15:31:50 by OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
DHA ICERIGI



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

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.249	MM	0.0262	1.09599e5	6.98075e4	96.71174
2	5.956	VB	0.0685	4.01348	7.86746e-1	0.00354
3	10.335	VV	0.0861	197.71249	34.11771	0.17446
4	12.040	BP	0.0889	8.72976	1.37779	0.00770
5	12.410	BV	0.0785	11.04934	1.84029	0.00975
6	12.685	VP	0.0714	3.04068	5.30168e-1	0.00268
7	13.731	BP	0.0926	11.91720	1.70303	0.01052
8	15.798	PV	0.1020	47.24819	6.05772	0.04169
9	16.187	BB	0.1014	33.32539	4.16214	0.02941
10	16.956	PB	0.1267	161.89781	18.21267	0.14286
11	17.374	BV	0.0983	3.96755	4.88172e-1	0.00350
12	18.121	VB	0.1157	407.16409	50.17033	0.35929

Instrument 1 07.11.2003 15:29:04 OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	19.264	PV	0.1500	3.50288	2.76161e-1	0.00309
14	20.705	BV	0.1109	13.92152	1.52689	0.01228
15	21.304	BV	0.1386	6.53180	5.57763e-1	0.00576
16	21.580	VV	0.1175	8.65226	8.92988e-1	0.00763
17	21.778	VB	0.1284	10.15679	9.52159e-1	0.00896
18	23.346	BB	0.1164	14.66502	1.50837	0.01294
19	24.815	PV	0.1151	3.13299	3.23191e-1	0.00276
20	25.303	VV	0.1249	3.30233	3.16112e-1	0.00291
21	25.956	VV	0.1381	143.16241	13.08997	0.12633
22	26.383	VV	0.1175	3.48253	3.51877e-1	0.00307
23	26.862	VV	0.1441	32.01116	2.83705	0.02825
24	27.079	VV	0.1122	15.93303	1.70985	0.01406
25	27.488	VV	0.1339	221.00468	20.39830	0.19502
26	27.832	VB	0.1317	85.46930	7.99638	0.07542
27	28.449	PP	0.1192	6.62121	6.70392e-1	0.00584
28	29.390	BV	0.1281	84.46354	7.90890	0.07453
29	29.813	VV	0.1262	3.77503	3.54475e-1	0.00333
30	31.778	BB	0.1296	8.77390	8.02164e-1	0.00774
31	36.026	BB	0.1267	3.08787	2.89994e-1	0.00272
32	37.434	BB	0.1554	537.80322	43.01924	0.47456
33	38.822	BV	0.1835	36.79484	2.43152	0.03247
34	39.247	VP	0.1781	5.87929	3.90547e-1	0.00519
35	40.163	BV	0.1434	8.08777	6.72276e-1	0.00714
36	40.863	VV	0.1662	358.47482	26.85379	0.31632
37	41.286	VB	0.1525	21.41878	1.70043	0.01890
38	41.775	BV	0.1549	12.98481	1.01747	0.01146
39	43.036	BP	0.1380	8.24709	7.10169e-1	0.00728
40	44.407	BP	0.1545	21.96642	1.73170	0.01938
41	45.593	BP	0.1550	12.10255	9.29080e-1	0.01068
42	50.337	BV	0.1855	541.16193	39.70038	0.47753
43	51.440	BP	0.1717	66.61291	4.89639	0.05878
44	53.129	PP	0.1644	4.67169	3.35524e-1	0.00412
45	55.041	MM	0.2657	468.03244	29.36042	0.41300
46	55.851	BV	0.1637	10.53031	7.59976e-1	0.00929
47	60.205	BV	0.1994	25.04529	1.54301	0.02210
48	68.220	BV	0.2082	5.67665	3.21959e-1	0.00501
49	74.595	BBA	0.2602	19.23951	8.70985e-1	0.01698

