

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANNE SÜTÜ YAĞINA BENZER YAPILANDIRILMIŞ
YAĞ ÜRETİMİ**

DOKTORA TEZİ

Y. Müh. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK

Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

MART 2007

**ANNE SÜTÜ YAĞINA BENZER YAPILANDIRILMIŞ YAĞ
ÜRETİMİ**

DOKTORA TEZİ

Y. Müh. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 29 Aralık 2006

Tezin Savunulduğu Tarih : 05 Mart 2007

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Artemis KARAALİ

Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Necla ARAN (İTÜ)

Prof.Dr. Güldem ÜSTÜN (İTÜ)

Prof.Dr. Miray BEKBÖLET (B.Ü.)

Prof.Dr. Zekiye ÇINAR (Y.T.Ü.)

MART 2007

ÖNSÖZ

Bu çalışmada engin vizyonu ile yol gösteren, ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Artemis Karaali'ye teşekkürü bir borç bilirim. TÜBİTAK NATO-A2 yurtdışı araştırma bursu alarak gittiğim A.B.D.'de, University of Georgia'daki çalışmalarım sırasında beni değerli bilgi birikimi ve tecrübeleriyle yönlendiren ve her türlü çalışma imkanını sunan değerli hocam Distinguished Prof. Dr. Casimir C. Akoh'a ve çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım Brenda H. Jennings, Enyam Steve Lumor, Weiguang Yi ve Byung Hee Kim'e teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmalarım sırasında değerli katkı ve bilgileri ile tezimin şekillenmesinde emekleri olan tez izleme komitesi hocalarım Prof. Dr. Necla Aran ve Prof. Dr. Güldem Üstün'e, bana çeşitli şekillerde katkıda bulunan tüm değerli hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma da en derin teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca ve tez çalışmam sırasında benden sevgi ve desteklerini esirgemeyerek her türlü maddi ve manevi yardımları sunan aileme, başta annem Fehime Şahin, babam Nazım Şahin, ablam ve eniştem Çiğdem-Nihan Özenç ve ailemizin en küçük üyesi yeğenim Arda Özenç olmak üzere tüm aileme, tüm arkadaşlarıma, ve her zaman en büyük dayanağım olan sevgili eşim Alper Yeşilçubuk'a sonsuz teşekkürler.

Aralık, 2006

Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KISALTMALAR.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xiv
1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Anne Sütü İle İlgili Bilgiler	4
2.1.1. Anne sütü yağının sindirimi	6
2.2. Yapılandırılmış Yağlar: Tanım ve Sınıflandırılması.....	9
2.2.1. Yapılandırılmış yağların enzimatik yöntemlerle üretilmesi.....	10
2.3. Anne Sütü Yağına Benzer Yapılandırılmış Yağlar Üzerine Yapılan Çalışmalar	18
2.3.1. Ticari yapılandırılmış yağ ürünü: Betapol™:	22
2.3.2. Betapol™ ile yapılan klinik çalışmalar	25
2.4. Omega-3 ve Omega-6 Yağ Asitleri ile Zenginleştirilmiş Bebek Mamaları.....	29
2.4.1. Gamma-linolenik asit.....	29
2.4.2. Omega-3 yağ asitleri.....	32
2.4.3. Bebek mamalarının uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri ile zenginleştirilmesinde mevcut olan yasal düzenlemeler.....	35
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	37
3.1. Malzeme	38
3.2. Yöntemler	38
3.2.1. Substrat yağlardan serbest yağ asitleri eldesi.....	38
3.2.2. Üre fraksiyonlama yöntemi ile yağ asidi konsantresi eldesi.....	40
3.2.3. İnteresterifikasyon (asidoliz) reaksiyonu.....	41
3.2.4. İnce tabaka kromatografisi ile analiz.....	41
3.2.5. Yağ asidi metil esterlerinin hazırlanması.....	41
3.2.6. Yağ asitlerinin gaz-sıvı kromatografisi ile analizi.....	41
3.2.7. Sn-2 pozisyonundaki yağ asitlerinin analizi	42
3.2.8. Tepki yüzey yöntemi ve deneysel tasarım	43
3.2.9. Ürünün pilot ölçekte üretimi	45
3.2.10. Reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması	46
3.2.11. İstatistiksel analiz	47

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	49
4.1. Substratların Karakterizasyonu	49
4.1.1. Tripalmitin, fındık yağı ve fındık yağı serbest yağ asitlerinin bileşimi... 49	
4.1.2. Hodan yağı, gamma-linolenik asit konsantresi, menhaden yağı ve omega-3 yağ asidi konsantresinin yağ asitleri bileşimi	51
4.1.3. Fındık yağının sn-2 pozisyonunda bulunan yağ asidi bileşimi	53
4.2. Anne Sütü Yağına Benzer Yapılandırılmış Yağların Tripalmitin, Fındık Yağı Serbest Yağ Asitleri ve Stearik Asit ile Enzimatik Asidoliz Yoluyla Üretimi.....	54
4.2.1. Oleik asit katılımı	54
4.2.2. Stearik asit katılımı	56
4.2.3. Oleik/palmitik asit oranı	58
4.2.4. Yapılandırılmış yağların sn-2 pozisyonlarındaki yağ asidi kompozisyonu	60
4.2.5. İstatistiksel analiz	61
4.3. Anne Sütü Yağına Benzer Yapılandırılmış Yağların Tripalmitin ve Fındık Yağı Serbest Yağ Asitleri ile Enzimatik Asidoliz Yoluyla Üretimi: Reaksiyon Koşullarının Tepki-Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu	62
4.3.1. Farklı reaksiyon koşullarının oleik/palmitik asit oranına etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirmeleri	63
4.3.2. Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması	66
4.3.3. Modelin doğrulanması ve karıştırılmalı tank tipi biyoreaktörde üretim....	68
4.4. Gamma-Linolenik Asit İle Zenginleştirilmiş Anne Sütü Yağına Benzer Yapılandırılmış Yağların Enzimatik Asidoliz Yoluyla Üretimi: Reaksiyon Koşullarının Tepki-Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu.....	69
4.4.1. Farklı reaksiyon koşullarının gamma-linolenik ve oleik asit katılımı üzerindeki etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirmeleri.....	70
4.4.2. Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması	76
4.4.3. Modellerin doğrulanması	85
4.5. Omega-3 Yağ Asitleri İle Zenginleştirilmiş Anne Sütü Yağına Benzer Yapılandırılmış Yağların Enzimatik Asidoliz Yoluyla Üretimi: Reaksiyon Koşullarının Tepki-Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu.....	86
4.5.1. Farklı reaksiyon koşullarının omega-3 yağ asitleri ve oleik asit katılımı üzerindeki etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirmeleri.....	87
4.5.2. Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması	90
4.5.3. Modellerin doğrulanması	95
5. SONUÇLAR	96
KAYNAKLAR.....	100
ÖZGEÇMİŞ.....	109

KISALTMALAR

AA	: Araşidonik asit
BSSL	: Bile salt stimulated lipase
ÇDYA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
DAG	: Diaçilgliserol
DGLA	: Di-Homo γ -Linolenik Asit
DHA	: Dokosahekzaenoik Asit
EPA	: Eikosapentaenoik asit
FA	: Fatty acid
GLA	: Gamma-Linolenik Asit
GSK	: Gaz Sıvı Kromatografisi
KO	: Kareler Ortalaması
KT	: Kareler Toplamı
LA	: Linoleik Asit
MAG	: Monoaçilgliserol
MTBE	: Metil tert-bütıl eter
OOP	: 1,2-dioleol-3-palmitol-gliserol
OPO	: 1,3-oleol 2-palmitolgliserol
POP	: 1,3-dipalmitol-2-oleol-gliserol
PPO	: 1,2-dipalmitol 3-oleol gliserol
PPP	: Tripalmitin
RSM	: Response Surface Methodology
SD	: Serbestlik Derecesi
SL	: Structured Lipid
SYA	: Serbest Yağ Asitleri
TAG	: Triaçilgliserol
TG	: Trigliserit
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TYT	: Tepki Yüzey Yöntemi
YA	: Yağ Asidi
YAME	: Yağ Asidi Metil Esterleri
YY	: Yapılandırılmış Yağ

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Değişik türlerden elde edilen sütlerin 100 gramında bulunan besin öğeleri miktarları.	4
Tablo 2.2: Anne sütünün çeşitli araştırmacılar tarafından saptanan YA kompozisyonu (%) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları.....	5
Tablo 2.3: Anne sütü yağının YA dağılımı (% mol)	6
Tablo 2.4: Yapılandırılmış yağların uygulama alanlarına göre sınıflandırılması.....	10
Tablo 2.5: Seçilmiş lipazların yağ asidi ve pozisyonel seçicilikleri.....	15
Tablo 2.6: Ticari Betapol'ün (Betapol 45) YA kompozisyonu	24
Tablo 2.7: Betapol'ün çeşitli araştırmacılar tarafından saptanan YA kompozisyonu ve TAG'lerin sn-2 pozisyonundaki YA oranları (%)	25
Tablo 2.8: Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin bebek mamalarında kullanımı için Kodeks Komisyonu tarafından önerilen değerler.....	36
Tablo 2.9: Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin bebek mamalarında kullanımına ilişkin AB regülasyonu	36
Tablo 3.1: Gaz kromatografisi cihazında uygulanan koşullar.....	42
Tablo 3.2: Çevrilebilir merkezil bileşik deney tasarımları	44
Tablo 3.3: Merkezil bileşik deney tasarımında belirlenen bağımsız değişkenler ve belirlenen noktalardaki kodlara karşılık gelen değerler	45
Tablo 3.4: GLA ve omega-3 ya ile zenginleştirilmiş YY'ların merkezil bileşik deney tasarımında belirlenen bağımsız değişkenler ve belirlenen noktalardaki kodlara karşılık gelen değerler	45
Tablo 4.1: Tripalmitin, fındık yağı ve fındık yağı serbest yağ asitlerinin yağ asidi bileşimleri ve ilgili literatür değerleri (%).....	50
Tablo 4.2: Hodan yağının ve üre fraksiyonlama yöntemi ile elde edilen GLA konsantresinin yağ asidi bileşimi ve ilgili literatür değerleri (% ağırlık).....	51
Tablo 4.3: Menhaden balık yağlarının ve üre fraksiyonlama yöntemi ile elde edilen omega-3 yağ asidi konsantrlerinin yağ asidi bileşimleri (% ağırlık)	52
Tablo 4.4: Fındık yağının sn-2 pozisyonundaki yağ asidi oranları ve ilgili literatür değerleri (% ağırlık)	53
Tablo 4.5: YY'ların YA kompozisyonu (% mol) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları (% mol).....	60
Tablo 4.6: Oleik asit katılımı için iki yollu ANOVA istatistik yöntemi ile değerlendirme sonuçları	61
Tablo 4.7: Stearik asit katılımı için iki yollu ANOVA istatistik yöntemi ile değerlendirme sonuçları	61
Tablo 4.8: Oleik/palmitik asit oranı için iki yollu ANOVA istatistik yöntemi ile değerlendirme sonuçları	62
Tablo 4.9: Deney tasarımı ve deney noktalarında gözlenen tepkiler.....	63
Tablo 4.10: Lineer ve kuadratik modellerde geriye dönük eleme sonucunda elde edilen regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P -değeri)	64
Tablo 4.11: ANOVA analizi sonuçları	64
Tablo 4.12: Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı ile belirlenen optimum koşullar....	68

Tablo 4.13: Optimum koşullarda elde edilen YY'ların YA kompozisyonu (% mol) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları (% mol).....	69
Tablo 4.14: Deney tasarımı ve deney noktalarında gözlenen tepkiler (GLA ve oleik asit katılımı).....	70
Tablo 4.15: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için lineer ve kuadratik modellerde geriye dönük eleme sonucunda elde edilen regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (<i>P</i> -değeri).....	71
Tablo 4.16: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için lineer ve kuadratik modellerde geriye dönük eleme sonucunda elde edilen regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (<i>P</i> -değeri).....	71
Tablo 4.17: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için ANOVA analizi sonuçları	72
Tablo 4.18: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için ANOVA analizi sonuçları	73
Tablo 4.19: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı ile elde edilen optimum koşullar	84
Tablo 4.20: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı ile elde edilen optimum koşullar	85
Tablo 4.21: Optimum koşullarda elde edilen YY'ların YA kompozisyonu (% mol) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları (% mol).....	86
Tablo 4.22: Deney tasarımı ve deney noktalarında gözlenen tepkiler (EPA+DHA ve oleik asit katılımı)	87
Tablo 4.23: Lineer ve kuadratik modellerde geriye dönük eleme sonucunda elde edilen regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (<i>P</i> -değeri)	88
Tablo 4.24: ANOVA analizi sonuçları	88
Tablo 4.25: Optimum koşullarda elde edilen YY'ların YA kompozisyonu (% mol) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları (% mol).....	95

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Yağların vücutta sindirimi ve yağ asitlerinin absorpsiyon yolları.	8
Şekil 2.2: Orta zincirli yağ asitlerini içeren TAG ile uzun zincirli yağ asitlerini içeren TAG arasındaki sn-1,3 seçici lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonları.	15
Şekil 2.3: Uzun zincirli yağ asitlerini içeren TAG ile orta zincirli yağ asidi arasındaki sn-1,3 seçici lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen asidoliz reaksiyonları.	16
Şekil 2.4: (A) Gliserol ve çoklu doymamış yağ asidi arasında (B) Gliserol ve orta zincirli yağ asidi içeren TAG arasında sn-1,3 seçici lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen alkoliz reaksiyonu.	16
Şekil 2.5: Tripalmitin ve oleik asit arasında sn-1,3 spesifik lipaz varlığında gerçekleşen enzimatik asidoliz tepkimesinin şematik olarak gösterimi	19
Şekil 2.6: Betapol üretimi için sn-1,3 seçici lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen asidoliz reaksiyonunun prensibi.....	22
Şekil 2.7: Betapol'un üretim akış diyagramı.	23
Şekil 2.8: Omega-6 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol.....	30
Şekil 2.9: Omega-3 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol.	33
Şekil 3.1: Yapılan deneysel çalışmalar.....	37
Şekil 3.2: Çalışma aşamalarının ana hatları ve yürütülen analizler	39
Şekil 3.3: Tank tipi kesikli biyoreaktör ve su banyosu	46
Şekil 3.4: Kısa-yollu distilasyon ünitesi.....	47
Şekil 4.1: Oleik asidin farklı substrat mol oranlarında [1:1,5:0,5; 1:3:0,75; 1:6:1, 1:9:1,25; 1:12:1,5 (tripalmitin:findık yağı SYA:stearik asit)] tripalmitine katılımı. İnkübasyonlar (A) 55°C, (B) 60°C, ve (C) 65°C	55
Şekil 4.2: Stearik asidin [1:1,5:0,5; 1:3:0,75; 1:6:1, 1:9:1,25; 1:12:1,5 (tripalmitin:findık yağı SYA:stearik asit)] tripalmitine katılımı. İnkübasyonlar (A) 55°C, (B) 60°C, ve (C) 65°C.....	57
Şekil 4.3: Oleik/palmitik asit oranı [1:1,5:0,5; 1:3:0,75; 1:6:1, 1:9:1,25; 1:12:1,5 (tripalmitin:findık yağı SYA:stearik asit)]. İnkübasyonlar (A) 55°C, (B) 60°C, ve (C) 65°C	59
Şekil 4.4: Gözlenen değerlere karşılık modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki.....	65
Şekil 4.5: Oleik/palmitik asit oranına süre ve substrat mol oranının etkisini gösteren izdüşüm grafiği	66
Şekil 4.6: Oleik/palmitik asit oranına süre ve sıcaklığın etkisini gösteren izdüşüm grafiği	67
Şekil 4.7: Oleik/palmitik asit oranına substrat mol oranı ve sıcaklığın etkisini gösteren izdüşüm grafiği	67
Şekil 4.8: Lipozyme® RM IM ile katalizlenen reaksiyonlarda gözlenen değerlere karşılık modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki (A) GLA katılımı (B) Oleik asit katılımı.....	74
Şekil 4.9: Lipozyme® TL IM ile katalizlenen reaksiyonlarda gözlenen değerlere karşılık modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki (A) GLA katılımı (B) Oleik asit katılımı.....	75

Şekil 4.10: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına substrat mol oranı-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği	77
Şekil 4.11: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına sıcaklık-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği	77
Şekil 4.12: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına substrat mol oranı-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği	78
Şekil 4.13: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına substrat mol oranı-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği	79
Şekil 4.14: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına sıcaklık-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği	79
Şekil 4.15: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına substrat mol oranı-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği	80
Şekil 4.16: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına substrat mol oranı-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği	81
Şekil 4.17: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına sıcaklık-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği	81
Şekil 4.18: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına substrat mol oranı-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği	82
Şekil 4.19: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına substrat mol oranı-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği	83
Şekil 4.20: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına sıcaklık-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği	83
Şekil 4.21: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına substrat mol oranı-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği	84
Şekil 4.22: Gözlenen değerlere karşılık modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki (A) EPA ve DHA katılımı (B) Oleik asit katılımı.....	89
Şekil 4.23: EPA+DHA katılımına sıcaklık-substrat mol oranı etkisini gösteren izdüşüm grafiği	91
Şekil 4.24: EPA+DHA katılımına süre-substrat mol oranı etkisini gösteren izdüşüm grafiği	91
Şekil 4.25: EPA+DHA katılımına süre-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği.....	92
Şekil 4.26: Oleik katılımına sıcaklık-substrat mol oranı etkisini gösteren izdüşüm grafiği	93
Şekil 4.27: Oleik katılımına süre-substrat mol oranı etkisini gösteren izdüşüm grafiği ..	93
Şekil 4.28: Oleik katılımına süre-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği.....	94

SEMBOL LİSTESİ

γ	: Gamma
P	: Olasılık değeri
Q^2	: Modelin tahminleme gücü
r	: Korelasyon katsayısı
R^2	: Model katsayısı
$R^2_{\text{düz}}$	: Düzeltilmiş model katsayısı
S_r	: Substrat mol oranı (mol/mol)
T	: Reaksiyon sıcaklığı (°C)
t	: Reaksiyon süresi (saat)
X_i ve X_j	: Bağımsız değişkenler
Y	: Tepki
β	: Regresyon katsayısı
β_i	: Lineer (1.derece) regresyon katsayısı
β_{ii}	: Kuadratik (2.derece) regresyon katsayısı
β_{ij}	: Etkileşim regresyon katsayısı
β_o	: Kesişim terimi

ANNE SÜTÜ YAĞINA BENZER YAPILANDIRILMIŞ YAĞ ÜRETİMİ

ÖZET

Anne sütü yağı, bebek beslenmesi ve gelişimi açısından anne sütünün önemli bir bileşenidir. Anne sütü yağında bulunan triaçilgliserol'ler (TAG), palmitik asidi (C16:0) %60-70 oranında gliserol molekülünün sn-2 pozisyonunda, uzun zincirli doymamış yağ asitlerini (YA) ise çoğu bitkisel ve hayvansal kaynaklı yağlardan farklı olarak sn-1,3 pozisyonlarında bulundurmaktadırlar.

Bebek için anne sütü yağındaki bu özgün pozisyonun, bebeklerin sindirim ve absorpsiyon metabolizmalarını olumlu etkileyen etmenlerden biri olduğu düşünülmektedir. Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ (YY)'ların bitkisel kaynaklı yağlardan spesifik lipaz enzimlerinin katalizlediği interesterifikasyon tepkimeleri ile üretilmeleri ve bu YY'ların bebek maması formülasyonlarında kullanımı artık endüstriyel ölçekte mümkün olmaktadır.

Bu çalışma dört farklı kısımdan oluşmaktadır. Çalışmanın birinci kısmında, anne sütü yağında bulunan başlıca uzun zincirli yağ asitlerini içeren ve anne sütü yağına benzer YY'ların enzimatik interesterifikasyon (asidoliz) tepkimesi ile elde edilmesi amaçlanmış ve asidoliz tepkimeleri ekonomik açıdan ülkemiz için önemli bir bitkisel yağ olan fındık yağı SYA, tripalmitin ve stearik asit arasında, *Rhizomucor miehei* orijinli Lipozyme® RM IM immobilize sn-1,3 spesifik lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada asidoliz tepkimelerine substrat mol oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi gibi faktörlerin etkisi incelenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, fındık yağı serbest yağ asitleri (SYA) ve tripalmitin kullanılarak, Lipozyme® RM IM lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen enzimatik interesterifikasyon (asidoliz) reaksiyonları ile anne sütü yağına benzer YY'lar eldesi ve tepki-yüzey yöntemi ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Ayrıca elde edilen optimum koşullar kullanılarak tank tipi kesikli biyoreaktörde laboratuvar ölçekli üretim gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın üçüncü bölümünde ise, gamma-linolenik asit (GLA) ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY'ların üretiminin tripalmitin, fındık yağı SYA ve hoda (bora) yağından konsantre edilen GLA arasında enzimatik asidoliz tepkimeleri ile gerçekleştirilmesi ve tepki-yüzey metodu ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Lipozyme® RM IM ve *Thermomyces lanuginosus* orijinli Lipozyme® TL IM sn-1,3 spesifik lipaz enzimleri enzimatik asidoliz reaksiyonlarında biyokatalizör olarak kullanılmıştır.

Çalışmanın dördüncü bölümünde ise, iki önemli omega-3 yağ asidi olan eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosahekzaenoik asit (DHA) ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY'ların üretimi, tripalmitin, fındık yağı SYA ve omega-3 YA konsantresi arasında enzimatik asidoliz reaksiyonları ile gerçekleştirilmesi ve tepki-yüzey metodu ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Enzimatik asidoliz tepkimelerinde Lipozyme® RM IM enzimi kullanılmıştır.

Çalışmanın ikinci, üçüncü ve dördüncü aşamalarında gerçekleştirilen reaksiyonların üzerinde seçilmiş farklı faktörlerin etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla, 5 seviyeli Merkezil Bileşik Deney Tasarımı (CCD) kullanılmış ve faktörler olarak da "substrat mol oranı (Toplam YA/TAG, Sr)", "reaksiyon sıcaklığı (T, °C)" ve "reaksiyon süresi (t, saat)" seçilmiştir. Faktörlerin ve aralıkların seçiminde hem birinci çalışmada elde edilen sonuçlardan hem de ön deneme sonuçlarından yararlanılmıştır.

Uzun zincirli yağ asitlerini içeren ve anne sütü yağına benzer YY'ların eldesinde, tripalmitine katılan (inkorpore olan) stearik ve oleik asit miktarlarının reaksiyon süresi ile birlikte arttığı, ayrıca oleik asidin tripalmitine katılma oranının "substrat mol oranı" ile arttığı gözlenmiştir. Stearik asitin en fazla katılımı [1:3:0,75] substrat mol oranında gerçekleşmiştir. Reaksiyon ürünlerinin oleik/palmitik asit oranının "substrat mol oranı" ve "süre" ile birlikte arttığı ve "substrat mol oranı" [1:12:1,5], 65°C sıcaklık ve 24 saat reaksiyon süresi koşullarında elde edilen ürünün en yüksek (1,2) oleik/palmitik asit oranına sahip olmuştur.

İkinci kısımda yapılan çalışmada, "çoklu regresyon" ve "geriye dönük eleme" yöntemleri kullanılarak tepki (oleik/palmitik asit oranı) için başarılı kuadratik modeller elde edilmiştir. Üründeki oleik/palmitik asit oranının 1,25 olması hedeflenmiş ve bu ürünü elde etmek için gerekli optimum koşullar [Sr: 12,2, T: 64,5°C ve t: 24 saat] olarak bulunmuştur. Bu koşullar kullanılarak hem modelin doğruluğunu tespit amacıyla reaksiyonlar test tüplerinde gerçekleştirilmiş hem de aynı koşullar kullanılarak laboratuvar ölçekli karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde YY üretimi gerçekleştirilmiştir.

Üçüncü aşama olan GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY eldesi çalışmasında, iki farklı enzim (Lipozyme® RM IM ve Lipozyme® TL IM) kullanımı ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda seçilen tepkiler [oleik asit miktarı (%) ve GLA miktarı (%)] için, "çoklu regresyon" ve "geriye dönük eleme" yöntemleri uygulanarak başarılı kuadratik modeller elde edilmiştir. Bu aşamada üründe GLA miktarının %10, oleik asit miktarının ise %45 olması hedeflenmiştir. Lipozyme® RM IM enzimi ile bu özelliklerde ürün elde etmek için optimum koşullar [Sr: 14,8, T: 55°C ve t: 24 saat] olarak bulunurken Lipozyme® TL IM enzimi ile ise [Sr: 14,0, T: 55°C ve t: 24 saat] olarak bulunmuştur. Bu koşullarda modelin doğruluğu tespit edilmiş ve bebek beslenmesi ve sağlığı açısından önemli etkileri olan GLA ile zenginleştirilmiş ve anne sütü yağı ile benzer absorpsiyon özelliklerine ve yağ asidi kompozisyonuna sahip YY üretimi mümkün olmuştur.

Dördüncü aşama olan omega-3 YA (EPA ve DHA) ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY eldesi çalışmasında ise seçilen tepkiler [EPA+DHA miktarı (%) ve oleik asit miktarı (%)] için, "çoklu regresyon" ve "geriye dönük eleme" yöntemleri uygulanarak başarılı kuadratik modeller elde edilmiştir. Bu aşamada üründeki EPA+DHA miktarının %5, oleik asit miktarının ise %40 olması hedeflenmiştir. Lipozyme® RM IM enzimi ile bu özelliklerde ürün elde etmek için gerekli olan optimum koşullar [Sr: 12,4 T: 55°C ve t: 24 saat] olarak bulunmuş ve bu koşullarda

modelin doğruluğu tespit edilmiştir. Elde edilen YY hem bebek beslenmesi ve sağlığı açısından önemli etkileri olan omega-3 YA (EPA ve DHA) ile zenginleştirilmiş hem de absorpsiyon özellikleri/yağ asidi bileşimi bakımından anne sütü yağı ile benzer ürün üretimi mümkün olmuştur. Bu yeni ürünün ticari ölçekte bebek mamalarında kullanımıyla bebek beslenmesi ve gelişimine önemli katkılarının olacağı düşünülmektedir.

PRODUCTION OF STRUCTURED LIPIDS RESEMBLING HUMAN MILK FAT TRIACYLGLYCEROLS

SUMMARY

Human milk fat is one of the most significant components of human milk. Human milk fat is characterized by the dominance of triacylglycerols where 60-70% of palmitic acid (C16:0) is located at the sn-2 position of the glycerol backbone, whereas unsaturated fatty acids are located mainly at the sn-1 and sn-3 positions; this unique structure is different from most vegetable oils and animal fats. Previous reports provided convincing information that the higher fatty acid (FA) and calcium absorption and efficient use of dietary energy was the result of this specific position of these fatty acids in triacylglycerol (TAG) moiety. Structured lipids (SL) resembling human milk fat can now be produced at industrial scale by lipase-catalyzed interesterification reactions from vegetable oils, for including in term and preterm infant formula.

This study consists of four different parts. In the first part, it was aimed to produce structured lipids resembling human milk fat containing long-chain fatty acids by enzymatic interesterification (acidolysis) reactions between free fatty acids of Turkish hazelnut oil, tripalmitin, and stearic acid using sn-1,3 specific lipase, Lipozyme[®] RM IM obtained from *Rhizomucor miehei*. The effects of substrate molar ratio, reaction temperature and reaction time on the progress of acidolysis reactions were investigated.

In the second part of the study, it was aimed to produce human milk fat substitutes from hazelnut oil free FA and tripalmitin by enzymatic interesterification (acidolysis) reactions catalyzed by Lipozyme[®] RM IM lipase enzyme. The reaction conditions were modeled and optimised by response-surface methodology (RSM). Optimum conditions were used to synthesize SLs using laboratory scale stirred tank batch bioreactor.

In the third part of the study, it was aimed to produce human milk fat substitutes enriched with gamma-linolenic acid (GLA) by enzymatic interesterification (acidolysis) reactions with tripalmitin, hazelnut oil FA and GLA obtained from borage oil as well as to optimize reaction conditions by response surface methodology. Lipozyme[®] RM IM and Lipozyme[®] TL IM obtained from *Thermomyces lanuginosus* were used as the biocatalyst for the enzymatic acidolysis reactions.

In the fourth part of the study, it was aimed to produce human milk fat substitute enriched with omega-3 FA (EPA and DHA) by enzymatic acidolysis reactions between tripalmitin, hazelnut oil FA and omega-3 FA concentrate as well as to optimize reaction conditions by RSM. Lipozyme[®] RM IM was used in the acidolysis reactions.

In the studies (two, three and four), circumscribed central composite (CCC) design with five levels and three factors chosen as "substrate molar ratio (Total FA/TAG, Sr)", "reaction temperature (T, °C)" and "reaction time (t, h)" were used to model and optimize the reaction conditions via RSM. The independent variables and their levels were chosen based on the results of the first study and the reaction trials.

For the production of human milk fat substitutes containing long-chain fatty acids, it was found that incorporation of oleic and stearic acids into tripalmitin increased with the reaction time. Incorporation of oleic acid increased with the substrate molar ratio. The highest incorporation of stearic acid was achieved at "substrate molar ratio" of [1:3:0,75]. The oleic/palmitic acid ratio of the reaction products was increased with substrate molar ratio and reaction time and the product obtained at substrate molar ratio of [1:12:1,5], 65°C reaction temperature and 24 h reaction time had the highest oleic/palmitic acid ratio (1,2).

In the second part of the study, good quadratic models were obtained for [oleic acid: palmitic acid] ratio by multiple regression and backward elimination for the production of human milk fat substitutes. The optimum conditions generated from the model for the targeted [oleic acid: palmitic acid] ratio (1,25) were [Sr: 12,2 mol/mol, T: 64,5°C and t: 22,8 h]. Using these optimal conditions, reactions were done in test tubes in order to verify the model, and also structured lipid production was done at laboratory scale stirred-tank batch bioreactor using the same conditions.

For the production of human milk fat substitutes enriched with GLA, which is the third part of the study, good quadratic models were obtained for the incorporation of GLA (response 1) and oleic acid (response 2) by multiple regression and backward elimination. The optimal conditions generated from the models for the targeted GLA (10%) and oleic acid (45%) incorporation were [Sr: 14,8 mol/mol, T: 55°C and t: 24 h] and [Sr: 14 mol/mol, T: 55°C and t: 24 h] for the reactions catalyzed by Lipozyme® RM IM and by Lipozyme® TL IM, respectively. A human milk fat substitute product containing GLA was successfully produced having both the associated health benefits of GLA and similar fatty acid composition as well as similar absorption characteristics with human milk fat.

For the production of human milk fat substitutes enriched with omega-3 FA (EPA and DHA), which is the fourth part of the study, good quadratic models were obtained for the responses [EPA+DHA (%) and oleic acid content (%)] by multiple regression and backward elimination. The targeted TAG product was aimed to contain omega-3 FA (EPA+DHA) and oleic acid at 5% and 40%, respectively. The optimal conditions generated from the models for the targeted product were [Sr: 12,4 mol/mol, T: 55°C and t: 24 h]. The model was further verified with the optimum conditions. The product was enriched with omega-3 FAs (EPA and DHA) with the potential to deliver both the health benefits associated with omega-3 FAs and the absorption characteristics/fatty acid composition similar to human milk fat. This SL may be an important ingredient for commercial use in infant formula and contribute to the infant nutrition and development.

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Gıdaların önemli bir bileşeni olan yağların özelliklerinin modifiye edilmesi veya insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri bilinen yağ asitleri ile zenginleştirilmesi sonucunda “yapılandırılmış yağlar (YY)”ın eldesi ve bu ürünlerin çeşitli gıda formülasyonlarında kullanımı günümüzde giderek artan uygulama alanı bulmaktadır. YY’lar, triağılglicerollerin (TAG) yapısı üzerinde yağ asitlerinin pozisyonlarının değiştirilmesi veya yeni yağ asitlerinin yerleştirilmesi ile oluşturulan özgün TAG yapılar olarak tanımlanmaktadır. YY’lar tedavi edici veya ürünün fonksiyonel özelliklerini iyileştirme amaçlı olarak ürün formülasyonlarında kullanılabildikleri, gibi doğrudan nutrasetik üretiminde de kullanımları mümkün olmaktadır. YY’lar, doğal TAG’lerden farklı olarak hidrojenasyon, interesterifikasyon, esterifikasyon, fraksinasyon, karıştırma ve hatta genetik yolla modifiye edilerek veya sentetik olarak üretilirler ve katı veya sıvı formda bulunabilirler (Akoh, 2002; Akoh ve diğ., 2002).

Yağların modifiye edilerek fonksiyonel hale getirilmeleri kimyasal yöntemlerle veya lipaz enzimleri ile katalizlenen interesterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarıyla veya yağlı tohumların/bitkilerin genetik yapısının değiştirilmesiyle gerçekleştirilebilmektedir. 1,3 spesifik lipazların kullanıldığı enzimatik yöntemler, kimyasal sentez ile elde edilmesi mümkün olmayan açılıgliserol karışımlarının üretilmesine olanak sağladıkları, spesifik oldukları ve daha uygun koşullarda gerçekleştirilebildikleri için YY’ların üretiminde öncelik kazanmış bulunmaktadır.

Enzimatik interesterifikasyon modifikasyonları ile, kakao yağı ikameleri, anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağlar, kısmi açılıgliseroller, modifiye balık yağı ürünleri, margarin yağları, ve çeşitli lipit ürünlerinin üretimi mümkün olabilmektedir. Ancak günümüzde, bu ürünler arasında spesifik yağ asidi kompozisyonuna sahip YY’lar, beslenme alanında potansiyel uygulama alanına sahip olması nedeniyle diğer ürünlere göre daha fazla ilgi çekmektedir (Şahin ve diğ., 2003).

Yeni doğan bebekler için anne sütü, hücreleri için gerekli olan yapısal komponentleri ve enerjiyi sağlayan tek doğal besin kaynağıdır. Bu nedenle, bebek beslenmesi ve

gelişimi açısından anne sütünün son derece önemli olduğu bilinmektedir. Anne sütünün en önemli bileşeni olan yağın gliserol molekülündeki özgün yağ asidi dizilimi bitkisel ve hayvansal yağlardan oldukça farklıdır. Anne sütü bileşimi beslenme, laktasyon (emzirme) devresi, ırk, genetik özellikler ve mevsim gibi birçok faktöre bağlı olarak değişim gösterse de genel olarak palmitik, oleik ve linoleik asitçe zengin TAG karışımıdır. Anne sütünde bulunan TAG'ler, anne sütünün toplam yağ asitlerinin %20-25'ini oluşturan palmitik asidi (C16:0) %60-70 oranında gliserol molekülünün sn-2 pozisyonunda, uzun zincirli doymuş veya doymamış yağ asitlerini ise sn-1,3 pozisyonlarında bulundurmaktadırlar (Jensen, 2001). Bu özgün yapı sadece anne sütü yağında görülmektedir. Yağların bağırsaklarda sindirimi sırasında 1,3 spesifik enzim olan pankreas enzimi rol almaktadır. Sindirim esnasında bu lipaz enzimi beslenme yoluyla alınan TAG moleküllerinin 1. ve 3. pozisyonlarında yer alan yağ asitlerini hidroliz etmekte ve bu hidroliz sonucunda 2-monoasilgliseroller (2-MAG) ve 1. ve 3. pozisyonundan ayrılan yağ asitleri karışımı oluşmaktadır. Açığa çıkan yağ asitlerinin büyük bir kısmı sütte bulunan kalsiyum iyonları ile tuz yaparak atılmaktadır. Bu durum bebeklerde enerji kaybına ve iskelet sisteminin gelişimi için gerekli olan kalsiyum gibi minerallerin kaybına neden olmaktadır (Innis ve diğ., 1995; Innis ve diğ., 1998; López-López ve diğ., 2001; Akoh ve Xu, 2002). Oysa, anne sütünde sn-2 pozisyonunda yer alan palmitik asit sindirim sırasında korunmakta ve 2-MAG olarak absorplanmakta olduğu için, anne sütü ile beslenen bebeklerde kalsiyum tuzu sabunu oluşumu hemen hiç gözlenmemektedir. Geleneksel ticari bebek mamalarında kullanılan bitkisel kaynaklı yağlarda, palmitik asidin %80'inden fazlası TAG'lerin 1. ve 3. pozisyonunda yer almakta ve bebeğin mamayı sindirimi sırasında, palmitik asit ve stearik asit gibi serbest yağ asitleri ile çözünmeyen kalsiyum tuzu sabunları oluşturmaktadır (Innis ve diğ., 1995; Innis ve diğ., 1998; Xu, 2000). Oysa, anne sütü ile beslenemeyen bebeklerin mamalarında kullanılan yağların yapısında, anne sütü yağına benzer şekilde, 2. pozisyonunda palmitik asit yüzdesi yüksek TAG'ler bulunması durumunda kalsiyum absorpsiyonu artmaktadır (Carnielli ve diğ., 1996).

Gamma-linolenik asit (GLA) (18:3n-6) linoleik asidin (LA, 18:2n-6) Δ 6-desaturaz ürünü olup, oluştuktan sonra hızla di-homo γ -linolenik aside (DGLA, 20:3n-6) dönüşmektedir. DGLA, prostaglandin E1 (PGE1) ve 15-OH DGLA gibi, bağışıklık sağlayan ve enflamatuvar hastalıkları önleyici hormonların öncüsü olan bir yağ

asididir. DGLA Δ 5-desaturaz enzimi ile araşidonik aside (AA, 20:4n-6) dönüşmektedir. GLA'nın şeker hastalığı, yüksek tansiyon, kanser, sikleroz, şizofreni, osteoporoz kardiyovasküler hastalıklar, cilt hastalıkları, alerji, iltihabi hastalıklar gibi birçok hastalık üzerine olumlu etki gösterdiği, bunların yanısıra LDL kolesterolü ve serum TAG seviyesini düşürmede, HDL kolesterolü yükseltmede, plak oluşumunu önlemede olumlu etkisinin olduğu yapılan klinik çalışmalar sonucunda iddia edilmiştir (Engler ve diğ., 1992; Elliot ve diğ., 1998; Senanayake ve Shahidi, 1999; Clough, 2001; Lumor ve Akoh, 2005). GLA'nın, aynı zamanda beynin gri kısmında ve retinanın yapısında bulunan, hücrelerin haberleşmesinde ikinci haberci olarak görev yapan AA'nın vücutta yapımında da önemli görevinin olduğu belirtilmektedir (Wainwright ve diğ., 2001).

Omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin; özellikle eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asitin (DHA) diyetle alındığında kardiyovasküler hastalıklar, kanser, yüksek tansiyon, bağışıklık sistemi, alerji, enflamatuvar, eklem iltihabı, şeker hastalığı ve depresyon gibi birçok hastalığın üzerinde etkili olduğu ispatlanmıştır. DHA beyinde bulunan YA'leri arasında en yüksek miktara sahiptir. DHA özellikle prematüre bebeklerde retina ve beynin normal fonksiyonlarını yerine getirmesinde, büyüme ve gelişmeyi hızlandırmada ve enflamatuvar hastalıkları önlemede önemli ve kompleks bir rol oynar (Akoh, 2002; Puiggros ve diğ., 2002; Özçelik ve Karaali, 2002; Sidhu, 2003).

Bu tez çalışması kapsamında, ülkemiz için taşıdığı ekonomik önemin yanısıra sağlık üzerine olumlu etkilere de sahip olduğu bilinen fındık yağı kullanılarak sn-1,3 spesifik lipaz enzimleri katalizörlüğünde gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimeleri ile anne sütü yağına benzer yapıda, ve ayrıca GLA, EPA ve DHA ile zenginleştirilmiş, bebekler için daha faydalı fonksiyonel özelliklerde YY'ların üretilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada ayrıca tepki-yüzey yöntemi kullanarak, anne sütüne benzer YY üretimi ve zenginleştirilmesi için reaksiyon koşullarının (substrat mol oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi) optimizasyonu ve modellenmesi de gerçekleştirilmiştir. Ülkemiz için büyük ticari öneme sahip olmasının yanısıra sağlık açısından da önemli bileşikleri içeren fındık yağının çalışmada kullanılması, gerek bu alanda yapılacak çalışmaların ilkinin oluşturması gerekse dünyanın önde gelen fındık üreticisi konumunda olan ülkemiz açısından önemlidir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Anne Sütü İle İlgili Bilgiler

Anne sütü, bebeklerin büyümesi ve gelişimi için gerekli olan besin öğelerini sağlaması hem de bebeğin bağışıklık sistemini geliştiren ve düzenleyen komponentlere sahip olması, kolaylıkla sindirilmesi, absorplanması bakımından yeni doğan bebekler için en ideal ve faydalı besin olarak kabul edilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, bebek maması üreticileri anne sütünü “altın standard” olarak tanımlamaktadır. Anne sütünde su, proteinler (kazein, laktalbumin, laktoglobulin), karbonhidratlar, vitaminler ve mineral maddeler bebeğin beslenmesi, vücut ve beyin gelişimi için dengelenmiş bir şekilde bulunmaktadır. Anne sütü yeni doğan bebeklerin ilk aylarında beslenmeleri, büyüme ve gelişmeleri için çok önemlidir. Anne sütü yağının kompozisyonu değişik türden hayvanların sütleri ile karşılaştırmalı olarak Tablo 2.1’de verilmektedir.

Tablo 2.1: Değişik türlerden elde edilen sütlerin 100 gramında bulunan besin öğeleri miktarları (Anon., 2006a).

	Süt türleri			
Bileşen	İnsan	İnek	Keçi	Koyun
Su, g	87,50	88,32	87,03	80,70
Enerji, kcal	70	60	69	108
Protein	1,03	3,22	3,56	5,98
Yağ, g	4,38	3,25	4,14	7,00
Kül, g	0,20	0,69	0,82	0,96
Karbonhidrat, g	6,89	4,2	4,45	5,36
Diyet lif, g	0	0	0	0
Toplam şeker, g	6,89	5,26	4,45	5,36
Kolesterol, mg	14	10	11	27

Bebekler günlük enerjilerinin %50-60’ını anne sütü yağından sağlarlar. Anne sütünün önemi ise, en önemli bileşeni olan yağın gliserol molekülündeki özgün yağ asidi diziliminin bitkisel ve hayvansal yağlardan oldukça farklı olmasından ileri

gelmektedir. Anne sütü bileşimi beslenme, laktasyon (emzirme) devresi, ırk, genetik özellikler ve mevsim gibi birçok faktöre bağlı olarak değişim gösterse de genel olarak palmitik, oleik ve linoleik asitçe zengin triaçilgliseroller (TAG) karışımıdır. Anne sütü yağı %98'den fazla miktarda TAG, %1 fosfolipit ve %0,5 sterol (çoğunlukla kolesterol) içerir. Yağlar sütte 4 µm çaplı globüller halinde ve suda yağ emülsiyonu şeklinde bulunurlar. Bu emülsiyon bipolar fosfolipid ve protein içeren bir membran ile stabilize edilmiştir. Polar olmayan TAG'ler globülün çekirdeğinde bulunur. TAG'lerin %90'ını ve toplam yağın %88'ini YA'leri oluşturur. Yağ asitleri annenin diyetiyle kompozisyonu değişebilen tek süt komponentidir (Jensen, 2001). Tablo 2.2'de sırasıyla çeşitli araştırmacılar tarafından [Winter ve diğ. (1993), Carnielli ve diğ. (1998), Jensen ve Jensen (1992) ve Lien ve diğ. (1997)] belirlenmiş olan anne sütü yağının yağ asidi kompozisyonu ve sn-2 pozisyonundaki yağ asitlerinin bileşimi görülmektedir (Akoh ve Xu, 2002).

Tablo 2.2: Anne sütünün çeşitli araştırmacılar tarafından saptanan YA kompozisyonu (%) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları (Akoh ve Xu, 2002).