Totals : 1.13326e5 7.01470e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

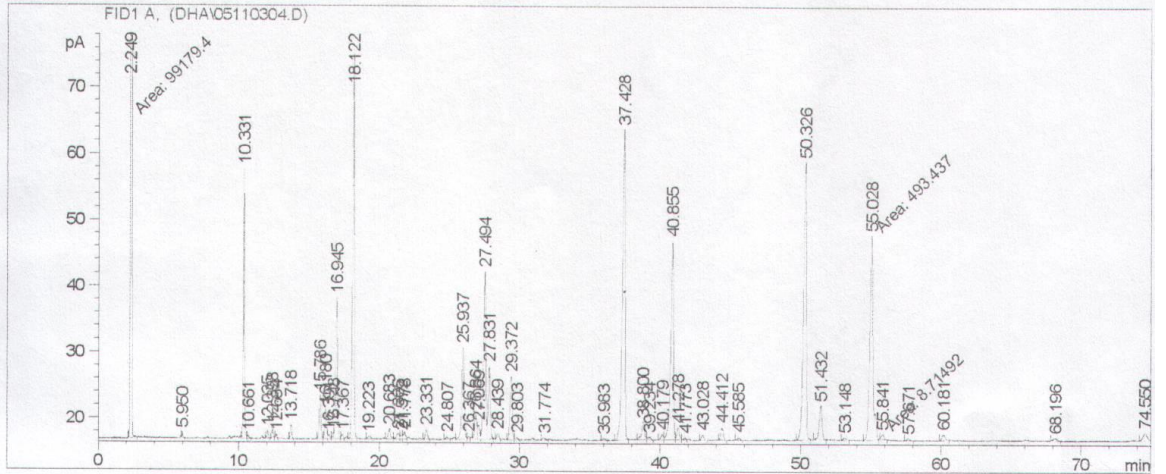
YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

1000 IU/GYAG, 45°C, pH:5, 24.SAAT, 2mcl

```

=====
Injection Date   : 05.11.2003 15:24:14
Sample Name      :
Acq. Operator    : OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
Method           : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 30.10.2003 11:12:30 by OZLEM SIRIN- TUBA YASAR
DHA ICERIGI
Vial : 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually

```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.249	MM	0.0228	9.91794e4	7.24203e4	95.87067
2	5.950	VB	0.0677	4.66344	9.11246e-1	0.00451
3	10.331	VV	0.0844	241.91435	40.95773	0.23384
4	10.661	VP	0.0831	3.71448	5.37401e-1	0.00359
5	12.035	BP	0.0833	8.66758	1.29950	0.00838
6	12.398	BB	0.0876	12.08371	1.84042	0.01168
7	12.684	BP	0.0802	3.61783	5.50138e-1	0.00350
8	13.718	BB	0.0853	15.18585	2.20522	0.01468
9	15.786	BV	0.1177	54.42749	6.70471	0.05261
10	16.180	VV	0.1183	38.87624	4.58853	0.03758
11	16.391	VB	0.0933	4.86842	6.22310e-1	0.00471
12	16.748	BV	0.0709	5.76729	9.76475e-1	0.00557

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	16.945	VB	0.1095	188.04866	21.41019	0.18178
14	17.367	BB	0.0988	5.70605	6.91078e-1	0.00552
15	18.122	VB	0.1117	503.13245	59.76632	0.48635
16	19.223	BP	0.1606	5.44824	4.00677e-1	0.00527
17	20.683	VB	0.1315	16.99139	1.54317	0.01642
18	21.305	BV	0.1536	11.03826	8.52025e-1	0.01067
19	21.572	VV	0.1118	5.29226	5.65140e-1	0.00512
20	21.778	VV	0.1382	11.85608	1.01586	0.01146
21	23.331	BB	0.1246	15.64339	1.50701	0.01512
22	24.807	PP	0.1117	3.20065	3.40389e-1	0.00309
23	25.937	VV	0.1394	158.76727	13.88162	0.15347
24	26.367	VV	0.1105	3.70456	3.98518e-1	0.00358
25	26.864	VV	0.1391	40.94359	3.62848	0.03958
26	27.069	VV	0.1189	21.01898	2.11524	0.02032
27	27.494	VV	0.1421	285.14450	25.37747	0.27563
28	27.831	VB	0.1317	118.63567	11.05886	0.11468
29	28.439	PP	0.1231	8.57761	8.33406e-1	0.00829
30	29.372	BV	0.1321	105.77654	9.63602	0.10225
31	29.803	VB	0.1458	4.18894	3.39856e-1	0.00405
32	31.774	PB	0.1464	4.24812	3.43214e-1	0.00411
33	35.983	PP	0.1417	3.25734	2.71977e-1	0.00315
34	37.428	BB	0.1658	617.32520	46.99357	0.59673
35	38.800	BV	0.1713	37.90755	2.67565	0.03664
36	39.234	VP	0.1622	5.97575	4.35079e-1	0.00578
37	40.179	PV	0.1472	10.00831	8.07133e-1	0.00967
38	40.855	VV	0.1623	400.93369	30.02612	0.38756
39	41.278	VV	0.1454	22.11099	1.79874	0.02137
40	41.773	VV	0.1417	3.30125	2.77619e-1	0.00319
41	43.028	BB	0.1539	9.89851	7.62627e-1	0.00957
42	44.412	BP	0.1477	22.92990	1.85502	0.02216
43	45.585	BB	0.1336	4.49193	3.99700e-1	0.00434
44	50.326	BB	0.1714	594.44971	42.06602	0.57462
45	51.432	BB	0.1659	71.33214	5.18823	0.06895
46	53.148	BP	0.1610	5.16334	3.78901e-1	0.00499
47	55.028	MM	0.2654	493.43713	30.98709	0.47698
48	55.841	MM	0.1984	8.71492	7.31989e-1	0.00842
49	57.671	BP	0.1686	4.17855	2.92683e-1	0.00404
50	60.181	BB	0.1873	13.30846	8.40015e-1	0.01286
51	68.196	BV	0.2266	7.37199	3.83832e-1	0.00713
52	74.550	BBA	0.2722	24.60097	1.06997	0.02378

Totals : 1.03451e5 7.28054e4

Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

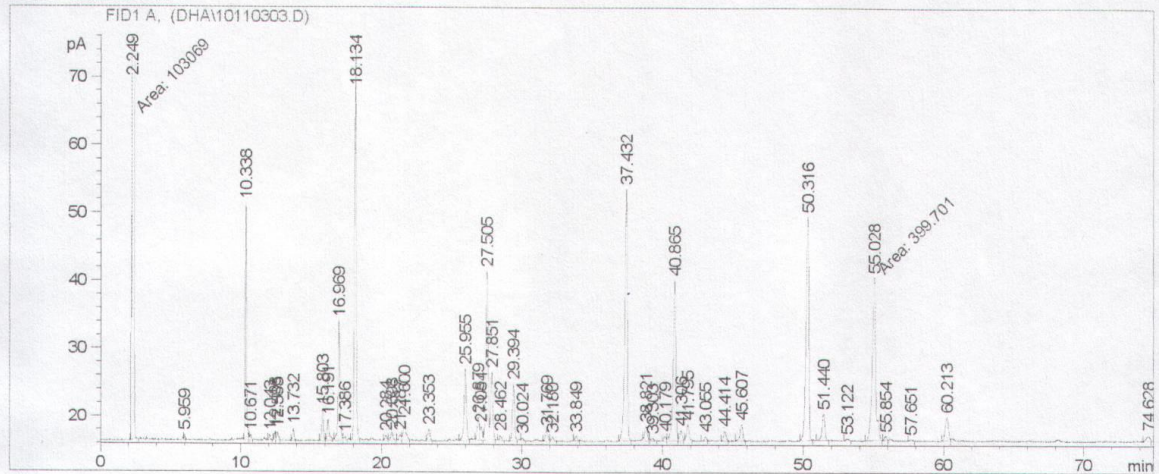
YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