Yağ asitleri	TAG	TAG	TAG	sn-2	TAG	sn-2
8:0	0,36	0,29				
10:0	2,56	1,9	2,9	1,6		
12:0	6,86	7,85	7,3	6,9	4,9	5,3
14:0	8,01	9,04	9,4	15,4	6,6	11,3
16:0	22,70	22,24	27,0	57,1	21,8	44,5
16:1n-7	2,29	2,22	3,6	1,6		
18:0	5,79	6,40	7,1	4,9	8,0	1,2
18:1n-9	30,54	35,11	34,2	8,1	33,9	9,2
18:2n-6	14,10	10,29	7,9	3,7	13,2	7,1
18:3n-3	0,75	0,47			1,2	
20:0	0,30	0,21				
20:1n-9	1,35					
20:2n-6	1,45					
20:3n-3	0,79					
20:4n-6	0,95	0,48				
20:5n-3	0,07	0,07				
22:0	0,19					
22:1n-9	0,30					
22:4n-6	0,39					
22:6n-3		0,26				

Tablo 2.2’den de görüleceği gibi, anne sütünde bulunan TAG’ler, anne sütünün toplam yağ asitlerinin %20-25’ini oluşturan palmitik asidi (C16:0) %60-70 oranında gliserol molekülünün sn-2 pozisyonunda, uzun zincirli doymuş veya doymamış yağ asitlerini ise sn-1,3 pozisyonlarında bulundurmaktadırlar. Bu özgün yapı sadece anne sütü yağında görülmektedir.

Tablo 2.3’de ise Jensen tarafından saptanan anne sütü yağının sn-1, sn-2 ve sn-3 pozisyonlarındaki YA dağılımı görülmektedir (Jensen, 2001).

Tablo 2.3: Anne sütü yağının YA dağılımı (% mol) (Jensen, 2001).

Yağ asitleri	TAG	sn-1	sn-2	sn-3
10:0	2,9	1,1	1,6	5,9
12:0	7,3	4,5	6,9	10,4
14:0	9,4	6,5	15,4	6,4
15:0	0,8	0,6	0,9	1,0
16:0	27,0	18,7	57,1	5,3
16:1n-7	3,6	3,4	1,6	5,8
18:0	7,1	14,2	4,9	2,2
18:1n-9	34,2	44,0	8,1	50,5
18:2n-6	7,9	7,2	3,7	12,7

2.1.1. Anne sütü yağının sindirimi

Yağların sindiriminde, sindirim enzimleri (lingual ve pankreatik lipaz) ve kolipaz gibi kofaktörler TAG’lerin başlıca sn-1 ve sn-3 pozisyonlarındaki ester bağlarını hidrolize eder. TAG’ların hidroliz ürünü sn-1 ve sn-3 pozisyonlarından açığa çıkan serbest yağ asitleri ve sn-2 pozisyonundan açığa çıkan MAG’lardır. Gastrik lipaz tercihan TAG’lerin sn-1 ve sn-3 pozisyonundaki esterleri 1:4 oranında hidrolize eder ve kısa zincirli YA’lerine karşı seçicidir. Süt TAG’lerinin %25’i midede sn-1,2 DAG’lere hidrolize olur. Sn-1,3 pozisyonlarına spesifik olan pankreatik lipaz geri kalan TAG’lere ve DAG’lere etki ederek serbest YA’leri ve 2-MAG açığa çıkartır. Sütte bulunan ve pozisyonel spesifikliği olmayan sütteki safra tuzu stimuleli lipaz (BSSL) enzimi geri kalan MAG’leri (2-monopalmitin ve 2-monoolein) ince bağırsakta hidrolize eder (Jensen, 2001). Bu ürünler ince bağırsak hücreleri tarafından absorplanarak, şilomikronlardaki TAG’lere lenflerde salgılanmak üzere yeniden düzenlenir (Innis ve diğ., 1998). Ancak yağ asitlerinin hepsi aynı derecede absorplanmaz. TAG molekülündeki YA’lerinin pozisyonu, doymamışlık dereceleri ve ortalama zincir uzunlukları YA’lerinin ince bağırsakta absorplanma derecelerini

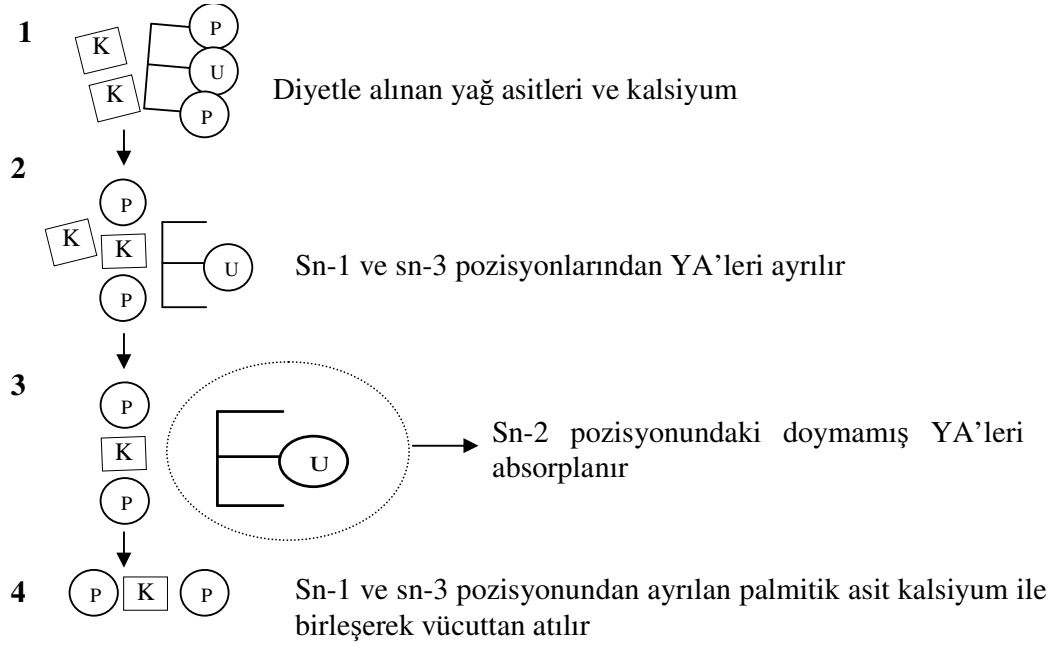
etkiler. Uzun zincirli ve doymuş YA'leri (C12-C18), orta zincirli (C6-C10) ve doymamış YA'lerine göre daha az absorplanır (Akoh ve Xu, 2002).

Palmitik asidin sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında bulunduğu TAG karışımları palmitik asidin sn-2 pozisyonunda bulunan TAG karışımlarına göre daha az derecede absorplanmaktadır. Geleneksel ticari bebek maması formülasyonlarında kullanılan bitkisel yağlarda palmitik asidin %80'inden fazlası TAG'ün sn-1,3 pozisyonlarında yer almaktadır (Innis ve diğ., 1995; Innis ve diğ., 1998; Xu, 2000). Bu tip yağların vücutta sindirimi sürecinde, doymamış yağ asitlerini içeren 2-monoaçilgliseroller (2-MAG) ve esterleşmemiş durumda palmitik ve stearik asit oluşmaktadır. Bitkisel yağlar veya inek sütü kullanılarak hazırlanmış bebek mamalarının sindirimi sırasında pankreatik lipazın etkisi ile sn-1,3 pozisyonlarından açığa çıkan serbest haldeki palmitik, stearik asit gibi uzun zincirli doymuş YA'leri kalsiyum gibi divalent katyonlarla birleşerek, bağırsağın alkali pH'sında çözünmeyen ve absorplanamayan “yağ asidi sabunları” oluşturmaktadır. Bu durum bebeklerde hem enerji kaybına hem de iskelet sisteminin gelişimi için gerekli olan kalsiyum gibi minerallerin kaybına neden olmaktadır.

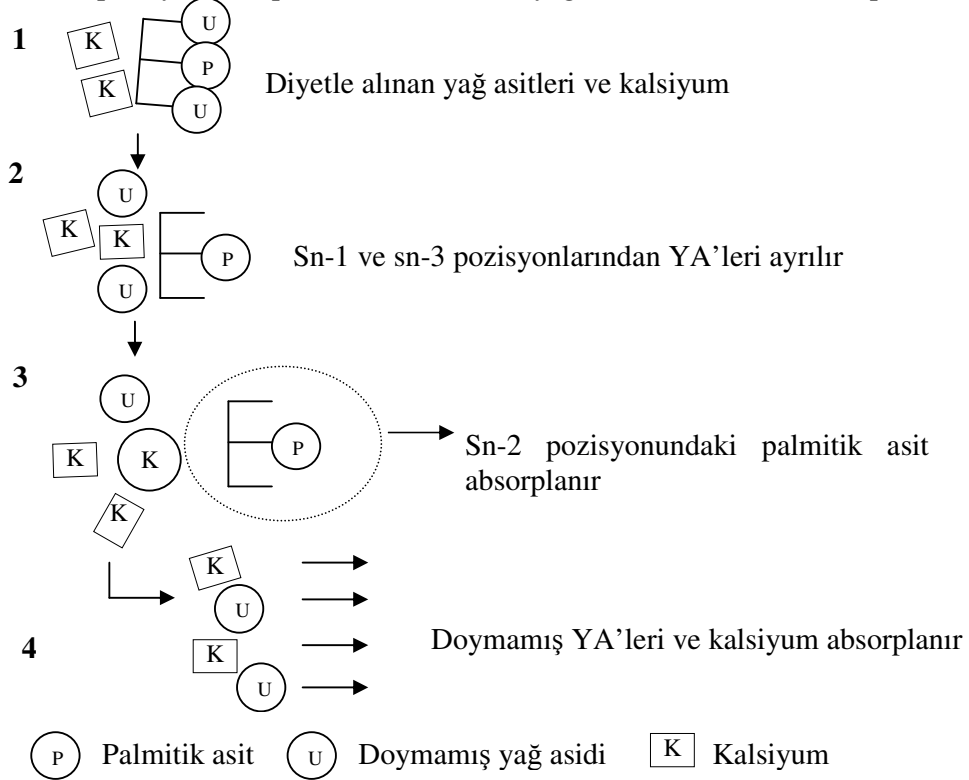
Palmitik asidi yüksek miktarlarda içeren ve TAG molekülündeki pozisyonu spesifik olarak belirtilmeyen geleneksel ticari bebek maması formülleriyle beslenen yeni doğmuş bebeklerde kalsiyum absorpsiyonu, alınan miktarın sadece %6'sı kadar gerçekleşirken, anne sütüyle beslenen bebeklerde bu oranın %51'e yükseldiği görülmüştür. Doymuş YA'lerinin zincir uzunluğunun artmasıyla azalan absorplanma, bu YA'lerinin çözünmeyen kalsiyum sabunları oluşturmaları nedeniyle hem enerjinin hem kalsiyumun kaybı şeklinde açıklanabilmektedir (Akoh ve Xu, 2002). Bu nedenle anne sütü yağının özgün YA dizilimi bebek beslenmesi ve gelişimi açısından büyük önem taşıdığı sonucuna varılmıştır (Innis ve diğ., 1995, Innis ve diğ., 1998, López-López ve diğ., 2001).

Palmitik asidi TAG'ün farklı pozisyonlarında içeren yağların vücutta sindirimi ve yağ asitlerinin absorpsiyonu için O'Shea ve arkadaşları tarafından özetlenen mekanizma şematik olarak Şekil 2.1'de gösterilmektedir (O'Shea ve diğ., 2006).

A. Sn-1 ve sn-3 pozisyonunda palmitik asit bulunan yağların sindirimi



B. Sn- 2 pozisyonunda palmitik asit bulunan yağların sindirimi (Ör: BetapolTM)



Şekil 2.1: Yağların vücutta sindirimi ve yağ asitlerinin absorpsiyon yolları (O'Shea ve diğ., 2006).

Bebek için anne sütü yağındaki bu özgün pozisyonu, bebeklerin sindirim, absorpsiyon metabolizmalarını olumlu etkileyen etmenlerden biri olduğu düşünülmektedir (Lien, 1994; Chandrasekharan ve Basiron, 2001). Quinlan ve diğ. (1995) bu hipotezi 30 bebekte test etmiş ve sonuçta bebek maması ile beslenen bebeklerin dışkılarının anne sütü ile beslenen bebeklere göre daha sert olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca, anne sütü ile beslenen bebeklerde yağ asidi kalsiyum sabunu oluşumu bebek maması formülasyonları ile beslenen bebeklerden önemli derecede düşük olmuştur. Anne sütü ile beslenen bebeklerde sabun oluşumu dışkının %3'ü (k.m.) kadarken, bebek maması ile beslenen bebeklerde bu oran %30 (k.m.)'a çıkmaktadır. Bu çalışma dışkı sertliğinin kalsiyum sabunları miktarı ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Quinlan ve diğ., 1995). Kalsiyum başlıca uzun zincirli yağ asitlerinin absorpsiyonunu etkilerken, kalsiyumun orta zincirli veya doymamış YA'lerinin absorpsiyonu üzerinde çok az etkisi vardır (Innis ve diğ., 1998; López-López ve diğ., 2001).

İnsan sütü yağının absorpsiyonu palmitik asidin pozisyonel dağılımının yanı sıra BSSL'nin varlığına ve yağ molekülünün yapısına bağlıdır. Anne sütünde yer alan BSSL'nin absorpsiyona etkisi incelenmiş ve laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda, sütün gastrik, pankreatik ve BSSL ile inkübasyonu sonucunda, süt TAG'leri gliserol ve esterleşmemiş YA'lerine hidrolize olmuştur. İnsan sütü yağının BSSL ile hidrolizinin tamamlanması insan sütü ile beslenen bebeklerin yüksek YA absorpsiyonuna sahip olmasını açıklayan diğer bir hipotezdir. Bu hipotez (hücre dışına sentezlenen lipaz sindirimi ile açığa çıkan esterleşmemiş YA) süt dışındaki kaynaklardan alınan palmitik asidin diğer YA'lerine göre daha az absorplanmasının nedeni ve memedeki süt bezlerinin bu TAG yapısını oluşturan spesifik etkisine zıt bir proses olarak ortaya konmaktadır (Innis ve diğ., 1998).

2.2. Yapılandırılmış Yağlar: Tanım ve Sınıflandırılması

Genel anlamda “yapılandırılmış yağlar (YY)” gliserol molekülünün doğal haldeki yağ asitlerinin pozisyonu değiştirilmiş veya uzun zincirli çoklu doymamış (ÇDYA) veya orta zincirli yağ asitleri spesifik olarak yerleştirilmek suretiyle yağ asidi profili değiştirilmiş TAG'ler veya yeni TAG eldesi için sentezlenen TAG'ler olarak tanımlanmaktadır (Akoh, 2002; Akoh ve diğ., 2002).

“Yeni jenerasyon yağlar” olarak da adlandırılan YY’lar, tedavi edici veya ürünün fonksiyonel özelliklerini iyileştirme amaçlı olarak ürün formülasyonlarında kullanılabildikleri gibi, doğrudan nutrasetik üretiminde de kullanımları mümkün olmaktadır (Akoh, 2002). Yapılandırılmış yağlar, doğal triağılgiserollerden farklı olarak hidrojenasyon, interesterifikasyon, esterifikasyon, fraksinasyon, karıştırma ve hatta genetik yolla modifiye edilerek veya sentetik olarak üretilebilirler ve katı veya sıvı formda bulunabilirler.

Lipaz enzimlerinin katalizörlüğünde gerçekleşen enzimatik interesterifikasyon modifikasyonları ile, kakao yağı ikameleri, anne sütü yağına benzer yapılandırılmış TAG’ler, kısmi açığılgiseroller, modifiye balık yağı ürünleri, margarin yağları, yapılandırılmış yağlar ve çeşitli lipit ürünlerinin üretimi mümkün olabilmektedir (Şahin ve diğ., 2003).

Yapılandırılmış yağlar gıdalardaki işlevleri ve tıbbi uygulamalardaki önemi açısından ikiye ayrılmaktadır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4: Yapılandırılmış yağların uygulama alanlarına göre sınıflandırılması (Osborn ve Akoh, 2002’den uyarlanmıştır).

Tıbbi ve nutrasetik uygulamalarda kullanılan yapılandırılmış yağlar	Gıdadaki işlevleri açısından yapılandırılmış yağlar
Bebek mamaları (formülleri)	Gıda uygulamaları için plastik yağlar
Zenginleştirilmiş yağlar (esansiyel yağ asitleri ve orta zincirli yağ asitleri ile)	Kakao yağı ikameleri
Enteral ¹ ve parenteral ² beslenme	Kızartma yağları
Kalorisi azaltılmış yağlar	

¹Enteral: ağızdan tüple beslenme, ²Parenteral: damardan serumla beslenme

2.2.1. Yapılandırılmış yağların enzimatik yöntemlerle üretilmesi

Lipaz enzimleri

Lipazlar (Triağılgiserol açığıldrolaz, E.C. 3.1.1.3) triağılgiserol’leri diağılgiserollere (DAG), monoağılgiserollere (MAG), serbest yağ asitlerine ve gliserole hidrolize eden enzimlerdir. Ayrıca, TAG’ların hidrolizinin yanı sıra TAG’lerin yağ asitleri ile interesterifikasyonunu veya serbest yağ asitlerinin gliserol ile direkt esterifikasyonunu da katalizler.

Lipazlar “suda çözünür enzim” sınıfından olup, suda çözünmeyen substratlara etki eden ve hem polar hem de polar olmayan ortamlarda kararlı olan ve heterojen reaksiyon sistemlerinde yağ-su arayüzeyinde aktif olan biyokatalizördürler. Ancak ortamda bulunabilecek serbest yağ asitleri lipaz aktivitesini bir miktar inhibe etmektedir. Özellikle suda çözünürlüğü az olan uzun zincirli yağ asitlerinin ve yüzey-aktif maddeler olan MAG’ler ile DAG’lerin de arayüzeyde birikmeleri lipaz aktivitesini önemli ölçüde azaltmaktadır (Marangoni, 2002).

Lipaz enzimlerinin, organik sentezlerde sıklıkla kullanılmalarının başlıca nedenleri, koenzimlere gerek duymamaları ve yüksek sıcaklıklarda organik çözgenlerle birlikte kullanıldıklarında stabil olmalarıdır.

Lipazlar TAG’lerin modifikasyonunda çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. Sulu ortamda, hidroliz baskın reaksiyon olurken, organik ortamda esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları baskın olmaktadır. Farklı kaynaklardan elde edilen lipazlar, farklı “hidrolitik pozisyonel seçicilik” ve “yağ asidi seçiciliği” gösterirler. Lipazlar pozisyonel seçiciliklerini organik ortam varlığında da devam ettirmektedir. Lipazların en yararlı özellikleri pozisyonel ve stereoseçici oluşu ve bu şekilde istenilen kimyasal kompozisyona ve yapıya sahip ürün elde edilmesinde kullanılabilmeleridir. Lipazlarla katalizlenen enzimatik interesterifikasyon tepkimelerinin kimyasal yöntemlere göre üstünlükleri ise şöyle sıralanabilir:

- Lipazların düşük aktivasyon enerjileri nedeniyle, katalizledikleri reaksiyonların, kimyasal katalistlere göre, daha düşük sıcaklıkta ve nötral pH’da gerçekleşebilmesi,
- Kimyasal katalistlerin TAG molekülünde yağ asitlerini rastgele düzenlemesi, istenilen fizikokimyasal özelliklere sahip özel ürünlerin eldesine olanak vermemesi, buna karşın lipazların seçiciliğinin ve substrata karşı aktivitelerinin yüksek olması nedeniyle istenilen özelliklere sahip ürün elde edilebilmesi,
- Elde edilen ürünlerin degradasyonunun ya çok düşük düzeylerde ya da hiç olmaması,
- Reaksiyonlarda daha kolay saflaştırılabilen ürün ve daha az atık oluşturmaları,
- Kimyasal katalistlerin çevre kirliliğine neden olmalarına karşın, lipazların doğada yok olabilmeleri,

- Lipaz enzimlerinin çok sayıda doğal reaksiyon sistemlerinde kullanılabilirliği,
- Çok çeşitli doğal kaynaklardan elde edilebilirliği,
- Özelliklerinin genetik mühendisliği ile geliştirilebilir olmasıdır (Lai ve diğ., 1998; Akoh, 2002; Xu ve diğ., 2000a, Xu, 2000).

Lipaz enzimlerinin seçiciliği

Lipazların katalizörlüğünde gerçekleşen enzimatik interesterifikasyonun kimyasal interesterifikasyona göre başlıca avantajı enzim seçiciliğidir. Lipazların yağ asidi seçiciliğinden, nutrasetik gıdalar için yapılandırılmış yağların üretiminde ve yağların besinsel özelliklerini arttırmak için yağların spesifik yağ asitleri ile zenginleştirilmesinde yaygın bir şekilde faydalanılmaktadır.

Lipaz enzimlerinin başlıca üç çeşit seçiciliği vardır: “Pozisyonel seçiciliği”, “substrat (yağ asidi) seçiciliği” ve “stereoseçiciliği”dir. Pozisyonel ve yağ asidi seçiciliği, genellikle sentetik TAG'lerin kısmi hidrolizi, ince tabaka kromatografisi ile ayırma; ardından tabakadan ekstraksiyonu ile hidroliz sırasında açığa çıkan yağ asitlerinin metil esterlerine dönüştürülmesinden sonra gaz kromatografisi kullanarak belirlenebilmektedir.

Candida rugosa, *Chromabacterium viscosum*, *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar yağ asitleri ile gliserol arasındaki ester bağlarını rastgele parçalarlar; bu kaynaklardan elde olunan lipazlar için gliserol molekülünün yerleşimi önemli değildir. Bazı lipazlar ise interesterifikasyon reaksiyonları sırasında hiç pozisyonel ya da yağ asidi seçiciliği göstermez. Bu lipaz enzimleri ile gerçekleştirilen tepkimeler sonucunda elde edilen ürünler, kimyasal tepkime ürünleri ile aynı özellikte ürün verir. *Candida cylindraceae*, *Corynebacterium acnes* ve *Staphylococcus aureus* bu gruptaki mikroorganizmalardan elde edilen lipaz enzimlerine örnektir (Marangoni, 2002).

Pozisyon seçiciliği olan lipazlar ise, sadece sn-1,3 pozisyonundaki yani TAG'lerin iki uç pozisyonundaki ester bağlarını parçalar. Bu gruba örnek olarak, *Aspergillus niger*, *Rhizomucor miehei* gibi organizmalardan elde edilen lipazlar verilebilir. Bazı lipazlar ise yağ asidinin zincir uzunluğuna göre seçici olup, *Penicillium cyclopium* lipazı gibi bazı lipazlar sadece uzun zincirli yağ asitlerini parçalar. *Geotrichum*

candidum lipazı gibi diğerk bazı yağ asidi seçici lipazlar ise sadece cis-9 pozisyonuna seçicidir.

Pozisyonel seçicilik

Pozisyonel seçicilik lipazların sterik engel nedeniyle TAG molekülünün sn-2 pozisyonuna atak edememesi sonucu oluşmaktadır. Sterik engel sn-2 pozisyonundaki yağ asidinin aktif bölgeye girmesini engellemektedir. Sn-1,3 seçici lipazlar varlığındaki enzimatik interesterifikasyon tepkimesi sonucunda TAG, 1,2 ve 2,3 DAG ve serbest yağ asitlerini içeren bir karışım oluşmaktadır. Ayrıca uzun reaksiyon süresi sonucunda açıl göç oluşabilmekte ve TAG molekülünün orta pozisyonunda bulunan yağ asitlerinin bir miktar rastgele dağılımına izin veren 1,3 DAG oluşumu da gerçekleşmektedir. Sn-1,3 seçici lipazlara *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, ve *Rhizopus delemar* lipazları örnek olarak verilmektedir (Marangoni, 2002; Huo, 2002).

Lipazların seçiciliği, fonksiyonel grupların veya substrat moleküllerinin reaktifliğine mikroçevresel etkenlerin etkisiyle değişebilmektedir. Bugün itibarıyla, sadece sn-2 pozisyonundaki yağ asitlerine seçici olan lipazların belirlenmesi zordur. Sulu ortamlarda, *Candida parapsilosis* lipazı sn-2 pozisyonunu sn-1 ve sn-3 pozisyonuna göre daha hızlı hidrolizlemekte ve ayrıca özellikle uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerine karşı seçicilik göstermektedir.

Enzimatik yolla interesterifiye edilmiş yağların besin değeri daha yüksek olan öğeler açısından zenginleştirilmelerinde bazı lipazların pozisyonel seçicilik göstermesi özelliklerinden yararlanılmaktadır. Örneğin, bağırsaklarda, 2-monoaçilgliserol'ler, sn-1 ve sn-3 monoaçilgliserollere göre vücutta daha kolaylıkla absorplanmaktadır. Balık yağları ve bazı bitkisel yağlar yüksek oranda esansiyel çoklu doymamış yağ asitlerini sn-2 pozisyonunda içermektedir. 1,3 seçici lipaz kullanarak, besin açısından önemli olan esansiyel yağ asidini sn-2 pozisyonunda tutarak ve 1. ve 3. pozisyonundaki yağ asitlerinin de kompozisyonları değiştirilerek istenilen spesifik TAG yapısı elde edilebilir. Kimyasal interesterifikasyon tepkimeleri ile TAG'lerdeki yağ asitleri tamamen rastgele düzenlendiği için, istenen özellikte ürün eldesi, yani daha yararlı olan yağ asitlerinin istenen pozisyonda tutulması pek gerçekleştirilemez (Xu, 2000).

Stereoseçicilik

Triaçilgliserollerde, sn-1 ve sn-3 pozisyonları sterik olarak farklıdır. Çok az lipaz sn-1 ve sn-3 pozisyonlarındaki başlıca esterleri ayırdedebilir. Stereoseçici lipazların kullanıldığı reaksiyonlarda, 1 ve 3 pozisyonları farklı hızlarda hidrolizlenir. Stereoseçicilik lipaz kaynağı ve açıl gruplar ile belirlenir ve arayüzeydeki yağ yoğunluğuna da bağlı olabilir. Ayrıca substrat konsantrasyonundaki artış da sterik engelden dolayı seçiciliği azaltabilmektedir.

Öte yandan, zincir uzunluğundaki farklılıklar lipazların seçiciliğini etkilemektedir. Örneğin, *Pseudomonas* ve domuz pankreatik lipazları, sadece belirli açıl gruplarını hidroliz ederek stereoseçicilik göstermektedir (Akoh ve Xu, 2002).

Yağ asidi seçiciliği

Birçok lipaz özel yağ asitlerine karşı seçicidir. Mikrobiyal lipazlar (*cis*-9 çift bağ içeren uzun zincirli yağ asitlerine seçicilik gösteren *G. candidum* lipazı dışında) çok az yağ asidi seçiciliği gösterir. Lipazlar ayrıca yağ asidi uzunluğuna karşı da seçicilik göstermekte, uzun, kısa veya orta zincir uzunluğuna sahip yağ asitlerine seçici olabilmektedir. Örneğin, domuz pankreatik lipaz enzimi kısa zincirli yağ asitlerine karşı seçici iken, *Penicillium cyclopium* lipazı uzun zincirli yağ asitlerine seçicidir. *Aspergillus niger* ve *A. delemar* lipazının ise hem orta hem de kısa zincirli yağ asitlerine karşı seçici olduğu belirtilmektedir. Organik ortamdaki interesterifikasyon reaksiyonlarında lipazlar belli alkol türlerine seçici olabilmektedir.

Bazı lipazların sahip olduğu yağ asidi seçiciliği kısa zincirli yağ asitlerinin süt aroması olarak kullanılmak üzere üretiminde ve balık yağlarının EPA ve DHA gibi yağ asitlerince konsantrasyonunun artırılmasında ticari ölçekte kullanılmaktadır (Akoh ve Xu, 2002).

Yapılandırılmış yağların üretiminde kullanılan bazı lipazların substrat ve pozisyonel (regio) seçicilikleri Tablo 2.5’de gösterilmektedir.

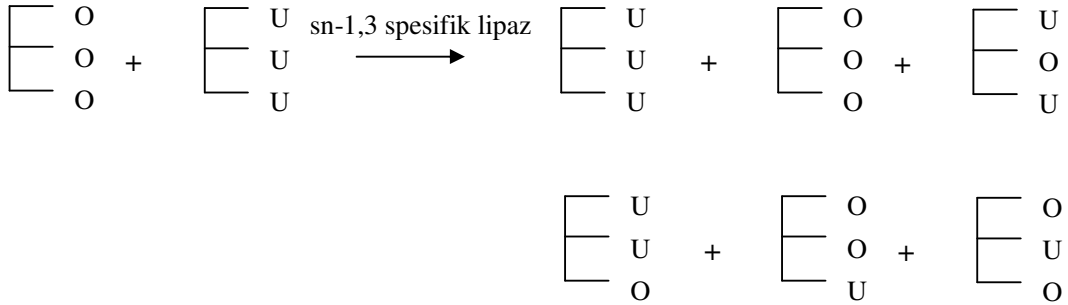
Tablo 2.5: Seçilmiş lipazların yağ asidi ve pozisyonel seçicilikleri (Xu, 2000).

Lipaz kaynağı	Yağ asidi seçiciliği	Pozisyonel seçicilik (sn)
Mikroorganizmalar		
<i>Aspergillus niger</i>	K, O, U	1,3 >>2
<i>Candida lipolytica</i>	K, O, U	1,3 >2
<i>Candida rugosa</i>	K, U >O	1,2,3
<i>Humicola lanuginosa</i>	K, O, U	1,3 >>2
<i>Chromobacterium</i>	K, O, U	1, 2, 3
<i>Rhizomucor miehei</i>	K >O, U	1,3 >>2
<i>Penicillium roqueforti</i>	K, O >>U	1,3
<i>Pseudomonas sp.</i>	K, O, U	1,3 >2
<i>Rhizopus deleamar</i>	K, O, U	1,2, 3
<i>Rhizopus oryzae</i>	M, L >K	1, 3>>>2
Bitkiler		
Kolza (<i>Brassica napus</i>)	K >O, U	1, 3 >2
Papaya (<i>Carica papaya</i>)		3
Hayvansal dokular		
Domuz pankreası	K >O, U	1, 3
Tavşan midesi	K, O, U	3

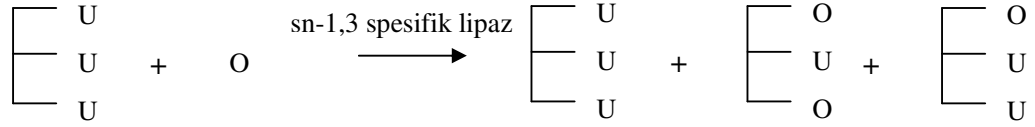
U: Uzun zincirli YA, O: Orta zincirli YA, L: Uzun zincirli YA

Yapılandırılmış yağların üretiminde lipaz enzimlerinin kullanımı

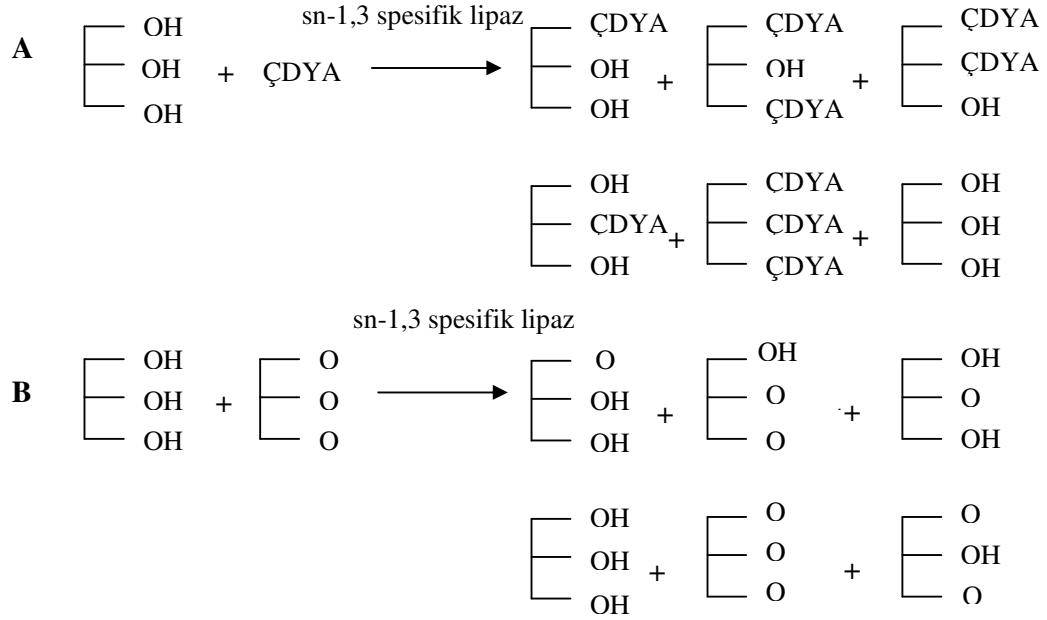
Lipaz katalizörlüğünde yapılandırılmış yağ üretiminde çeşitli metotların kullanımı mümkün olmakla birlikte, metot seçimi büyük oranda seçilen substratların tipine ve üretilmek istenen ürüne bağlıdır. İnteresterifikasyon reaksiyonları arasında, ticari öneme ve ilgiye sahip olan reaksiyonlar transesterifikasyon, asidoliz ve alkoliz'dir. Transesterifikasyon, 2 ester arasındaki, asidoliz asit ve ester, alkoliz ise alkol ve ester arasındaki açıl grupların transferidir (Şekil 2.2, 2.3 ve 2.4).



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



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



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

Yapılandırılmış yağların enzimatik yolla üretilmesini etkileyen bazı faktörler

Sıcaklık

Sıcaklığın enzim aktivitesini etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir. Her enzim için “optimum sıcaklık” aralığı, enzimin kaynağı olan mikroorganizmaya, immobilizasyon prosesine, enzimin kimyasal modifikasyonuna ve pH’ya bağlı olarak değişmektedir (Paez ve diğ., 2002). Literatürdeki tüm çalışmalarda, optimum bir hıza ulaşıncaya kadar, ortam ısındıkça enzim aktivitesinin arttığı ve sıcaklıktaki artışın açıl migrasyonunu hızlandırdığı belirtilmiştir (Mu ve diğ.,1998; Xu ve diğ. 1998). Enzim aktivitesinin sıcaklıkla değişim nedenine ilişkin ise literatürde farklı yorumlar bulunmaktadır. Wanasundara ve Shahidi (1999), bu durumu, enzimi üç boyutlu şeklinde tutan hidrojen bağlarının ve diğer zayıf çekim

kuvvetlerinin, çevredeki sıcaklık değişimlerine duyarlı olmalarıyla açıklar. Sıcaklığın artmasıyla inkorporasyon yüzdesindeki artışın nedeni olarak, sıcaklıkla ilişkili olarak substratın viskozitesinin düşmesiyle beraber, substrat ve enzim arasındaki temasın gelişmesi gösterilmektedir (Mu ve diğ.,1998; Xu ve diğ. 1998). Ancak, 60°C gibi ulaşılan optimum noktadan yüksek sıcaklıklarda, reaksiyon hızının artmayıp, hatta bir miktar azalması da, çoklu doymamış yağ asitlerinin bu sıcaklıklarda ısıl bozunmaya uğramaları ve ayrıca, lipaz enzimin de geri dönüşsüz olarak denature olacağı şeklinde açıklanabilir.

Reaksiyon süresi

Yağların enzimatik modifikasyon reaksiyonlarında sürenin etkisinin bilinmesi, hem reaksiyonun gelişiminin incelenmesi, hem de yüksek verim elde edilen en kısa sürenin belirlenerek proses için üretim maliyetinin düşürülmesi açısından önemlidir. (Akoh ve Moussata, 1998; Senanayake ve Shahidi, 1999).

Senanayake ve Shahidi (1999)'nin, hodan (*Borago officinalis*) (boraj) yağının yapısına DHA'yı *Candida antarctica* lipazı varlığında inkorpore ettikleri çalışmada, 24 saate kadar olan süre zarfında reaksiyondan elde ettikleri ürünün % DHA miktarı süre ilerledikçe artmıştır. Ancak 24 saatten sonra ürünün DHA içeriğinde önemli bir farklılık olmadığı bildirilmiştir.

Akoh ve Moussata (1998)'nın, *Candida antarctica* orijinli seçici olmayan SP 435 lipazı ve *Rhizomucor miehei* orijinli sn-1,3 seçici IM 60 lipazı katalizörlüğünde hodan yağına kaprik asit ve EPA inkorpore ettikleri çalışmada, inkübasyon süresi ilerledikçe inkorporasyon oranı artmıştır. Yine aynı çalışmada her iki enzim için de 10. ve 16. saatler arasında inkorporasyonda hızlı bir artış olduğu; ancak optimum inkorporasyonun 40 saat civarında sağlandığı bildirilmiştir.

Benzer şekilde, Akoh ve diğ. (1996) tarafından, *Candida antarctica* orijinli SP 435 lipazı katalizörlüğünde çuhaçiçeği (*Oenothera biennis* ve *O. lamarkiana*) yağının yapısına EPA inkorpore edilen çalışmada, 24 saate kadar olan süre zarfında EPA inkorporasyonunun arttığı, 24 saatten sonra ise herhangi bir artışın gözlenmediği bildirilmiştir.

Substrat mol oranı

Yağların enzimatik yöntemlerle modifiye edilerek, triağılglicerol yapılarına esansiyel yağ asitlerinin ilave edildikleri reaksiyonlarda, son üründe istenen esansiyel yağ asidi miktarına göre substratların; yani orijinal yağ ve inkorpore edilecek esansiyel yağ asidinin mol oranının istenilen düzeye ayarlanması mümkün olmaktadır.

Enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarında substrat mol oranının seçimi genellikle, proses maliyetine ve serbest yağ asitlerinin veya açıl donörlerinin evaporasyon ve/veya distilasyon ile uzaklaştırılmasındaki güçlüklerle ilgili olarak yapılmaktadır (Hoy ve Xu, 2001).

Senanayake ve Shahidi (1999), substrat olarak hodan yağı ve DHA, Akoh ve Moussata (1998), hodan yağı ve EPA, yine Akoh ve diğ. (1996), çuhaçiçeğı ve EPA kullandıkları çalışmada benzer bir sonuca ulaşarak; *n*-3 çoklu doymamış yağ asidi mol sayısı arttıkça inkorporasyon oranının arttığını bildirmişlerdir.

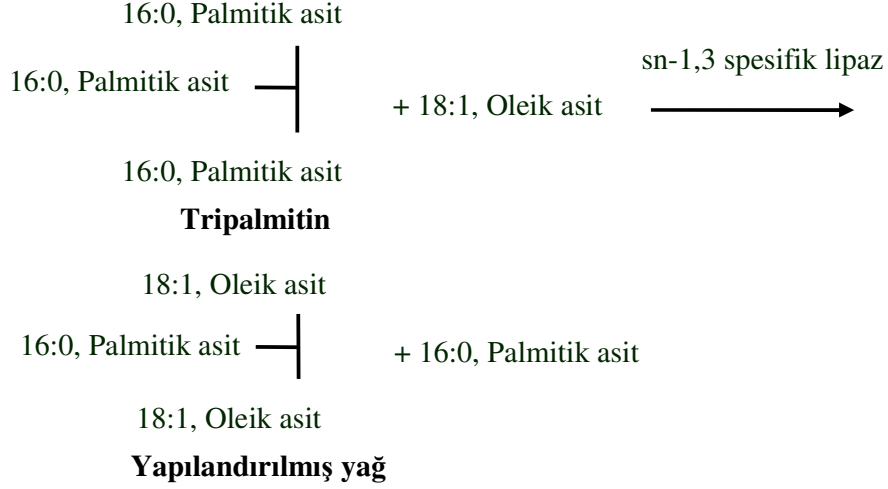
Mu ve diğ. (1998), yağ ve yağ asidi arasındaki mol oranın inkorporasyon ve açıl migrasyonuna etkisini inceledikleri çalışmada, yağ asidinin mol miktarının arttıkça inkorporasyonun da arttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, yüksek bir mol oran seçilerek reaksiyon hızının artırılacağı ve süre kısılacağı için, açıl migrasyonunun da bu yolla azaltılabileceğı önerilmiştir.

Ancak Jennings ve Akoh (2000), inkorpore edilecek olan yağ asidinin aşırı miktarda kullanılmasının maliyeti artırmanın yanısıra, lipaz inhibisyonuna da neden olabileceğini ve modifikasyon reaksiyonu büyük ölçekte gerçekleştirildiğinde ortamdaki fazla yağ asidinin uzaklaştırılırken ürün veriminin de düşebileceğini öne sürmüşlerdir.

2.3. Anne Sütü Yağına Benzer Yapılandırılmış Yağlar Üzerine Yapılan Çalışmalar

Anne sütü yağının benzeri olmayan farklı TAG yapısının, palmitik asidin özgün pozisyonunun, bebeklerin sindirim, absorpsiyon metabolizmalarını olumlu etkileyen etmenlerden biri olması, ve ayrıca bu yapının, bebek gelişimi için de spesifik ve önemli bir fonksiyonunun olması “anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların” üretimine olan ilgiyi artırmıştır.

Şekil 2.5’de gösterildiği gibi, palm yağından elde edilen tripalmitinin veya palm stearinin, bitkisel kaynaklı yağlarla veya bu yağlardan elde edilen oleik asit veya çoklu doymamış yağ asitleri ile sn-1,3 spesifik lipazlar katalizörlüğünde gerçekleşen interesterifikasyonu ile, anne sütündeki TAG’lere çok benzer yapıda TAG içeren yeni yağ ürünleri eldesi daha önce de gerçekleştirilmiştir (Xu, 2000).



Şekil 2.5: Tripalmitin ve oleik asit arasında sn-1,3 spesifik lipaz varlığında gerçekleşen enzimatik asidoliz tepkimesinin şematik olarak gösterimi

Literatürde yer alan çalışmalardan ilki, süt yağının tutuklanmış sn-1,3 seçici lipaz enzimi katalizörlüğünde modifiye edilerek anne sütü yağına benzer YY üretimidir. Bu çalışma sonucunda başlıca %43,52 oleik, %22,5 palmitik, %10,76 linoleik asit, %0,31 EPA ve %0,13 DHA içeren yapılandırılmış TAG ürünü elde edilmiştir. Çalışma sonucunda sn-2 pozisyonunda %34,96 palmitik, %31,48 oleik, %11,74 miristik asit bulunan bu yapılandırılmış yağın bebek maması formülasyonlarında kullanımının uygun olduğu görüşüne varılmıştır (Christensen ve Holmer, 1993).

Mukherjee ve Kiewitt (1998)’in yaptıkları çalışmada, düşük erüsk asitli kolza yağı serbest yağ asitleri ile tripalmitin’in enzimatik asidolizinde, hem *Carica papaya* bitkisinden elde ettikleri lipaz enzimini hem de Lipozyme IM 20 ticari lipazını kullanmışlardır. Asidoliz reaksiyonunda 404 mg tripalmitin, 140 mg kolza yağ asidi (mol substrat oranı:1:1) ve 54 mg lipaz (substratların ağırlıkça %10’u kadar) manyetik karıştırıcı yardımıyla çözücüsüz ortamda 60°C sabit sıcaklıkta karıştırılmıştır. Belirli zaman aralıklarında hekzan içine alınan numunelerin yağ asitleri bileşimi gaz kromatografisi cihazı ile belirlenmiştir. 6 saat sonunda, papaya lateks enzimi ile % 60 palmitik asit ve % 25 oleik ve %10 linoleik asit içeren TAG

ürünü elde edilirken, Lipozyme IM lipazı ile ise % 75 palmitik asit, %20 oleik asit ve %5 linoleik asit içeren TAG ürünü elde edilmiştir (Mukherjee ve Kiewitt, 1998).