1000 IU/GYAG, PH:5, 50°C, 24.SAAT, 2mcl

```

=====
Injection Date   : 10.11.2003 13:45:35
Sample Name      :
Acq. Operator    : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
Method           : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed     : 10.11.2003 08:56:45 by OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
DHA ICERIGI
Vial : 1
Inj  : 1
Inj Volume : Manually

```



Area Percent Report

```

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

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.249	MM	0.0240	1.03069e5	7.16982e4	96.52855
2	5.959	VV	0.0755	4.56842	8.13521e-1	0.00428
3	10.338	VV	0.0950	216.89613	34.91226	0.20313
4	10.671	VB	0.0862	5.39455	7.84614e-1	0.00505
5	12.043	BB	0.0813	5.30776	8.05867e-1	0.00497
6	12.408	BV	0.0745	7.67197	1.26119	0.00719
7	12.585	VB	0.1143	10.82772	1.24056	0.01014
8	13.732	BV	0.0899	12.59214	1.80369	0.01179
9	15.803	BV	0.0998	38.84670	4.70448	0.03638
10	16.191	VB	0.1244	31.89289	3.21002	0.02987
11	16.969	BB	0.1200	169.93205	17.62063	0.15915
12	17.386	BV	0.1117	5.49287	5.89405e-1	0.00514

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	18.134	VV	0.1143	485.66711	58.21728	0.45485
14	20.284	BV	0.1148	6.81184	7.10853e-1	0.00638
15	20.698	VB	0.1399	13.70037	1.19340	0.01283
16	21.287	BV	0.1447	10.02505	8.22499e-1	0.00939
17	21.600	VB	0.1551	40.09428	3.07579	0.03755
18	23.353	PB	0.1229	17.44891	1.70511	0.01634
19	25.955	BB	0.1413	119.30577	10.59913	0.11174
20	26.879	VV	0.1318	36.80316	3.34631	0.03447
21	27.084	VV	0.1116	17.71636	1.91254	0.01659
22	27.505	VV	0.1366	273.87622	24.94954	0.25650
23	27.851	VB	0.1320	106.92567	10.02067	0.10014
24	28.462	PP	0.1183	6.99911	7.08494e-1	0.00655
25	29.394	BB	0.1323	91.09570	8.44870	0.08532
26	30.024	BB	0.1300	5.13681	4.71802e-1	0.00481
27	31.769	PV	0.1383	18.65241	1.60824	0.01747
28	32.180	VP	0.1339	6.62562	5.92972e-1	0.00621
29	33.849	BB	0.1400	7.82321	6.68707e-1	0.00733
30	37.432	BB	0.1523	473.58371	37.13099	0.44353