Schmid ve diğ. (1998) tarafından yapılan diğer bir çalışmada, tripalmitin, balık yağı ve oleik asit Lipozyme IM katalizörü varlığında hekzan ve metil tert-bütül eter (MTBE) çözücü ortamında manyetik karıştırıcı yardımıyla reaksiyona sokulmuştur. 2-mono palmitin (2-MP) ve oleik asidin esterifikasyonu ile elde edilen 1,3 oleol-2-palmitol gliserol (OPO) ürününün verimi %72'den yüksek ve sn-2 pozisyonundaki palmitik asit yüzdesi % 94 bulunurken, balık yağının alkolizi ile elde edilen 2-MG ürünü %84 verim ve %95 saflıkta elde edilmiştir (Schmid ve diğ., 1998).

Bir başka çalışmada ise substrat olarak yine tripalmitin ve oleik asit kullanılmış, Lipozyme IM lipaz enzimi ile hekzanlı ortamda reaksiyon gerçekleştirilmiştir (Chandler ve diğ., 1998).

Schmid ve diğ. (1999) 1,3-oleol 2-palmitolgliserol (OPO) üretimi için lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen iki aşamalı (alkoliz ve esterifikasyon) reaksiyon sistemi kullanmışlardır. İlk aşamada tripalmitinden sn-1,3 spesifik lipaz varlığında alkoliz reaksiyonu ile 2-MP üretilmiş ve bu ürün %95'den daha fazla saflığa çıkarılarak n-hekzan varlığında oleik asit esterleştirilmiştir. Son ürün sn-2 pozisyonunda %96 palmitik asit ve sn-1,3 pozisyonunda %90 oleik asit içermiştir.

Shimada ve diğ. (2000) tripalmitinin araşidonik asit (AA) ile 1,3 spesifik *Rhizopus delemar* lipazı ile asidolizi sonucunda 1,3-araşidonil-2-palmitol-gliserol (APA) ürünü sentezlemişlerdir. Ürünün sn-2 ve sn-1,3 pozisyonundaki AA içeriği sırasıyla %3,2 ve % 56,9 olarak bulunmuştur. Nagao ve diğ. (2001)'nin da sn-1,3 spesifik *Fusarium heterosporum* lipazını kullanarak tripalmitinin oleik asit ile asidolizi sonucunda %8 triolein (OOO), %36 1,3-dioleol-2-palmitol-gliserol (OPO), %4 1,2-dioleol-3-palmitol-gliserol (OOP), %28 1,2-palmitol-3-oleol-gliserol (PPO), %1 1,3-dipalmitol-2-oleol-gliserol (POP) ve %6 PPP'dan oluşan bir TAG karışımı elde etmişlerdir.

Anne sütü yağına benzer TAG üretimi ile ilgili olarak yapılan diğer bir çalışmada, Yang ve diğ. (2003a)'nin domuz yağı ile soya yağı asitlerini asidoliz reaksiyonlarında kullanmışlardır. Öncelikle soya yağından yağ asitleri sabunlaşma yapılarak elde edilmiş, ve 1'er gram domuz yağı ve soya yağı serbest yağ asitleri kullanılarak Lipozyme RM IM lipaz enzimi katalizörlüğünde çözücüsüz ortamda

asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Elde ettikleri ürünlerin yağ asitleri bileşimi ve TAG'lerin sn-2 pozisyonundaki yağ asitleri bileşimi gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. Reaksiyon sıcaklığı, enzim miktarı, su miktarı, substrat oranı ve sürenin reaksiyona etkisinin incelendiği bu çalışmada, optimum sıcaklığın 61°C, optimum mol oranının (domuz yağı:yağ asitleri) 1:2,4 olduğu, enzim miktarının toplam substrat miktarının %13,7 kadar olması gerektiği ve su miktarının %3,5 olduğu bulunmuştur. Bu optimum koşullar altında, elde edilen TAG ürününün sn-2 pozisyonunda başlıca % 71,1 oranında palmitik asit, %15,3 linoleik asit bulunduğu tespit edilmiştir (Yang ve diğ., 2003a). Bu çalışmanın büyük ölçekli üretimi, dolgulu yatak biyoreaktörü kullanılarak gerçekleştirilmiş ve ürün kısa yollu distilasyon ünitesi ile saflaştırılmıştır. Elde edilen anne sütü yağına benzer YY'ın ticari olarak mevcut olan anne sütü yağına benzer YY ile, YA kompozisyonu, antioksidan miktarı ve oksidatif stabilitesi karşılaştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen YY'ın stabilitesinin ticari bitkisel yağ karışımlarına, domuz yağına ve ticari anne sütü yağına benzer YY'lara göre oksidatif stabilitesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Buna neden olarak, antioksidanların üretim sırasında ayrılmış olabileceği düşünülmektedir. Bir sonraki çalışmada, üretim sırasında antioksidan ilavesi ile oksidatif stabilitenin artırılıp artırılamayacağını incelenmesi düşünülmüştür (Nielsen ve diğ., 2004).

Bir başka çalışmada da, omega-3 yağ asitleri ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY üretimi tripalimitin ve n-3 ÇDYA yağ asitleri ile Lipozyme TL IM enzimi katalizörlüğünde asidoliz reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada reaksiyon koşullarının (süre, enzim miktarı, substrat mol oranı) optimizasyonu Tepki-Yüzey Yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Optimizasyon çalışması sonucunda, substrat mol oranının, enzim miktarının ve reaksiyon süresinin sırasıyla 5 mol/mol, %20 ve 20 saat olduğu koşullar optimum koşul olarak bulunmuş ve TAG ürününde %42 oranında omega-3 yağ asitleri ile zenginleştirme sağlanmıştır (Yang ve diğ., 2003b).

Chen ve diğ. (2004) palm yağından 3 aşamalı yöntemle (düşük sıcaklıkta fraksinasyon, esterifikasyon ve asidoliz) OPO elde etmiştir. Son aşamada elde edilen açilgliserol karışımındaki TAG miktarı %97 olurken TAG molekülüne %66,1 oranında oleik asit dahil olmuştur. TAG molekülündeki sn-2 pozisyonu da % 90,7 palmitik, % 9,3 oleik asit içermiş ve son ürünlerdeki OPO miktarı ise yaklaşık %74 olmuştur.

Srivastava ve diğ. (2006) yaptıkları çalışmada *Candida rugosa* LIP1 lipazını kullanarak hem tripalmitinin oleik asit ile hem de metil oleat ile transesterifikasyonu sonucunda palmitik ve oleik asit içeren anne sütüne benzer YY elde etmişlerdir. Reaksiyon süresi, reaksiyon sıcaklığı ve substrat mol oranının oleik asit inkorporasyonuna etkisi incelenmiştir. Biyokatalizör olan LIP1 lipazı ticari Lipozyme RM IM lipazı ile de karşılaştırılmış ve sonuç olarak Lipozyme RM IM lipazı ile elde edilen YY'ların anne sütü yağına benzer yağ eldesinde kullanımının daha uygun olduğu görüşüne varılmıştır.

2.3.1. Ticari yapılandırılmış yağ ürünü: Betapol™:

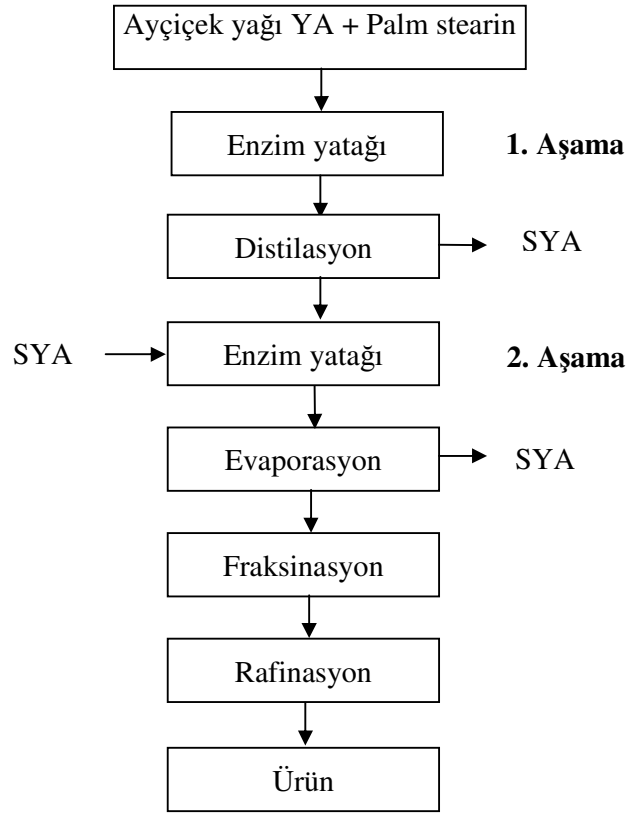
Yapılan tüm bu araştırma çalışmalarının dışında ticari olarak piyasaya sürülen Betapol™ adlı anne sütü yağı ikamesi ürünü bebek maması formülasyonlarında kullanılmak üzere Lipid Nutrition B.V. (Loders Croklaan) tarafından geliştirilmiştir (Mukherjee ve Kiewitt, 1998; Xu, 2000; Anon., 2006b). Bir diğer deyişle, Betapol™, Lipid Nutrition B.V. (Loders Croklaan) şirketi tarafından bitkisel kaynaklı yağlardan üretilen, anne sütü yağının özgün yapısına çok benzer yapıda yapılandırılmış TAG'ün ticari isimidir. Betapol, susuz ortamda *Rhizomucor miehei*'den elde edilen sn-1,3 seçici lipazı katalizörlüğünde modern enzim teknolojisi ile üretilmektedir. Anne sütü yağında bulunan palmitik asit TAG'lerin sn-2 pozisyonunda, doymamış yağ asitleri ise sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında bulunmaktadır. Betapol, başlıca 1,3-dioleol 2-palmitol gliserol (OPO) ve 1,2-dipalmitol 3-oleol gliserol (PPO) içeren bir TAG karışımı olup sn-2 pozisyonunda % 45 civarında palmitik asit içermektedir.

Betapol üretimi Şekil 2.6'da gösterildiği gibi tripalmitin ve oleik asit arasında lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen asidoliz tepkimeleriyle üretilmektedir.



Şekil 2.6: Betapol üretimi için sn-1,3 seçici lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen asidoliz reaksiyonunun prensibi (Akoh ve Xu, 2002).

Endüstriyel olarak Betapol üretimi için Şekil 2.7'de akım şeması gösterilen iki aşamalı reaksiyon sistemi kullanılmaktadır.



Şekil 2.7: Betapol'ün üretim akış diyagramı (Xu, 2000).

Reaksiyon *Rhizomucor miehei*'den elde edilen immobilize lipaz enzimi kullanılarak dolgulu yatak biyoreaktörde 70°C sıcaklıkta ve susuz ortamda gerçekleştirilmektedir. Betapol üretimi için kullanılan tripalmitin ve oleik asitin saf olmadığı bildirilmekte, ancak kaynağı ve saflık yüzdesi açık olarak literatürde belirtilmemektedir. Palm stearin kolay bulunabilirliği ve ucuz olması bakımından tripalmitin kaynağı olarak kullanılabilen en iyi kaynaklardan birisidir. Palm stearin uygulanan fraksinasyon işlemine göre % 50-60 oranında PPP içerebilmektedir. Geri kalan kısmı POP ve PPO/OPP'dır. PPP miktarı özel fraksinasyon işlemi uygulandığı takdirde %70-80'e çıkartılabilmektedir. Oleik asit kaynakları olarak ise nispeten ucuz olan yüksek oleik asit içeren ayçiçek yağı veya %70-80 oleik asit içeren zeytinyağı veya çaytohumu yağından elde edilen yağ asitleri karışımı kullanılabilir.

%70-80 oleik asit içeren zeytinyağı veya çaytohumu yağından elde edilen yağ asitleri karışımı kullanılabilir.

Çin ve diğer Asya ülkelerinde yetişen *Urushi wax* adındaki meyve ağacı yağının % 60 PPP içerdiği ve bu yağın sabun ve yağ asitleri üretiminde kullanıldığı

belirtilmektedir. Bu yağın Betapol üretimi için substrat kaynağı olarak kullanımı için araştırma yapılabilir.

Betapol üretimi sırasında reaksiyon dengeye ulaştıktan sonra reaksiyondaki TAG'lerin miktarı oleik asit ve tripalmitinin oranlarına bağlı olmaktadır. Yüksek substrat mol oranı reaksiyon dengesini ürün (OPO) oluşumu yönünde etkilerken, denge süresi de substrat mol oranının artmasıyla artar. Bu nedenle, spesifik reaksiyon sisteminde reaksiyon verimi (birim sürede dahil olan oleik asit miktarı) ve ürün miktarını (birim sürede elde edilen ürün miktarı) arttırmak için gerekli olan substrat mol oranının uygun seçilmesi çok önemlidir. Yüksek substrat mol oranı uygun ürün eldesi için gerekli olan reaksiyon süresini kısaltırken, ürünün saflaştırılması daha zor olabilmektedir. 3:1 (O:PPP) substrat mol oranı, dengeden sonra % 48 PPO/OPP, % 36 OPO, ve % 16 PPP şeklinde olacaktır. Saflaştırma ve fraksinasyondan sonra PPP uzaklaştırılabilir. Fraksinasyon işlemi çözgen ile veya çözgensiz olarak yapılabilir.

Ticari Betapol'ün (Betapol 45) üretici firması tarafından belirtilen spesifikasyonu Tablo 2.6'daki gibidir. Sn-2 pozisyonundaki palmitik asit yüzdesi Betapol 45'in kataloğunda %43 olarak belirtilirken bu oranın % 60-% 80 arasında değiştiği de belirtilmektedir. Tablo 2.6'da belirtilen spesifikasyonlara göre, katılım yüzdesi çok yüksek olmadığından dolayı, Betapol'ün üretimi için % 50 PPP içeren bir substrat kullanılmış olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 2.6: Ticari Betapol'ün (Betapol 45) YA kompozisyonu (Anon., 2006b).

Yağ asidi	Betapol 45 (% ağırlık)
C12:0	11,8
C14:0	4,5
C16:0	22,7
C18:0	3,1
C18:1	40,5
C18:2	13,5
C18:3	1,5
Diğerleri	2,7
Serbest yağ asitleri, % oleik asit cinsinden	0,08

Tablo 2.7'de ise Betapol'ün farklı araştırmacılar [Innis ve diğ., 1995; Innis ve diğ., 1993; Innis ve diğ., 1996, Fouw ve diğ., 1994; Zampelas ve diğ., 1994, Zock ve diğ.,

1996, Lucas ve diğ., 1997, Summers ve diğ., 1998] tarafından saptanan yağ asidi kompozisyonu ve TAG'lerin sn-2 pozisyonundaki YA oranları yer almaktadır.

Tablo 2.7: Betapol'ün çeşitli araştırmacılar tarafından saptanan YA kompozisyonu ve TAG'lerin sn-2 pozisyonundaki YA oranları (%) (Akoh ve Xu, 2002).

Yağ asitleri	TAG	sn-2	TAG	sn-2	TAG	sn-2	TAG	sn-2	TAG	sn-2
8:0	0,6	-							1,7	
10:0	0,4	-							1,3	
12:0	3,3	4,7					1,0	1,4	10,1	
14:0	1,8	1,7	1,0	1,9	1,3	1,9	2,7	4,3	4,2	
16:0	29,6	69,9	30,4	72,7	31,1	67,8	27,4	53,5	23,9	73,9
16:1n-7			0,1	-	0,2	-			0,4	
18:0	3,1	2,6	3,2	6,9	1,9	2,7	8,1	6,9	3,1	
18:1n-9	40,6	13,7	51,5	14,7	51,7	22,6	42,1	20,9	36,0	
18:2n-6	16,4	6,5	13,3	3,6	12,6	3,6	11,2	7,2	16,3	
18:3n-3	3,2	0,8	0,1	-	0,1	1,4			2,1	
20:0	0,4								0,2	
20:1n-9	0,1									
22:0	0,1									

2.3.2. Betapol™ ile yapılan klinik çalışmalar

Betapol™'ün eşdeğerliliği özelliklerinin palm yağı ile mukayese edilmesiyle değerlendirilmiş ve bu amaçla %15 Betapol içeren diyet ile % 15 palm yağı (palm olein) içeren diyet ve negatif veya %2,3-4,7 yağ içeren standart kontrol diyetiyle karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonunda Betapol'ün genel, üreme ve doğum sonrası toksisitesi hakkında beklenmeyen bir toksisiteye sahip olmadığı ve besin değeri bakımından ise üstün tarafları olduğu gözlenmiştir (Spurgeon ve diğ., 2003).

Normal sürelerinde doğan bebekler üzerinde yapılandırılmış yağlar ile yapılan çalışmalar

Yapılandırılmış yağların etkilerinin normal sürelerinde doğan bebeklerdeki yağ, yağ asitleri ve kalsiyum absorpsiyonu gibi özellikleri çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir (Carnielli ve diğ., 1995a, Carnielli ve diğ., 1995b, Carnielli ve diğ., 1996, Lucas ve diğ., 1997).

Carnielli ve diğ. (1996) benzer miktarlarda palmitik asit içeren fakat palmitik asidi TAG molekülünün sn-2 pozisyonunda farklı miktarlarda içeren formülasyonlar ile beslenen bebeklerdeki farklılıkları incelemişlerdir. Bu çalışmada erkek bebekler sn-2 pozisyonunda farklı miktarlarda palmitik asit içeren 3 formülasyon ile beslenmişlerdir: β formülasyonu (Betapol içeren): %23,9 palmitik asit ve sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarı %66 olan, ikinci formülasyon: %24 palmitik asit ve sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarı %39 olan, üçüncü formülasyon: %19 palmitik asit ve sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarı %13 olan, ve sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında başlıca palmitik asit içeren formülasyon olarak belirlenmiştir. Her gruptan 9 bebek en az 5 haftalık olana kadar bu formülasyonlar ile beslenmişlerdir ve çalışma sonucunda β formülasyonu ile beslenen bebeklerdeki yağ atılımı (0,15 g/kg/gün) diğer iki formülasyonla beslenen bebeklere göre daha düşük (ikinci formülasyon: 0,44 g/kg/gün, üçüncü formülasyon: 0,68 g/kg/gün, $p<0,05$) bulunmuştur.

Betapol ile beslenen bebeklerin ince bağırsaklarda yağ absorpsiyonu (%97,6), ikinci (%93) ve üçüncü formülasyonla (%90, $p<0,05$) beslenen bebeklere göre önemli derecede daha yüksek bulunmuştur. Bunun yanı sıra, β formülasyonu ile beslenen bebeklerdeki laurik asit (%95,5), miristik asit (%83,7), palmitik asit (%96,5) ve stearik asidin (%91,2) ince bağırsaktaki absorpsiyonu diğer formülasyonlarla beslenen bebeklere göre (ikinci formülasyon: %81,3, 30,6, 86,3 ve 82,3, üçüncü formülasyon: %76,1, 11,0, 78,1, 75,5; $p<0,05$) daha yüksek bulunmuştur. Kalsiyumun vücuttan atılımı β formülasyonu ile beslenen bebeklerde (43,4 mg/kg/gün) diğer iki formülasyona (ikinci formülasyon: 59,9 mg/kg/gün, üçüncü formülasyon: 68,4 mg/kg/gün; $p<0,05$) göre daha düşük bulunmuştur. Kalsiyum atılımı ile yağ ve yağ asitlerinin atılımı arasında önemli bir korelasyonun olduğu görülmüş, en yüksek korelasyonun palmitik asit ($r=0,84$), oleik asit ($r=0,60$) ve linoleik asit ($r=0,51$; $p<0,05$) arasında olduğu gözlenmiştir.

Özet olarak, yağ, yağ asitleri ve kalsiyum absorpsiyonu anne sütündeki gibi palmitik asidi başlıca sn-2 pozisyonunda yüksek miktarlarda içeren YY'da palmitik asidi sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında içeren yağlara göre daha fazla olmaktadır (Carnielli ve diğ., 1996). Ayrıca Carnielli ve diğ. (1995a) yapılandırılmış yağlar ile beslenen bebeklerin dışkılarının diğer formüllerle beslenen bebeklerinkine göre daha yumuşak olduğunu ve dışkı sertliğinin dışkıdaki yağ asitleri miktarına bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir.

Kennedy ve diğ. (1999)'nin yaptıkları diğ. bir çalışmada ise bebekler 12 hafta süreyle sn-2 pozisyonunda farklı miktarlarda palmitik asit bulunan iki farklı (%12 ve % 50, sırasıyla) formülasyonla beslenmişlerdir. Sonuçta sn-2 pozisyonunda yüksek miktarda palmitik asit içeren formülasyon ile beslenen bebeklerin kemiklerindeki mineral miktarının ($128,1 \pm 9,7$ ve $122,7 \pm 10,1$ g) diğ. formülasyon ile beslenen bebeklere göre önemli derecede yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir ($p=0,05$). Anne sütü ile beslenen bebeklerin kemiklerindeki mineral miktarı ($128,3 \pm 9,1$ g) ve sn-2 pozisyonunda yüksek miktarda palmitik asit içeren formülasyonlarla beslenen bebeklerin kemiklerindeki mineral miktarı kontrol formülü ile beslenen bebeklere göre ($p<0,02$) önemli derecede yüksek olarak bulunmuştur. Sn-2 pozisyonunda yüksek miktarda palmitik asit içeren formülasyon ile beslenen bebeklerin dışkı 6. ve 12. haftaların sonunda daha yumuşak bulunmuş ve kontrol formülleri ile beslenen bebeklere göre yağ asidi sabunu oluşumu daha az oluşmuştur.

López- López ve diğ. (2001) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise bebekler anne sütü ve palmitik asidi sn-2 pozisyonunda farklı miktarlarda içeren iki farklı formülasyonla beslenmiş (1. formülasyon: Sn-2 pozisyonunda %44,5 palmitik asit bulunan; 2. formülasyon: Sn-2 pozisyonunda %19 palmitik asit bulunan) ve 1. formülasyon ile beslenen bebeklerde absorplanan toplam yağ asitleri ve palmitik asit miktarları diğ. formülasyon ile beslenen bebeklerinkinden daha yüksek bulunmuştur.