31	38.821	VV	0.1537	27.50188	2.15065	0.02576
32	39.303	VP	0.1664	5.30441	3.76494e-1	0.00497
33	40.179	BV	0.1360	7.99675	6.96176e-1	0.00749
34	40.865	VV	0.1691	314.96640	23.68540	0.29498
35	41.306	VV	0.1488	17.98632	1.46423	0.01685
36	41.795	BB	0.1536	29.63564	2.31150	0.02776
37	43.055	PV	0.1498	7.29717	5.88058e-1	0.00683
38	44.414	PP	0.1495	17.97412	1.43098	0.01683
39	45.607	BP	0.1636	33.03286	2.40720	0.03094
40	50.316	BB	0.1741	457.91428	33.06093	0.42886
41	51.440	PB	0.1716	55.02482	3.99793	0.05153
42	53.122	BP	0.1563	4.09735	3.09754e-1	0.00384
43	55.028	MM	0.2767	399.70096	24.07809	0.37434
44	55.854	BV	0.1492	7.37542	5.84693e-1	0.00691
45	57.651	BP	0.1530	3.05405	2.36751e-1	0.00286
46	60.213	BV	0.1891	54.39920	3.42920	0.05095
47	74.628	BV	0.2164	15.67107	8.52729e-1	0.01468

Totals : 1.06775e5 7.20338e4

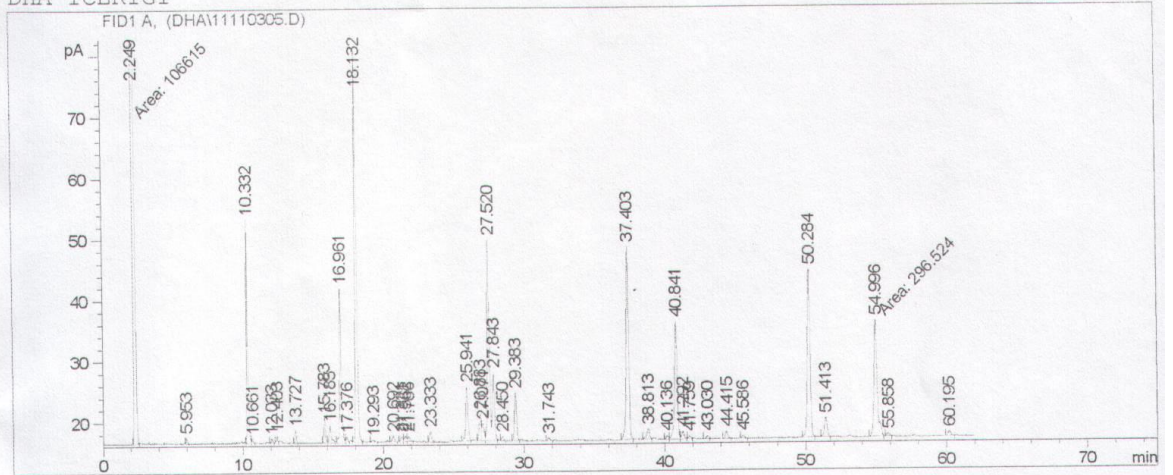
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU
1000 IU/GYAG, PH:5, 65°C, 24.SAAT, 2mcl

=====
Injection Date : 11.11.2003 16:19:25
Sample Name :
Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
Vial : 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 11.11.2003 16:16:24 by OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
(modified after loading)

DHA ICERIGI



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

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.249	MM	0.0230	1.06615e5	7.73281e4	96.95964
2	5.953	VB	0.0728	5.07561	9.50126e-1	0.00462
3	10.332	VV	0.0893	218.25490	36.47845	0.19849
4	10.661	VB	0.0957	4.78957	7.00676e-1	0.00436
5	12.033	BB	0.0864	4.69785	7.08143e-1	0.00427
6	12.403	PV	0.0734	6.67470	1.09861	0.00607
7	13.727	BB	0.0855	14.00634	2.04287	0.01274
8	15.783	BB	0.1026	33.96549	4.16799	0.03089
9	16.185	BB	0.1292	28.09723	2.75019	0.02555
10	16.961	BB	0.1222	229.13724	25.17517	0.20839
11	17.376	BV	0.1108	7.58088	8.20075e-1	0.00689

Instrument 1 11.11.2003 17:22:14 OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
12	18.132	VB	0.1156	542.18933	64.47523	0.49309