Palmitik asidi yüksek miktarlarda içeren ve TAG molekülündeki pozisyonu spesifik olarak belirtilmeyen formüllerle beslenen yeni doğmuş bebeklerde kalsiyum absorpsiyonu alınan miktarın sadece %6'sı kadar gerçekleşirken, anne sütüyle beslenen bebeklerde bu oran %51'e yükselmiştir (López- López ve diğ., 2001).

Erken doğan bebekler üzerinde yapılandırılmış yağlar ile yapılan çalışmalar

TAG molekülündeki yağ asitlerinin pozisyonel dağılımı anne sütü yağına benzer olan Betapol ile erken doğan bebekler üzerinde çeşitli araştırmacılar tarafından çalışmalar yapılmıştır. Carnielli ve diğ. (1995b) farklı formülasyonlara sahip mamalarla beslenen erken doğan bebeklerdeki yağ asitleri ve kalsiyum absorpsiyonunu incelemişlerdir. Öncelikle 12 bebek (28-32 haftalık) sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarı farklı iki formülasyon ile beslenmek üzere tesadüfi olarak seçilmiştir. İlk formülasyon (α formülasyonu) %25,7 palmitik asit

içeren ve bunun %9,8'i sn-2 pozisyonunda bulunan, ikinci formülasyon (β formülasyonu) ise %25,4 palmitik asit içeren ve bunun da %58'i sn-2 pozisyonunda bulunan formülasyonlardır. Bebeklerin yarısı 1 hafta süreyle önce α formülasyonu ile daha sonra β formülasyonu ile beslenmiş, diğer yarısı ise önce β formülasyonu ile daha sonra α formülasyonu ile beslenmiştir. Kalsiyumun vücuttan atılımı β formülasyonu ile beslenen bebeklerde (58,8 mg/kg/gün) α formülasyonu (82,0 mg/kg/gün) ile beslenen bebeklere göre daha düşük olmuştur. Bu sonuçların aynı zamanda yağ ve miristik asit ($r=0,42$), palmitik asit ($r=0,46$) ve stearik asit ($r=0,42$) gibi YA'lerinin atılımı ile de ilişkili olduğu gözlenmiştir. İki farklı formülasyon (β ve α) ile beslenen bebeklerin dışkılarındaki miristik, palmitik, stearik oleik ve linoleik asit konsantrasyonları karşılaştırıldığında, β formülasyonu ile beslenen bebeklerde miristik, palmitik, stearik asit konsantrasyonları ($p<0,001$) daha düşük, oleik asit ve linoleik asit konsantrasyonları ($p<0,001$) ise daha yüksek bulunmuştur. β formülasyonu ile beslenen bebeklerde miristik, palmitik ve stearik asidin ince bağırsakta absorpsiyonu α formülasyonu ile beslenen bebeklerdeki absorpsiyonuna göre daha iyi olmuştur. Ayrıca β formülasyonu ile beslenen bebeklerde toplam yağ atılımı daha düşük, yağ absorpsiyonu ise daha düşük bulunmuştur. Kalsiyum atılımının yağ ve miristik ($r=0,42$; $p=0,04$), palmitik ($r=0,46$; $p=0,039$) ve stearik asit ($r=0,42$; $p=0,025$) gibi başlıca doymuş YA'leri atılımı ile de ilişkili olduğu gözlenmiştir.

Lucas ve diğ. (1997) TAG'lerin yapısının yağ asitleri ve kalsiyum absorpsiyonu üzerine olan etkilerini araştırdıkları 5 gün süren bir çalışmada 24 erken doğan bebek palmitik asidi sn-2 pozisyonunda farklı miktarlarda içeren 3 farklı formülasyon ile beslenmiştir. Birinci formülasyon (BetapolTM) sn-2 pozisyonunda %73,9 oranında palmitik asit içerirken, A ve B diyetleri sırasıyla %8,4 ve %27,8 içermiştir. Sonuçta, BetapolTM ile beslenen bebeklerde palmitik asidin absorpsiyonu en yüksek olurken (%91), en düşük A veya B diyeti ile beslenen bebeklerde (%79; $p<0,03$ ve $p<0,01$) olmuş, aynı zamanda A ve B diyetiyle beslenen bebeklerde absorplanan kalsiyum miktarının ortalamaları sırasıyla (%43,9 ve %40,0) olurken, Betapol ile beslenen bebeklerde absorplanan kalsiyum miktarı (%57,0) olmuştur. A ve B diyetinin sonuçları birleştirildiğinde kalsiyum absorpsiyonu (%42,1) Betapol diyetinden (%57,0, $p<0,01$) önemli derecede daha düşük bulunmuştur. B diyetiyle beslenen

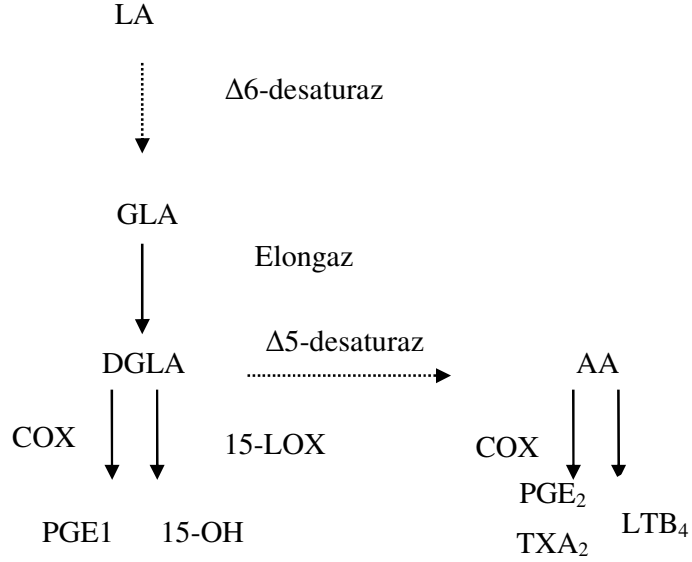
bebeklerde kalsiyum sabunu olarak atılan yağ miktarı %7,2 iken, bu oran Betapol diyeti ile beslenen bebeklerde çok daha düşük %3,3 ($p<0,01$) bulunmuştur.

Carnielli ve diğ. (1995)'in 28-32 haftalık bebeklerle yaptıkları bir diğer çalışmada bebekler 1 hafta süreyle α formülasyonu (%25,7 palmitik asit ve palmitik asidin %87,3'ü sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında) ve anne sütü yağına benzer β formülasyonu (%25,4 palmitik asit ve palmitik asidin %58'ini sn-2 pozisyonunda) ile beslenmişlerdir. Çalışma sonucunda her iki formülasyon ile beslenen bebeklerin plazma fosfolipidlerinin ve sterol esterlerinin esansiyel YA'lerinde farklılık olmadığı görülmüştür. Ancak, β formülasyonu ile beslenen bebeklerin plazmalarındaki sterol esterleri, serbest YA'leri ve TAG'leri sırasıyla %18,90, %31,90, ve %29,27 palmitik asit içermiş ve bu oranlar α formülasyonu ile beslenen bebeklere göre (%14,96, %28,14 ve %24,86, sırasıyla) daha fazla bulunmuştur. TAG'ların linoleik asit içeriği β formülasyonu ile beslenen bebeklerde α formülasyonu ile beslenenlere göre daha düşük (β : %12,99, α : %15,13) bulunmuştur.

2.4. Omega-3 ve Omega-6 Yağ Asitleri ile Zenginleştirilmiş Bebek Mamaları

2.4.1. Gamma-linolenik asit

GLA (18:3n-6) linoleik asidin (LA, 18:2n-6) $\Delta 6$ -desaturaz ürünü olan esansiyel n-6 (omega-6) çoklu doymamış YA olup, oluştuktan sonra hızla di-homo γ -linolenik aside (DGLA, 20:3n-6) ve ardından da $\Delta 5$ -desaturaz enzimi ile araşidonik aside (AA, 20:4n-6) dönüşmektedir. Şekil 2.8'de omega-6 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol yer almaktadır. Normal koşullar altında, vücutta LA GLA'e dönüşmektedir. Ancak bu dönüşümü engelleyen veya kısıtlayan $\Delta 6$ -desaturaz enziminin (D-6-D) aktivitesinin düşük olması veya enzimin inaktif olmasıdır (Clough, 2001). Buna neden olan olarak kolesterol, doymuş YA, tekli doymamış YA, trans YA alımının yüksek olması, yüksek alkol ve şeker tüketimi, diyabet, yaşlılık, yüksek tansiyon, egzema, stres, sigara içimi, B6 vitamini ve çinko eksikliği gibi etmenler gösterilmektedir (Brenner, 1981; Ayala ve Brenner, 1983).



Şekil 2.8: Omega-6 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol (Wanasundara ve Wanasundara, 2005).

DGLA prostaglandin E1 (PGE1) ve 15-hidroksi (OH) DGLA gibi iki adet anti-enflamatuar bileşiklerin de öncüsü olan bir yağ asididir. DGLA $\Delta 5$ -desaturaz enzimi ile araşidonik aside (AA, 20:4n-6) dönüşmektedir (Redden ve diğ., 1998). Özellikle gelişmiş ülkelerde tüketilen gıdalarla birlikte LA'nın aşırı alımı nedeniyle $\Delta 6$ -desaturaz enzimi inhibe olmakta, bu durum da GLA ve DGLA üretiminin inhibisyonuna neden olmaktadır. DGLA siklooksigenaz (COX) ve lipoksigenaz (LOX) enzimleri için AA ile yarışmaktadır. Bu enzimlerle üretilen DGLA ve AA'nın metabolitleri [prostaglandin (PG) ve lökotrienler (LT)] zıt etkilere sahiptir. AA'den türeyen PG ve LT'ler pro-enflamatuar iken, DGLA'dan türeyen PG ve LT'ler enflamatuar hastalıkları önleyici özelliktedir (Miller ve Ziboh, 1998; Kapoor, 2005; Lumor ve Akoh, 2005).

15-hidroksi (OH) DGLA, AA'in LTB₄'e dönüşmesini sağlayan 15-LOX enzimini inhibe etmek suretiyle AA metabolizmasının pro-enflamatuar etkisini dengeler. Bu nedenle, LA ve AA tüketiminin yüksek olduğu toplumlarda anti-enflamatuar PG ve LT'lerin fonksiyonel eksikliği vardır. Bu durum bireylerde AA'in pro-enflamatuar metabolitlerinin yüksek miktarda üretilmesine neden olmakta ve bunun da gelişmiş ülkelerde daha yaygın olarak görülen kronik hastalıkların (kireçlenme, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, vb.) oluşmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Yağların GLA ile zenginleştirilmesiyle enflamatuar ve anti-enflamatuar sitokinlerin

dengelenmesi mümkün olmaktadır. PGE'nin damarların genişlemesinde ve kan basıncının düşmesinde, platelet oluşumunu ve kolesterol biyosentezini de önlemede etkili olduğu öne sürülmektedir (Miller ve Ziboh, 1998; Kapoor, 2005).

GLA'nın şeker hastalığı, yüksek tansiyon, kanser, sikloz, şizofreni, osteoporoz kardiyovasküler hastalıklar, cilt hastalıkları, alerji, enflamatuar hastalıklar gibi birçok hastalık üzerine olumlu etki gösterdiği, bunların yanısıra LDL kolesterolü ve serum TAG seviyesini düşürmede, HDL kolesterolü yükseltmede, plak oluşumunu önlemede olumlu etkisinin olduğu yapılan klinik çalışmalarla belirlenmiştir (Engler ve diğ., 1992; Elliot ve diğ., 1998; Senanayake ve Shahidi, 1999; Clough, 2001; Lumor ve Akoh, 2005). GLA, aynı zamanda beynin gri kısmında ve retinanın yapısında bulunan, hücrelerin haberleşmesinde ikinci haberci olarak görev yapan arasıdonik asidin vücutta yapımında önemli rolü vardır (Wainwright ve diğ., 2001).

GLA mikrobiyal ve bitkisel kaynaklardan elde edilebilmektedir. *Mucor javanicus* (yaklaşık % 15-18) ve *Mortierella isabellina* (yaklaşık %8,3) gibi başlıca mikrobiyal kaynakların yanısıra GLA *Onagraceae*, *Saxifragaceae*, ve *Scrophulariaceae* ve özellikle *Boraginaceae* familyalarına ait bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir (Guil-Guerrero ve diğ., 2001).

Çuhaçiçeği (*Oenothera biennis* ve *O. lamarkiana*), siyah frenküzümü (*Ribes nigrum*) ve hodan (*Borago officinalis*) bitkilerinin çekirdekleri sırasıyla % 7-10, %15-19 ve % 17-25 oranında GLA içermektedir (Clough, 2001).

GLA ile zenginleştirilmiş bebek mamalarının bebek beslenmesi ve gelişimi açısından önemi

GLA'nın kozmetik sanayiinde, gıda ürünlerinde, sağlık ürünü olarak ve bebek mamalarında ingrediye olarak ticari kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Shimada ve diğ., 1999). Özellikle GLA'ı yüksek miktarda içeren hodan yağı sağlık üzerine iddia edilen etkileri ve AA metabolizması üzerindeki antagonist etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. GLA hızla DGLA ve ardından AA'e dönüştüğü için ve ayrıca oldukça aktif AA'nın yerine hem daha güvenli hem de daha ucuz ve üretimi daha kolay olan GLA'nın AA'ya alternatif olarak bebek mamalarında kullanımı önerilmektedir (Shimada ve diğ., 1999; Watkins ve German, 2002; Kawashima ve diğ., 2002; Fewtrell ve diğ., 2004).

GLA'nın beslenme amaçlı, tedavi amaçlı ve farmakolojik amaçlı etkiler gösterebilmesi için günlük alınması önerilen miktarları, sırasıyla, 25-50 mg, 100-500 mg ve 500-2000 mg olarak belirtmektedir (Clough, 2001).

Günümüzde erken doğan ve normal süresinde doğan bebekler için çeşitli kaynaklardan elde edilen GLA ile zenginleştirilmiş bebek maması formülasyonları bulunmaktadır ve bu formülasyonlarda GLA'ye zengin bitkisel yağlar fiziksel olarak karıştırılmakta ve son ürünün GLA miktarı toplam yağ asitlerinin % 0,2-0,9'u civarında olmaktadır (Clough, 2001).

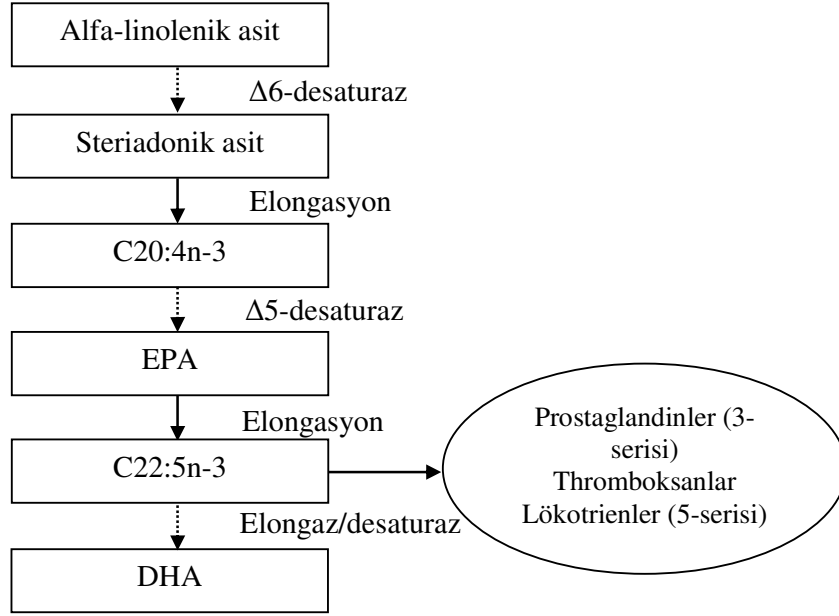
Lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen enzimatik interesterifikasyon reaksiyonları ile fiziksel karışım hazırlığına gerek kalmadan, GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY'ın üretilebilmeleri mümkün olmaktadır. Bu ürünlerin kullanımı $\Delta 6$ -desaturaz enziminin yetersiz olduğu durumlarda da yararlı olmaktadır (Fewtrell ve diğ., 2004).

Fewtrell ve diğ. (2004) erken doğan bebeklerle yapılan bir çalışmada araşidonik asidin öncüsü olarak kullanılan GLA'in ve dokosahekzaenoik asidin (DHA) etkinliğini ve güvenliğini, hoda yağı ve balık yağı kullanarak incelemişlerdir. Sonuç olarak, araşidonik asit kaynağı olarak formülasyonda kullanılan GLA'in, hiçbir olumsuz etki göstermeksizin, erkek çocukların büyüme ve sinir sistemlerinin gelişmeleri üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir. Böylece erken ve normal doğan bebeklerin vücut ağırlıklarının, aldıkları mamalardaki DGLA ve AA seviyeleri ile ilgili olduğu artık bilinmektedir. Başka bir çalışmada ise erken doğan bebeklerin GLA içeren bebek maması ile beslendiklerinde ve 18 aylık olduklarında, "Bailey zihin gelişim indeksi" skorunda kontrol bebeklere göre bariz bir iyileşme olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu bebekler hem ağırlık hem de boy bakımından da daha iyi gelişmişlerdir (Fewtrell ve diğ., 2004).

2.4.2. Omega-3 yağ asitleri

Omega-3 veya diğer bir deyişle $n-3$ yağ asitleri de tıpkı tüm memelilerde olduğu gibi insanlar tarafından da sentezlenemedikleri ve diyetle alınmaları gerektiği için esansiyel yağ asitleri olarak bilinmektedirler. Omega-3 yağ asitleri, genellikle soya fasülyesi ve keten tohumu yağlarında ve yeşil yapraklı bitkilerin kloroplastında bulunan linolenik asit ($18:3n-3$) ile temsil edilmektedirler. YY sentezinde dikkat çeken diğer çoklu doymamış $n-3$ yağ asitleri genellikle balık yağlarında; özellikle

okyanus balıklarının yağlarında bulunan eikosapentaenoik asit, EPA (20:5n-3) ve dokosahekzaenoik asit, DHA (22:6n-3)'tir. İnsan sütünde DHA yeterli miktarda yer almakta (%0,26) ancak EPA düşük miktarda (% 0,07) bulunmaktadır (Akoh, 2002). Omega-3 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol Şekil 2.9'da görülmektedir.



Şekil 2.9: Omega-3 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol (Akoh, 2002).

Son yıllarda yapılan klinik çalışmalarda n-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin; özellikle eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosahekzaenoik asitin (DHA) diyetle alındığında vücutta çok önemli işlevleri olan prostaglandinlerin sentezini etkiler.

Ayrıca kardiyovasküler hastalıklar, kanser, yüksek tansiyon, bağışıklık sistemi, alerji, enflamatuar, eklem iltihabı, şeker hastalığı ve depresyon gibi birçok hastalığın üzerinde etkili olduğu ispatlanmıştır. EPA, özellikle kan koagülasyon profili üzerindeki olumlu etkileri (antitrombotik etki) sayesinde kalp krizlerini önlemede önemlidir. EPA'nın kanda akışkanlığı sağlayıcı etkiye sahip olduğu ve serum kolesterol düzeyini düşürdüğü de bildirilmiştir. DHA'nın beyin ve göz hücrelerinde membranının akışkanlığı sağladığı, basıncı düşürdüğü, oksidatif hasar görmüş retinanın komponentlerini yenilediği, damar sertliğini/tıkanıklığını azalttığı ve görme keskinliğini artırdığı iddia edilmektedir (Horrocks ve Yeo, 1999; Sidhu, 2003). DHA beyin gri kısmında bulunur ve özellikle prematüre bebeklerde retina ve beyin normal fonksiyonlarını yerine getirmesinde, büyüme ve gelişmeyi hızlandırmada ve enflamatuar hastalıkları önlemede önemli ve kompleks bir rol oynar. DHA beyinde

bulunan YA'leri arasında en yüksek miktara sahiptir (Akoh, 2002; Puiggros ve diğ., 2002; Özçelik ve Karaali, 2002).

Omega-3 yağ asitleri sinirleri saran myelini de korur ve yaşlılık bunaması ve depresyon gibi çeşitli sinir sistemi hastalıklarına karşı korur. DHA gelişen merkezi sinir sisteminin myelin dışındaki membranlarında yüksek miktarda bulunur (Ratledge, 2001).

Diyetleri yeterli miktarda $n-3$ çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) içermeyen çocuklar nörolojik rahatsızlıklar ve görme bozuklukları, dermatit, büyüme geriliği gibi problemler yaşamaktadırlar. Bu nedenle DHA gibi $n-3$ ÇDYA'ı diyetlerinde ve YY tasarımıyla yer almalıdır (Akoh, 2002).

Omega-3 yağ asitleri ile zenginleştirilmiş bebek mamalarının bebek beslenmesi ve gelişimi açısından önemi

İki önemli yağ asidi olan EPA ($20:5n-3$) ve DHA ($22:6n-3$) ticari olarak balık yağlarından elde edilebilmektedir. Gıda teknolojisindeki gelişmelerle birlikte, enkapsülasyon yöntemleri ile gıdaların balık yağlarından elde edilen omega-3 (ÇDYA) çoklu doymamış yağ asidi konsantrelerinin balık tadı/kokusu olmadan zenginleştirilmesi mümkün olmaktadır. Zenginleştirmede iki strateji yer almaktadır, bunlar: Omega-3 ÇDYA konsantrelerinin bebek mamalarına direkt olarak ilavesi veya omega-3 ÇDYA'nin enzimatik interesterifikasyon reaksiyonları ile yağ molekülüne inkorporasyonu şeklinde olabilmektedir. Avrupa, Asya, Kanada ve Amerika'da erken doğan ve normal süresinde doğan bebekler için DHA, AA gibi uzun zincirli ÇDYA ile zenginleştirilmiş mama formülasyonları mevcut olup bu formülasyonlarda çoğunlukla DHA-tek hücre yağı (DHASCO, Martek Biosciences, Corp., Columbia, MD) omega-3 kaynağı olarak kullanılmaktadır. DHASCO ticari ürünü *Cryptocodinium cohnii* mikroalginden ekstrakte edilen yağın ve yüksek oleik asit içerikli ayçiçek yağının karışımıdır. Karışım yağ %40-45 oranında DHA içermekte ve bu ürün bebek maması formülasyonlarında ve diğer fonksiyonel gıdalarda zenginleştirme ingrediyesi olarak kullanılmaktadır (Anon., 2006c). Omega-3 yağ asitleri ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY bitkisel yağlar ve omega-3 konsantresi kullanarak enzimatik interesterifikasyon veya asidoliz tepkimeleri ile üretilebilmektedir. Enzimatik yöntemlerle üretim için literatürde çeşitli yaklaşımlar yer almaktadır ancak çoklu doymamış yağ asitleri

içeren ve anne sütü yağına benzer YY üretimi ile ilgili ticari ürün henüz mevcut değildir.

Bebek mamalarının uzun zincirli ÇDYA ile zenginleştirilmesi son yıllarda giderek yaygınlaşmaktadır. Bunun nedeni özellikle bebeklerin doğduktan sonraki ilk yıllarında uzun zincirli ÇDYA'ne gereksinim duymaları ve anne sütünde yeterli miktarlarda bulunan bu ÇDYA'nden emziren kadın sayısının azalması nedeniyle bebeklerin yeterince yararlanamamalarıdır (Ratledge, 2001; Sidhu, 2003). Bebeklerin sinir sistemlerinin gelişimi sırasında uzun zincirli ÇDYA'nin yetersiz alımı uzun vadede olası öğrenme zorluklarına ve görme ile ilgili problemlere neden olabileceği belirtilmektedir (Haraldsson, 2001). Yapılan bir çalışma sonucunda, uzun zincirli ÇDYA ile beslenen bebeklerin kan değerlerinin anne sütü ile beslenen bebeklerinkine benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Yeni doğan bebeklerin ilk aylarda AA, DHA ve EPA gibi yağ asitlerini sentezleme kapasitesi sınırlı olduğu için bu yağ asitlerini diyetle birlikte almaya gereksinim duyarlar (Innis, 1994; Hayat ve diğ., 1999). Yapılan başka bir çalışmada, uzun zincirli ÇDYA içermeyen bebek mamaları ile beslenen erken ve normal süresinde doğan bebeklerin serebral korteksteki fosfolipidlerin anne sütü ile beslenen bebeklere göre daha düşük DHA içerdiği ve bu bebeklerin kırmızı kan hücrelerinin daha az sayıda olduğu belirtilmiştir (Fewtrell ve diğ., 2004).

2.4.3. Bebek mamalarının uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri ile zenginleştirilmesinde mevcut olan yasal düzenlemeler

Kodeks Komitesinin ESPGHAN Komitesi'nden (The European Society for Pediatric and Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) bebek maması formülasyonlarında kullanılan besin öğelerinin seviyelerinin belirlenmesi için bir çalışma başlatmalarıyla ilgili ricasına istinaden, ESPGHAN Komitesi kardeş kuruluşu olan FISPGHAN Komitesi (Federation of International Societies on Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) ile birlikte beslenme alanında uzmanlardan oluşan Uluslararası Uzman Grubu'nu (IEG) oluşturmuştur. Bu grubun bebek maması formülasyonlarındaki kompozisyonel gereklilikleri ve ingrediyent miktarları hakkında getirdiği öneriler, daha sonra Tablo 2.8'de özetlenen bebek mamalarında kullanılacak uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri ile ilgili Kodeks Komitesinin önerilerine dönüştürülmüştür (Koletzko, 2005).

Tablo 2.8: Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin bebek mamalarında kullanımı için Kodeks Komisyonu tarafından önerilen değerler (Koletzko, 2005).

	Linoleik asit	α-Linolenik asit	Linoleik/ α-linolenik asit oranı	EPA	DHA
IEG: ESPGHAN FISPGHAN	Min: 300 mg/100 kkal Maks:1200 mg/100 kkal	Min: 50 mg/100 kkal Maks: -	5-15/1	EPA< DHA	< %0,5 (toplam yağın)

Tablo 2.8’den görüleceği gibi, linoleik/ α -linolenik asit oranı için 5-15/1 değeri önerildiği için α -linolenik asit miktarının üst limiti için herhangi bir değer belirtilmemiştir. Bebek maması formülasyonlarındaki DHA miktarının toplam yağ miktarının %0,5’ini geçemeyeceği, AA miktarının da en az DHA miktarı kadar olması gerektiği ve ayrıca EPA miktarının DHA miktarından düşük olması gerektiği belirtilmiştir. Bu konu ile ilgili Avrupa Birliği’nin 96/4/EEC no’lu Direktifinde uzun zincirli ÇDYA kullanımına aşağıda Tablo 2.9’da belirtilen limitler dahilinde izin verilmektedir (AB-96/4/EEC).

Tablo 2.9: Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin bebek mamalarında kullanımına ilişkin AB regülasyonu (AB-96/4/EEC).

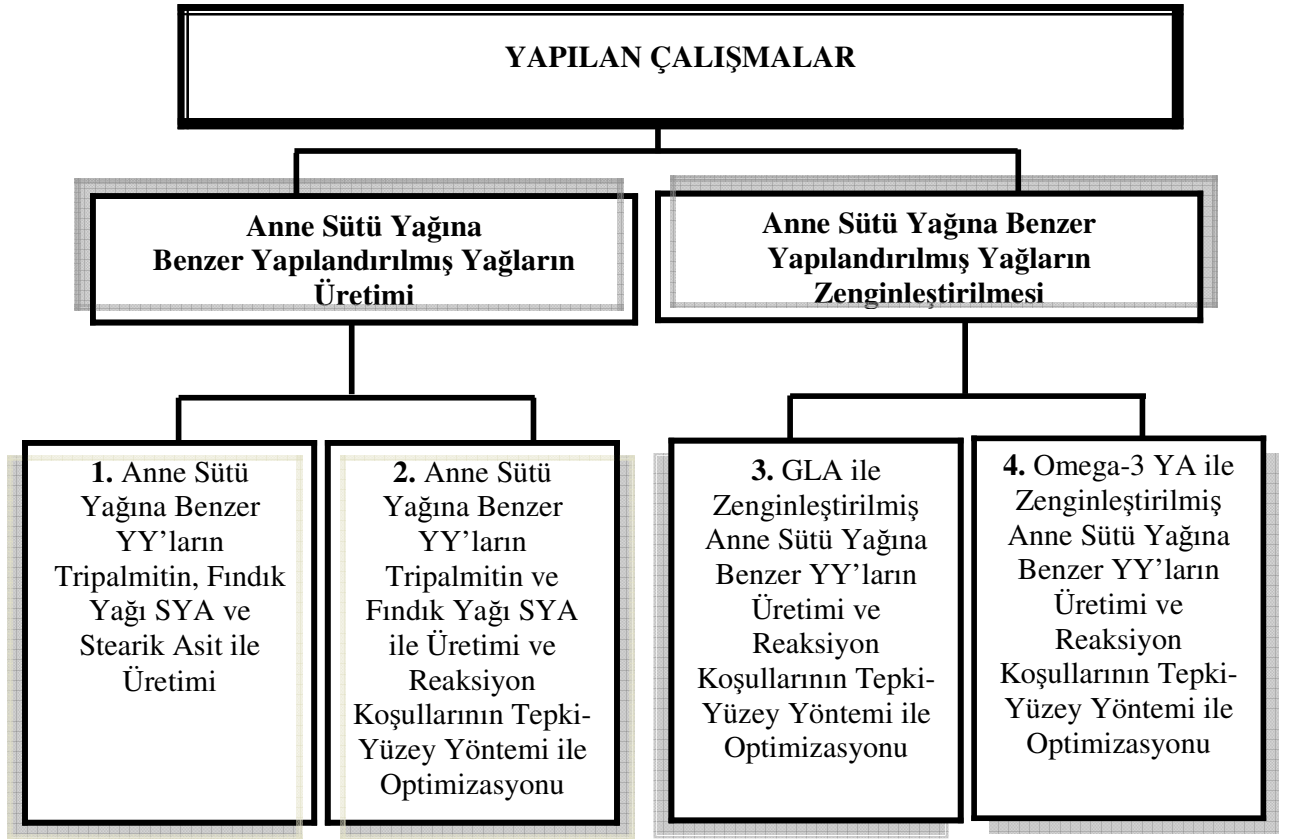
<i>n</i>-3 ÇDYA	<i>n</i>-6 ÇDYA	EPA
< %1 (toplam yağın)	< %2 (toplam yağın) AA: %1 (toplam yağın)	EPA< DHA

Avrupa, Asya, Kanada ve Amerika’da erken doğan ve normal süresinde doğan bebekler için DHA, AA gibi uzun zincirli ÇDYA ile zenginleştirilmiş mama formülasyonları mevcut olup bu formülasyonlardaki DHA ve AA miktarları üretici firmasına göre farklılık göstermekle birlikte bu formülasyonlardaki DHA içerikleri 8-19 mg/100 kkal ve AA içerikleri 22-34 mg/100 kkal aralığında değişmektedir (Anon., 2006c; Anon., 2006d; Anon., 2006e; Anon., 2006f).

Bebek maması formülasyonlarında zenginleştirme amacıyla kullanılan AA, DHA yağ asitleri için günlük alınması önerilen miktar sırasıyla 0,50; 0,35 olup; EPA için ise 0,10’dan daha az olması gerektiği belirtilmiştir. EPA’nın verilen değerlerden daha yüksek miktarlarda kullanımı AA’yı antagonize edebileceği ve bebek gelişimini de olumsuz yönde etkileyebileceği belirtilmektedir (Simopolous, 2004).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında yapılan çalışmalar dört ana başlık altında toplanmış olup, bunlar Şekil 3.1’de belirtilmiştir.



Şekil 3.1: Yapılan deneysel çalışmalar

3.1. Malzeme

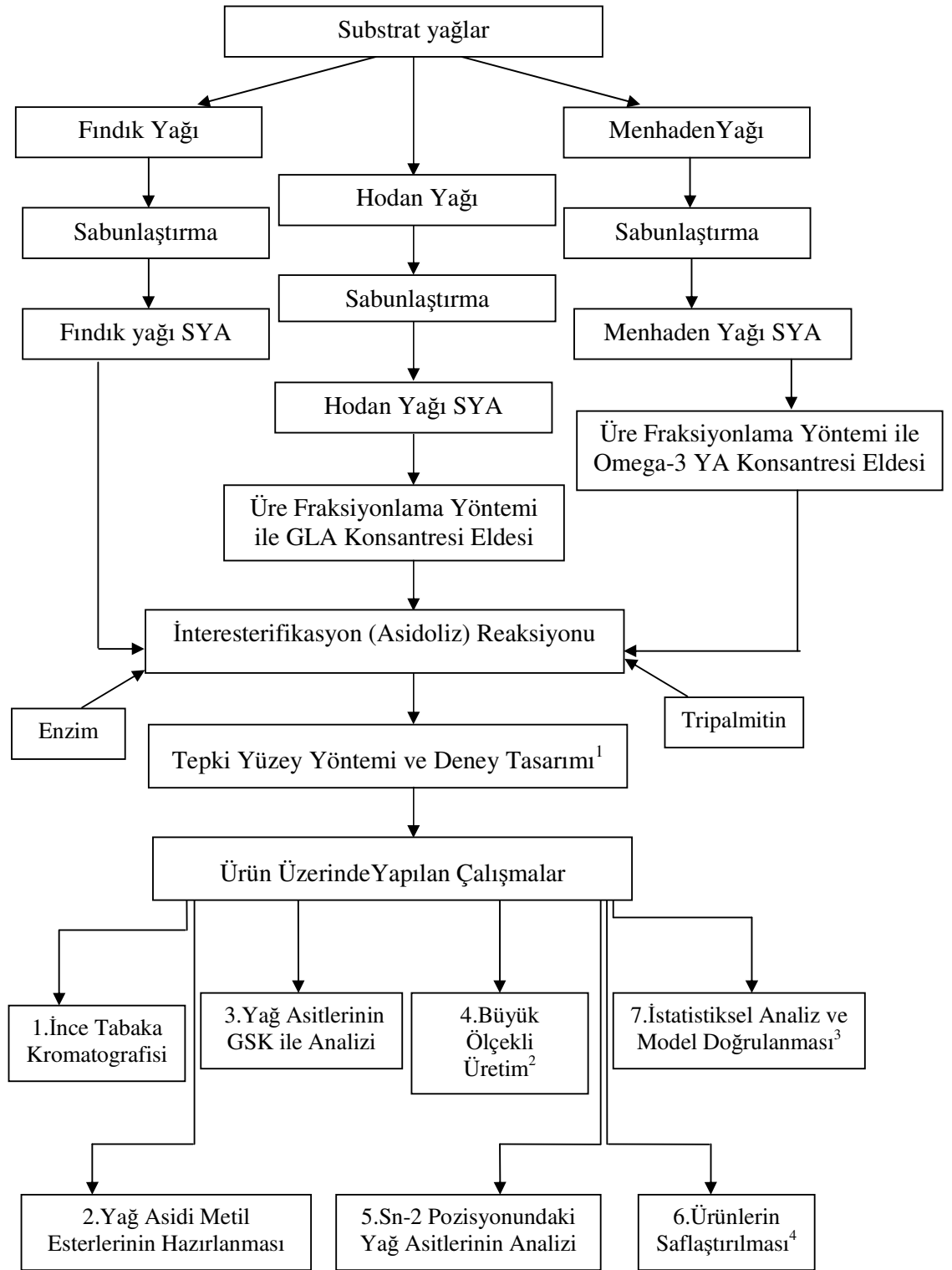
Tezin içermekte olduğu dört ayrı çalışmada kullanılan kaynaklardan rafine fındık yağı yerel marketlerden, tripalmitin (gliserol tripalmitat, minimum saflık % 85), hodan yağı, menhaden balık yağı, stearik asit (minimum saflık % 95) ve sn-2 pozisyon analizinde kullanılan domuz orijinli pankreatik lipaz enzimi Sigma (St Louis, MO) firmasından temin edilmiştir. İmmobilize 1,3 spesifik lipaz enzimleri olan Lipozyme® RM IM ve Lipozyme® TL IM Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Danimarka) firmasından satın alınmıştır. Lipozyme® RM IM ve Lipozyme® TL IM enzimlerinin aktiviteleri, ürün spesifikasyonunda sırasıyla 150 IUN/g ve 250 IUN/g olarak belirtilmiştir. Kullanılan organik çözenler ve ince tabaka kromatografisinde (TLC) kullanılan 20x20 cm boyutundaki, silikajel G ile kaplı cam plakalar sırasıyla J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ) ve Fisher Scientific (Norcross, GA) firmalarından satın alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan tüm çözelti ve kimyasallar kromatografik ve/veya analitik saflıktadır.

3.2. Yöntemler

Çalışma aşamalarının ana hatları ve yürütülen analizler Şekil 3.2’de özetlendiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Substrat yağlardan serbest yağ asitleri eldesi

Fındık yağı, hodan (boraj) yağı ve menhaden balık yağından serbest yağ asitlerinin eldesinde Senanayake ve Shahidi (1999)’nin uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle göre 25 g yağ, 5,75 g KOH, 11 ml su ve 66 ml % 95’lik sulu etanol (hacim/hacim) karışımı kullanılarak 1 saat boyunca 60°C’de geri soğutucu altında sabunlaştırılmıştır. Süre sonunda karışıma 50 ml distile su eklenmiş ve ortamdan sabunlaşmayan maddelerin uzaklaştırılması için, karışım ayırma hunisinde iki kez 100 ml hekzan ile çalkalanmıştır. Sabunlaşan kısmı içeren sulu fraksiyon 3 N HCl ile pH=1 olana dek asitlendirilmiştir. Daha sonra karışım ayırma hunisine alınmış ve açığa çıkan yağ asitleri 50 ml hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Hekzan fazı susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra döner buharlaştırıcıda 40°C’lik su banyosunda uzaklaştırılmıştır. Bu şekilde elde edilen yağ asitleri kullanıma dek -85 °C’deki dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.2: Çalışma aşamalarının ana hatları ve yürütülen analizler

^{1,3}: 2., 3. ve 4. deneysel çalışmalarda kullanılmıştır.

^{2,4}: 2. deneysel çalışmada kullanılmıştır.

3.2.2. “Üre fraksiyonlama” yöntemi ile yağ asidi konsantresi eldesi

Üre fraksiyonlama yöntemi bazı alifatik yağ asitleri varlığında ürenin (0-4°C) etanol/metanolden karakteristik olarak kristallenmesidir. Üre doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerini veya bunların alkil esterlerini içeren hekzagonal prizmalar oluşturur, çoklu doymamış yağ asitleri ise çözeltide kalır. Daha sonra kristaller çözeltiden ayrılarak yağ asidi konsantresi elde edilir (Lumor ve Akoh, 2005).

Hodan yağından GLA konsantresi eldesinde Spurvey ve Shahidi (2000)’nin uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle göre, hodan yağından elde edilen serbest yağ asitleri (10 g), üre ve etanol, “yağ asidi:üre:etanol” oranı 1:3,7:20 olacak şekilde 60°C’de geri soğutucu altında karışım homojen bir hal alıncaya dek (1 saat boyunca) karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım buzdolabında 0-4°C’de 16 saat boyunca tutularak kristallendirilmiştir. Doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri üre kristalleri oluşturmuştur. Kristalizasyon sonrasında çoklu doymamış yağ asitlerini içeren karışım vakum uygulanarak derhal süzölmüş ve üre kristalleri 25 ml etanol ile yıkanmıştır. Filtrata eşit hacimde su eklenerek 6 N HCl ile pH 4-5 olana dek asitlendirilmiştir. Karışıma eşit hacimde hekzan eklenerek 1 saat boyunca karıştırılmış ve bir ayırma hunisine aktararak çoklu doymamış yağ asitlerini içeren hekzan fazı, üre içeren su fazından ayrılmıştır. Hekzan fazı, içinde kalabilecek üreyi ayırmak için önce distile suyla yıkanmış, sonra susuz sodyum sülfat ile kurutulmuştur. Döner buharlaştırıcı kullanarak, 40°C’de hekzanın uzaklaştırılmasının ardından kullanıma dek örnek -85°C’deki dondurucuda saklanmıştır.

Çeşitli balık yağlarından (uskumru, menhaden, Atlas okyanusu kırmızı balık, Atlas okyanusu ringa balığı, Pasifik okyanusu küçük köpek balığı, Pasifik okyanusu somon balığı, Atlas okyanusu fok balığı, balina yağı) omega-3 YA konsantresi eldesi için genellikle uygulanan yöntem “üre fraksiyonlama yöntemi”dir (Ratnayake ve diğ., 1988; Grompone, 1992; Wanasundura ve Shahidi, 1999; Senanayake ve Shahidi, 2000; Zuta ve diğ., 2003).

Menhaden yağından omega-3 YA konsantresi eldesinde Wanasundura ve Shahidi (1999)’nin uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle göre, menhaden yağından elde edilen serbest yağ asitleri (10 g), üre (20%, ağırlık/hacim) ve etanol (%95’lik hacim/hacim), “yağ asidi:üre” oranı 1:5 olacak şekilde 60°C’de geri soğutucu altında karışım homojen bir hal alıncaya dek (1 saat boyunca) karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım önce oda sıcaklığında ardından buzdolabında, 24 saat boyunca 0°C’de

tutularak kristallendirilmiş ve ardından GLA konsantresi eldesindeki işlemler uygulanmıştır (Wanasundura ve Shahidi, 1999).

3.2.3. İnteresterifikasyon (asidoliz) reaksiyonu

Asidoliz reaksiyonları her çalışma için tripalmitinin yağ asitleri ile belirli substrat mol oranlarında karışımlarından oluşmuştur. İnkübasyonlar 3 ml hekzan varlığında, kapaklı test tüplerinde ve çalkalama hızı 200 rpm olarak ayarlanmış çalkalamalı su banyosu (New Brunswick Scientific, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Lipozyme® RM IM veya Lipozyme® TL IM enzimi toplam substrat miktarının %10'u ve %6'sı oranında reaksiyon karışımlarına eklenmiştir. Bütün reaksiyonlar 2 paralel olacak şekilde yapılmış ve sonuçların ortalamaları alınmıştır.

3.2.4. İnce tabaka kromatografisi ile analiz

Asidoliz reaksiyonu sonucunda reaksiyon karışımları, susuz sodyum sülfat kolondan filtre edilerek ürünün içermekte olduğu enzim ve nem uzaklaştırılmıştır. 50 µL reaksiyon ürünü Silikajel G ile kaplı TLC plakalarına (20x20 cm) uygulanmıştır. Örnekler ince tabakaya damlatıldıktan sonra petrol eteri:dietil eter:asetik asit (80:20:0,5, hacimce) çözgen sistemiyle geliştirilmiştir. Daha sonra tabakalara 2,7-diklorofloresin'in metanoldeki % 0,2'lik çözeltisi püskürtülmüş ve TAG bandı UV lambası altında görünür hale getirildikten sonra plakadan spatülle kazınarak kapaklı tüplere aktarılmıştır (Jennings ve Akoh, 1999).

3.2.5. Yağ asidi metil esterlerinin hazırlanması

TAG bandlarına 3 ml metanol ile hazırlanmış %6'lık HCl çözeltisi eklenerek 70-80°C'deki etüvde 2 saat süreyle metillendirilmiş ve daha sonra yağ asitleri metil esterleri (YAME) 2 kez 2 ml hekzan ve 1 ml KCl ile ekstrakte edilmiştir. YAME susuz sodyum sülfat kolondan geçirilerek içerdiği nem uzaklaştırılmış ve hekzan miktarı 0,5 ml oluncaya dek azot kurutucuda azot gazı altında uçurulmuştur (Jennings ve Akoh, 1999).