13	19.293	PP	0.1726	3.76511	2.57483e-1	0.00342
14	20.692	VB	0.1276	9.86540	9.31123e-1	0.00897
15	21.321	PV	0.1296	8.38480	7.66586e-1	0.00763
16	21.562	VV	0.1346	9.93722	8.90792e-1	0.00904
17	21.786	VB	0.1280	8.52672	7.95858e-1	0.00775
18	23.333	BB	0.1272	16.96843	1.62009	0.01543
19	25.941	BB	0.1399	99.12811	8.90382	0.09015
20	26.883	BV	0.1327	47.74574	4.37911	0.04342
21	27.071	VV	0.1255	27.95038	2.77530	0.02542
22	27.520	VV	0.1278	348.03421	32.79312	0.31652
23	27.843	VB	0.1259	113.30160	11.02707	0.10304
24	28.450	BP	0.1171	6.20160	6.39598e-1	0.00564
25	29.383	BP	0.1378	82.12524	7.74033	0.07469
26	31.743	BP	0.1242	4.74285	4.58543e-1	0.00431
27	37.403	BB	0.1586	396.82654	31.56943	0.36089
28	38.813	BP	0.1660	22.45514	1.67450	0.02042
29	40.136	BV	0.1393	6.49018	5.53330e-1	0.00590
30	40.841	VV	0.1679	255.83846	19.21252	0.23267
31	41.292	VB	0.1537	15.24827	1.17278	0.01387
32	41.759	BV	0.1540	6.12854	4.71997e-1	0.00557
33	43.030	BV	0.1421	5.83093	4.85668e-1	0.00530
34	44.415	PP	0.1483	13.95889	1.12831	0.01269
35	45.586	BP	0.1444	5.10426	4.19565e-1	0.00464
36	50.284	BB	0.1627	376.80420	27.60853	0.34268
37	51.413	BB	0.1605	42.86063	3.21647	0.03898
38	54.996	MM	0.2582	296.52386	19.13841	0.26967
39	55.858	BB	0.1410	6.34268	5.34364e-1	0.00577
40	60.195	BB	0.1853	11.56005	7.35963e-1	0.01051

Totals : 1.09958e5 7.76493e4

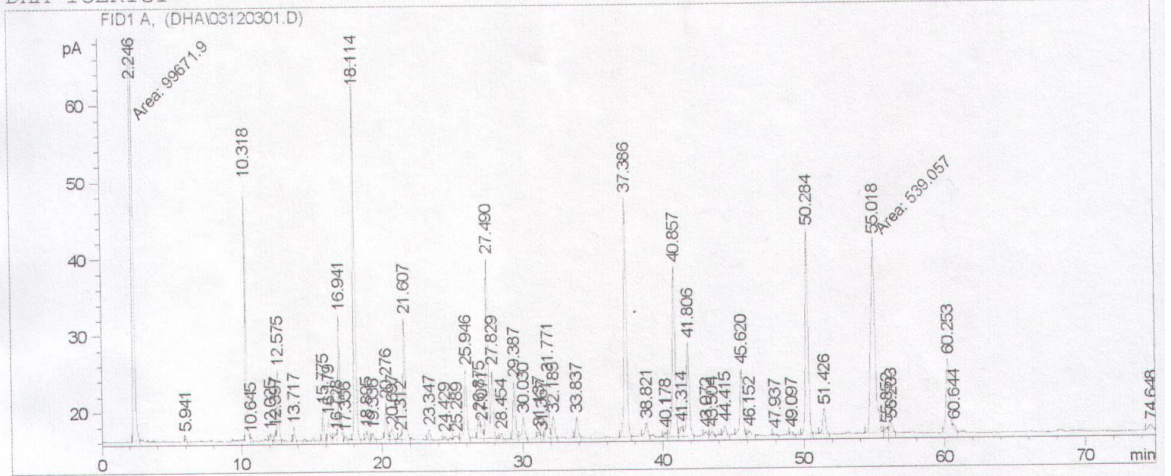
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

YAG ASITLERI KOMPOZISYONU

1000 IU/GYAG, PH:5, 35°C, 24.SAAT, 200 rpm, 2mcl

=====
Injection Date : 03.12.2003 10:05:10
Sample Name :
Acq. Operator : OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
Vial : 1
Inj : 1
Inj Volume : Manually
Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed : 10.11.2003 08:56:45 by OZLEM SIRIN-TUBA YASAR
DHA ICERIGI



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.246	MM	0.0205	9.96719e4	8.09920e4	95.82637
2	5.941	VB	0.0719	4.02263	7.82919e-1	0.00387
3	10.318	VV	0.0815	205.53703	33.75752	0.19761
4	10.645	VB	0.0838	3.49398	5.07892e-1	0.00336
5	12.025	BB	0.0859	6.29214	9.07688e-1	0.00605
6	12.397	PV	0.0776	7.40777	1.22391	0.00712
7	12.575	VB	0.0989	66.01196	9.18412	0.06347
8	13.717	BB	0.1024	12.78216	1.76699	0.01229
9	15.775	BB	0.1048	35.64088	4.23026	0.03427
10	16.179	BB	0.1171	27.29552	2.86674	0.02624
11	16.728	BV	0.1567	10.51310	7.98080e-1	0.01011
12	16.941	VB	0.1285	154.99274	16.36171	0.14901

Instrument 1 03.12.2003 11:23:13 OZLEM SIRIN-TUBA YASAR

Page 1 of 2

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
13	17.356	BB	0.1100	5.28473	5.68407e-1	0.00508
14	18.114	VB	0.1167	448.46152	51.16947	0.43116
15	18.895	BP	0.1101	10.00081	1.13163	0.00961
16	19.336	BP	0.1096	7.37601	8.15137e-1	0.00709
17	20.276	BB	0.1264	47.63780	4.75559	0.04580
18	20.697	BB	0.1336	14.74238	1.33747	0.01417
19	21.312	PV	0.1227	5.40119	5.26565e-1	0.00519
20	21.607	VP	0.1242	161.21867	15.70752	0.15500
21	23.347	BB	0.1301	14.04643	1.29395	0.01350
22	24.429	BB	0.1157	3.94760	4.14349e-1	0.00380
23	25.289	BV	0.2347	7.38471	3.71895e-1	0.00710
24	25.946	VB	0.1467	108.30472	9.04241	0.10413
25	26.875	BV	0.1350	34.68427	3.07617	0.03335
26	27.071	VV	0.1146	16.22682	1.70401	0.01560
27	27.490	VV	0.1341	258.38019	23.44221	0.24841
28	27.829	VB	0.1336	97.75224	8.90328	0.09398
29	28.454	PP	0.1185	6.13639	6.19785e-1	0.00590
30	29.387	BB	0.1377	85.00278	7.44244	0.08172
31	30.030	BB	0.1563	35.64274	2.83346	0.03427
32	31.137	BV	0.1337	9.24759	8.38514e-1	0.00889
33	31.367	VV	0.1067	3.40830	3.87127e-1	0.00328
34	31.771	VV	0.1504	97.13052	8.01500	0.09338
35	32.185	VB	0.1400	32.43922	2.78317	0.03119
36	33.837	BB	0.1447	31.42503	2.62509	0.03021
37	37.386	BB	0.1652	411.62283	31.23558	0.39574
38	38.821	BV	0.1690	24.17967	1.76349	0.02325
39	40.178	BV	0.1479	6.97883	5.59854e-1	0.00671
40	40.857	VV	0.1682	305.81006	22.13647	0.29401
41	41.314	VV	0.1618	17.25715	1.27216	0.01659
42	41.806	VB	0.1656	165.56439	12.18052	0.15918
43	43.072	BV	0.1531	6.38512	4.94580e-1	0.00614
44	43.504	VP	0.1457	6.79672	5.51822e-1	0.00653
45	44.415	BP	0.1518	15.10869	1.18428	0.01453
46	45.620	BV	0.1677	121.55328	8.63714	0.11686
47	46.152	VB	0.1575	6.74361	5.07463e-1	0.00648
48	47.937	BP	0.1513	3.14440	2.46545e-1	0.00302
49	49.097	BB	0.1667	5.81959	4.12304e-1	0.00560
50	50.284	BB	0.1706	363.27527	26.63568	0.34926
51	51.426	BB	0.1684	46.76184	3.33812	0.04496
52	55.018	MM	0.3541	539.05688	25.36915	0.51826
53	55.852	BV	0.1661	9.87091	7.01806e-1	0.00949
54	56.203	VB	0.1679	17.80350	1.25954	0.01712
55	60.253	BV	0.2034	161.96979	9.64462	0.15572
56	60.644	VB	0.1519	14.41543	1.12578	0.01386
57	74.648	BBA	0.2626	15.72446	7.08090e-1	0.01512

Totals : 1.04013e5 8.13641e4

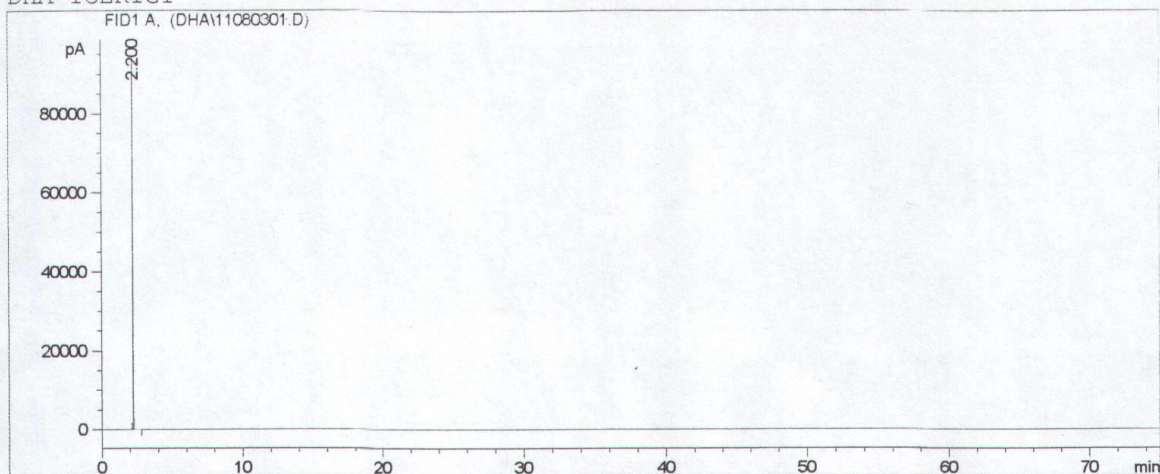
Results obtained with enhanced integrator!

*** End of Report ***

```

=====
Injection Date   : 11.08.2003 14:34:02
Sample Name     : n-Heptan
Acq. Operator   : OZLEM SIRIN -TUBA YASAR
Vial            : 1
Inj             : 1
Inj Volume      : Manually
Method          : C:\HPCHEM\1\METHODS\DHA2.M
Last changed    : 11.08.2003 14:28:07 by OZLEM SIRIN -TUBA YASAR
DHA ICERIGI

```



```

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

```

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000

```

Signal 1: FID1 A,

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	2.200	BB S	0.0158	9.55171e4	9.08464e4	1.000e2

Totals : 9.55171e4 9.08464e4

Results obtained with enhanced integrator!

```

=====
*** End of Report ***

```

ÖZGEÇMİŞ

Tuba YAŞAR, 1975 yılında Erzurum’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Lüleburgaz’da tamamladı. 1993 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi’nin Kimya Mühendisliği bölümünü kazandı. Lisans eğitimini bu bölümde tamamladıktan sonra 1998 yılı Haziran ayında mezun oldu. 2001 yılında İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümü yüksek lisans programına kabul edildi. Yüksek lisans eğitiminin tez aşamasında olup, halen bu programa devam etmektedir.