3.2.6. Yağ asitlerinin gaz-sıvı kromatografisi ile analizi

Çalışmada substrat olarak kullanılan substrat yağların ve reaksiyon ürünlerinin yağ asidi kompozisyonları kapiler gaz-sıvı kromatografisi yöntemi (GSK) (Agilent

Technologies 6890N) ile tespit edilmiştir. Bu cihaz ile yapılan incelemede uygulanan kromatografi koşulları Tablo 3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 3.1: Gaz kromatografisi cihazında uygulanan koşullar

Dedektör tipi ve sıcaklığı	Alev iyonizasyon dedektörü (260°C)
Enjektör sıcaklığı	Dağıtmasız, 250°C
Helyum akış hızı	64 ml/dak.
Fırın sıcaklığı (Programlı çalışma)	1. 150°C (3 dak.) 2. 150-225°C (10°C/dak.) 3. 215°C (10 dak.) ¹
Kolon tipi	J&W Scientific DB-225, 30 m uzunluğunda 0,25 mm iç çaplı, dolgu maddesi: %50 siyanopropilfenil-dimetilpolisiloksan
Enjeksiyon miktarı	1 µL

¹: Balık yağı analizinde, son kademedeki süre 20 dak. olarak uygulanmıştır.

Analiz sonuçları yağ asidi metil esterlerinin % mol miktarları olarak belirtilmiş ve bunun için C17:0 iç standardı kullanılarak bilgisayar programı yardımıyla hesaplamalar yapılmıştır.

3.2.7. Sn-2 pozisyonundaki yağ asitlerinin analizi

TLC plakasından kazınan TAG bantları 2 kez 2 ml dietil eter ile ekstrakte edilmiş ve dietil eter azot gazı altında uzaklaştırıldıktan sonra saf TAG elde edilmiştir. 8 mg saf pankreatik lipaz, 1 ml Tris tamponu (pH 8,0), 0,25 ml safra tuzları (% 0,05), 0,1 ml kalsiyum klorür (% 2,2) saf TAG ekstraktına eklenmiştir. Karışım 40°C’deki su banyosunda 3 dak. tutulmuş, reaksiyonun sonlandırılması için 1 ml 6 M HCl ilave edilmiş, daha sonra 2 kez 1’er ml dietil eter ile ekstrakte edilmiştir. Dietil eter miktarı 200 µl olana dek azot gazı altında solvent uzaklaştırılmıştır ve tümü Silika jel G ile kaplı TLC plakalarına spotlanmıştır. Plakalar hekzan/dietil eter/asetik asit (50:50:1, v/v/v) çözgen sistemiyle geliştirilmiştir. 2-Monoağılglicerol (2-MAG) bandı UV ışığı altında 2,7-diklorofloresin’in metanoldeki % 0,2’lik çözeltisi püskürtüldükten sonra teşhis edilerek TLC plakasından kazınmıştır. 2-MAG bandın TLC ile ayırımında standart olarak 2-monoolein kullanılmıştır. Daha sonra 2-MAG 3.2.1.4’de belirtilen metillendirme yöntemine göre metillendirilmiş ve 2-MAG’ın GSK ile yağ asidi kompozisyonu (%mol) belirlenmiştir (Jennings ve Akoh, 1999).

3.2.8. Tepki yüzey yöntemi ve deneysel tasarım

Tepki-Yüzey Yöntemi (TYY), matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı ve bağımlı değişkenin (tepkinin) çok sayıda bağımsız değişkenden etkilendiği problemlerin analizinde, modellenmesinde ve tepkinin optimizasyonunda uygulanan bir yöntemdir. En çok kullanılan deney tasarımları “Central composite” (Merkezi-bileşik), “Box-Benkhen”, tam faktöryel, kısmi faktöryel ve rastgele bloklama (Montgomery, 1997).

Merkezi-bileşik deney tasarımlarında, iki veya daha fazla faktörün cevap üzerindeki etkileri aynı anda araştırılabilmekte ve en az sayıdaki deneyden en düşük maliyetle çok sayıda anlamlı veri elde edilebilmekte; ayrıca kritik olduğu düşünülen herhangi bir değişken üzerinde yapılan değişikliklerin etkilerini önceden tahmin etmeye olanak sağlanmaktadır (Dziezak, 1990; Montgomery, 1997).

Tepki-Yüzey Yöntemi, yeni ürün tasarımı, ürün geliştirme ve formülasyon oluşturma çalışmalarında ve mevcut ürünlerin iyileştirilmesi çalışmalarında önemli uygulama alanlarına sahiptir (Myers ve Montgomery, 2002).

Merkezi-bileşik deney desenleri küp noktalar (cube points), yıldız noktalar (star points) ve merkez noktaları (center points) olmak üzere üç tip deneysel noktayı kapsamaktadır. Küp noktalar, n_c olarak ifade edilen hiperkübün üstündeki noktalarda yerleşmişlerdir. Bu noktalar için kodlanan bağımsız değişken seviyesi ± 1 'dir. Merkezi-bileşik deney tasarımı ikinci noktalar grubu olan yıldız noktalarının $(\pm \alpha, 0, \dots, 0)$, $(0, \pm \alpha, 0, \dots, 0), \dots, (0, \dots, 0, \pm \alpha)$ koordinatları vardır. Üçüncü grup noktalar, koordinatları daima $(0, \dots, 0)$ olan ve tasarımın merkezinde yerleşen noktalarıdır. Merkez noktalarının sayısı, Tablo 3.2'de gösterildiği gibi, gereksinim duyulan ortogonal tasarım ile belirlenmektedir (Thomson, 1982).

Tablo 3.2: Çevrilebilir merkezli bileşik deney tasarımları (Thompson, 1982)

<u>Bağımsız</u> <u>değişken</u> <u>sayısı</u> k	<u>2.Dereceden</u> <u>modelde</u> <u>parametrelerin</u> <u>sayısı</u> p	<u>Küp</u> <u>noktalarının</u> <u>sayısı</u> $2^{k-m}=n_c$	<u>Yıldız</u> <u>noktalarının</u> <u>sayısı</u> <u>Değer</u> n_o α	<u>Ortogonal</u> <u>tasarım</u> <u>merkez</u> <u>toplam</u> <u>noktalarının</u> <u>sayısı</u> n_o	<u>Uniform</u> <u>bilgi</u> <u>tasarımı</u> <u>merkez</u> <u>toplam</u> <u>noktalarının</u> <u>sayısı</u> n_o
2	6	4	4 1,414	8 16	5 13
3	10	8	6 1,682	9 23	6 20
4	15	16	8 2,0	12 36	7 31
5	21	32	10 2,378	17 59	10 52
5,5 tekrar	21	16	10 2,0	10 36	6 32
6	28	64	12 2,828	24 100	15 91
6,5 tekrar	28	32	12 2,378	15 59	9 53
7	36	128	14 3,364	35 177	21 163
7,5 tekrar	36	64	14 2,828	22 100	14 92
8	45	256	16 4,0	52 324	28 300
8,5 tekrar	45	128	16 3,364	33 177	20 164
8,25 tekrar	45	64	16 2,828	20 100	13 93

Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların tripalmitin ve fındık yağı SYA'leri kullanılarak üretiminde ve GLA ve omega-3 YA ile zenginleştirilmesinde kullanılan enzimatik asidoliz reaksiyonları üzerinde “substrat mol oranı”, “reaksiyon sıcaklığı” ve “reaksiyon süresi” gibi farklı faktörlerin etkisinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla deneysel tasarımdan yararlanılmış, bunun için tepki yüzey yöntemi (TYY) kullanılmıştır. 3 faktörlü, 5 seviyeli Merkezli Bileşik Deney Tasarımı (Central Composite Design)’nda faktör kombinasyonları Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) paket programı kullanılarak oluşturulmuştur (Montgomery, 1997; Myers ve Montgomery, 2002).

Bağımsız değişkenler için değer aralıklarının seçiminde hem ön deneme sonuçlarından hem de literatür taraması sonuçlarından yararlanılmıştır.

Anne sütü yağına benzer YY eldesinde koşulların optimizasyonu için substrat mol oranı (Sr, yağ asitleri/triaçilgliserol, mol/mol) [8-14], reaksiyon sıcaklığı (T, °C) [55-65°C] ve reaksiyon süresi (t, saat) [12-24 saat] bağımsız değişken (faktör) olarak seçilmiş ve kullanıldıkları seviyeler Tablo 3.3'de gösterilmektedir.

Tablo 3.3: Merkezil bileşik deney tasarımında belirlenen bağımsız değişkenler ve belirlenen noktalardaki kodlara karşılık gelen değerler

Bağımsız değişkenler ve semboller	Kullanılan seviyeler ve değerleri				
	- α	-1	0	+1	+ α
Sr=Substrat mol oranı (mol/mol)	6	8	11	14	16,1
T=Reaksiyon sıcaklığı (°C)	51,6	55	60	65	68,4
t=Reaksiyon süresi (saat)	7,9	12	18	24	28,1

YY'ların GLA ve omega-3 YA'leri ile zenginleştirilmesinde kullanılan koşulların optimizasyonu için ise substrat mol oranı (Sr, yağ asitleri/triaçilgliserol, mol/mol) [12-16], reaksiyon sıcaklığı (T, °C) [55-65°C] ve reaksiyon süresi (t, saat) [12-24 saat] bağımsız değişken (faktör) olarak seçilmiş ve kullanıldıkları seviyeler Tablo 3.4'de gösterilmektedir.

Tablo 3.4: GLA ve omega-3 YA ile zenginleştirilmiş YY'ların merkezil bileşik deney tasarımında belirlenen bağımsız değişkenler ve belirlenen noktalardaki kodlara karşılık gelen değerler

Bağımsız değişkenler ve semboller	Kullanılan seviyeler ve değerleri				
	- α	-1	- α	+1	- α
Sr=Substrat mol oranı (mol/mol)	10,6	12	14	16	17,4
T=Reaksiyon sıcaklığı (°C)	51,6	55	60	65	68,4
t=Reaksiyon süresi (saat)	7,9	12	18	24	28,1

3.2.9. Ürünün pilot ölçekte üretimi

Yapılandırılmış yağların pilot ölçekte üretimi, Şekil 3.3'de gösterilen 1 litre hacime sahip karıştırılmalı tank tipi kesikli biyoreaktörde Tepki-Yüzey Yöntemi ile tespit edilen optimum koşullar uygulanarak, gerçekleştirilmiştir. Substrat, enzim ve çözgenin homojen karıştırılması için dört bıçaklı bir karıştırıcı kullanılmıştır. Her bir bıçağın boyu ve eni sırasıyla, 2 cm ve 1 cm, tankın çapı 10,5 cm ve uzunluğu 15

cm'dir. Karıştırıcı, bir pervane motor (SL 2400, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) yardımıyla çalıştırılmıştır (Lee ve Akoh, 1998).

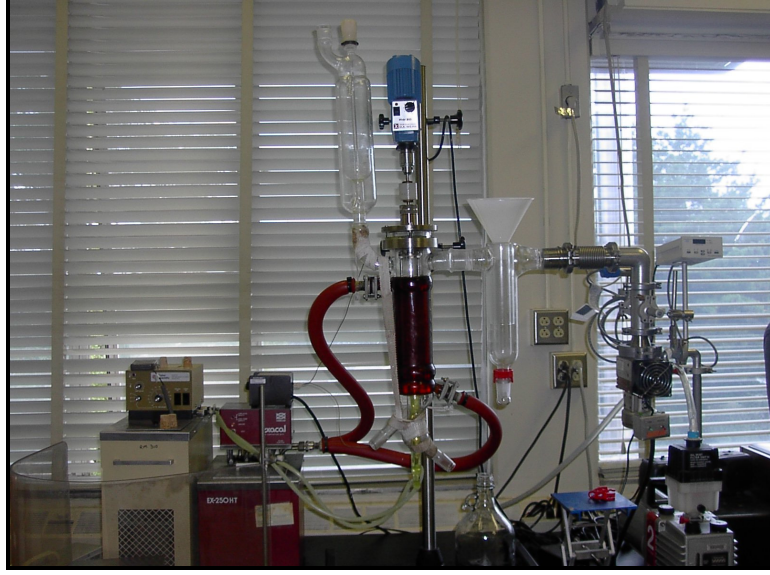
Biyoreaktörün sıcaklığı su banyosundan (Cole Parmer Instrument Co. Niles, IL) su sirkülasyonu ile sağlanmıştır. TAG (tripalmitin) seviyesi 50 mg'dan 65,6 gram'a artırılmış ve fındık yağı serbest yağ asitlerinin miktarı ve hekzan miktarı ise bu miktarla orantılı olacak şekilde artırılmıştır. İnkübasyon optimum koşullar olan 64,5°C sıcaklıkta 22,8 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3: Tank tipi kesikli biyoreaktör ve su banyosu

3.2.10. Reaksiyon ürünlerinin saflaştırılması

Üretilen yapılandırılmış yağın saflaştırılması için Şekil 3.4'de gösterilen KJDL-4 model kısa-yollu distilasyon ünitesi (UIC Inc., Joliet, IL) kullanılmıştır. Distilasyon ünitesinin ısıtma sıcaklığı 185°C; soğutma suyu sıcaklığı 20°C; vakum pompası < 1mm Hg; besleme hızı 100 ml/saat olacak şekilde çalışılmıştır (Lee ve Akoh, 1998).



Şekil 3.4: Kısa-yollu distilasyon ünitesi

3.2.11. İstatistiksel analiz

Tepki-yüzey yöntemi ile elde edilen sonuçların analizi

TYT ile optimizasyon çalışmalarında, deneylerden elde edilen sonuçlara regresyon analizi, istatistiksel olarak önem derecesi analizi uygulanmış, tepki-yüzey ve izdüşüm grafiklerinin çizimi Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) ve Statistica 6.0 (StatSoft® Inc., ABD) programı kullanılarak yapılmıştır. Optimum reaksiyon koşulları, “substrat mol oranı”, “reaksiyon sıcaklığı” ve “reaksiyon süresi” terimleri kullanılarak, tepki-yüzey yönteminden tahminlenen eşitlik ile elde edilmiştir. İkinci derece terimlerin katsayıları, regresyon analizi ve “geriye dönük eleme” yöntemiyle saptanmıştır. Modelin uygunluğu, R^2 model katsayısı ve varyans analizi (ANOVA) sonuçları ile değerlendirilmiştir (Shieh ve diğ., 1995; Shieh ve diğ., 1995; Xu ve diğ., 1998; Xu ve diğ., 2000b; Muralidhar ve diğ., 2001; Rao ve diğ., 2002; Naessens ve diğ., 2004; Lumor ve Akoh, 2005). Tepki için sonuçların modellenmesinde 1 no’lu eşitlikte gösterilen ikinci derece-polinom model kullanılmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

Eşitlikte:

Y: Tepki

β_0 : Kesişim terimi

β_i : Lineer (1.derece) regresyon katsayısı

β_{ii} : Kuadratik (2.derece) regresyon katsayısı

β_{ij} : Etkileşim regresyon katsayısı

X_i ve X_j : Bağımsız değişkenler

2 yollu varyans analizi (ANOVA) sonuçları

Anne sütüne benzer YY'ların tripalmitin, fındık yağı SYA ve stearik asit kullanılarak üretiminde kullanılan farklı substrat mol oranlarının (tripalmitin:SYA:stearik asit), farklı sıcaklıkların ve bunların etkileşimlerinin oleik asit katılımı, stearik asit katılımı ve oleik/palmitik asit oranına etkileri, “2 yollu varyans analizi” (ANOVA) ile incelenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Deneysel çalışmaların bulguları substratların karakterizasyonunun ardından tezin içermekte olduğu dört ayrı çalışmanın bulguları şeklinde verilmiştir.

4.1. Substratların Karakterizasyonu

4.1.1 Tripalmitin, fındık yağı ve fındık yağı serbest yağ asitlerinin bileşimi

Kapiler gaz-sıvı kromatografisi yöntemi (Agilent Technologies 6890N) ile belirlenen tripalmitinin, fındık yağının, ve fındık yağı SYA'lerinin yağ asidi bileşimleri ve ilgili literatür değerleri ile Türk Gıda Kodeksi “Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği”nin limit değerleri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1’den görüleceği gibi, substrat olarak kullanılan tripalmitin %95,49 oranında palmitik asit içermektedir. Kullanılan fındık yağının YA bileşimi hem daha önce çeşitli araştırmacılar tarafından tespit edilen değerlere hem de Türk Gıda Kodeksi, Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği’nde Ek-1’deki Tabloda belirtilen aralık değerlerine uygun bulunmuştur.

Tablo 4.1: Tripalmitin, fındık yağı ve fındık yağı SYA'lerinin yağ asidi bileşimleri ve ilgili literatür değerleri (%)

Yağ asitleri	Tripalmitin	Fındık yağı	TGK ¹	Türk tipi fındık çeşitlerine ait literatür değerleri ²	Türk tipi fındık çeşitlerine ait literatür değerleri ³	Türk tipi fındık çeşitlerine ait literatür değerleri (tombul fındık) ⁴	Türk tipi fındık çeşitlerine ait literatür değerleri (tombul fındık) ⁵	Fındık yağı SYA
Miristik asit (C14:0)	1,96±0,04	-	TED-0,1	-	-	0,03 ±0,00	0,01-0,16	-
Palmitik asit (C16:0)	95,49±0,09	6,78±0,22	4,32-8,89	5,43	6,6-8,3	4,85 ±0,02	4,39-8,85	6,23±0,06
Palmitoleik asit (C16:1)	-	0,22±0,01	TED-1,15	0,20	-	0,16 ±0,00	-	0,19±0,00
Stearik asit (C18:0)	2,55±0,04	0,09±0,01	TED-2,67	2,76	2,8-3,8	2,73 ±0,00	1,67-3,18	-
Oleik asit (C18:1)	-	82,60±0,24	71,0-91,0	83,47	75,7-77,7	82,72 ±0,04	73,48-81,57	83,82±0,07
Linoleik asit (C18:2)	-	10,01±0,01	5,7-22,2	7,55	11,1-13,8	8,89 ±0,01	10,46-15,61	9,58±0,02
Linolenik asit (C18:3)	-	0,08±0,00	TED-0,2	0,08	-	0,10 ±0,00	0,02-0,34	0,09±0,01
Araşidik asit (C20:0)	-	0,09±0,00	TED-0,1	0,13	-	0,14 ±0,00	-	-
Ekosenoik asit (C20:1)	-	0,13±0,03	TED-0,2	0,16	-	0,16 ±0,00	-	0,01±0,01
Behenik asit (C22:0)	-	-	-	0,20	-	0,03±0,00	-	-

¹ Anon., 2003a; Anon., 2003b² Bada ve diğ., 2004³ Özdemir ve diğ., 2001⁴ Alaşalvar ve diğ., 2003⁵ Balta ve diğ., 2006

TED: Tespit edilemeyen düzey

4.1.2. Hodan yağı, gamma-linolenik asit konsantresi, menhaden yağı ve omega-3 yağ asidi konsantresinin yağ asitleri bileşimi

Hodan yağı, ve hodan yağından “üre fraksiyonlama” yöntemi ile elde edilen GLA konsantresinin gaz-sıvı kromatografisi yöntemi (Agilent Technologies 6890N) ile belirlenen yağ asidi bileşimleri ve ilgili literatür değerleri Tablo 4.2’de verildiği gibidir. Deneylerde kullanılan hodan yağı ve GLA konsantresinin değerleri ikili paralel çalışma sonuçlarının ortalamalarıdır.

Tablo 4.2: Hodan yağının ve “üre fraksiyonlama” yöntemi ile elde edilen GLA konsantresinin yağ asidi bileşimi ve ilgili literatür değerleri (% ağırlık)

Yağ asitleri	Deneylerde kullanılan hodan yağı	Hodan yağı ¹	Deneylerde kullanılan GLA konsantresi	GLA konsantresi ²
Palmitik asit (C16:0)	15,26±0,03	10,3-16,8	-	-
Stearik asit (C18:0)	5,53±0,06	3,9-5,4	-	-
Oleik asit (C18:1n9)	15,86±0,08	15,6-17,5	-	-
Linoleik asit (C18:2n6)	36,66±0,02	36-38,4	-	7,60±0,04
GLA (C18:3n6)	23,05±0,03	21,3-22,5	99,29±0,03	91,5±3,14
Ekosenoik asit (C20:1n9)	2,66±0,02	2,4-4,68	0,71±0,03	-
Erusik asit (C22:1 n9)	0,97±0,02	0,8-3,14	-	-
Nervonik asit (C24:1 n9)	-	2,15	-	-

¹ Shimada ve diğ., 1999; Spurvey ve Shahidi, 2000; Kawashima ve diğ., 2002

² Spurvey ve Shahidi, 2000

Üre fraksiyonlama yöntemi, hodan yağından doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin elimine edilmesi için sıkça uygulanan bir yöntemdir (Wanasundara ve Shahidi, 1999; Spurvey and Shahidi, 2000). Tablo 4.2’den de görüleceği üzere, GLA konsantrasyonu bu yöntemle %23’den %99,36’ya artmıştır. Spurvey and Shahidi (2000)’nin hodan yağından üre fraksiyonlama yöntemi ile GLA konsantresi elde ettikleri ve reaksiyon koşullarını optimize ettikleri çalışmada optimum koşullar altında (reaksiyon süresi: 16 saat, reaksiyon sıcaklığı: -7°C ve üre:YA oranı (ağırlık/ağırlık): 3,7) GLA miktarı %21,6’dan %91,5’e çıkarılmıştır. Ancak bu

çalışmada uygulanan koşullarda (reaksiyon süresi: 16 saat, reaksiyon sıcaklığı: 0-4°C ve üre:YA oranı (ağırlık/ağırlık): 3,70) GLA miktarı Spurvey and Shahidi (2000)'nin elde ettiği GLA miktarından daha yüksek bulunmuştur. Sonucun hem sıcaklıkta yapılan modifikasyondan hem de başlangıçtaki hoda yağının YA bileşiminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Menhaden balık yağı ve bu yağdan “üre fraksiyonlama” yöntemi ile elde edilen omega-3 YA konsantresinin yağ asidi bileşimi ve ilgili literatür bilgileri Tablo 4.3’de gösterilmektedir. Asidoliz reaksiyonlarında kullanılacak olan omega-3 YA konsantresi için verilen değerler ikili paralel çalışma sonuçlarının ortalamalarıdır.

Tablo 4.3: Menhaden balık yağlarının ve “üre fraksiyonlama” yöntemi ile elde edilen omega-3 yağ asidi konsantrelerinin yağ asidi bileşimleri (% ağırlık)

	Menhaden balık yağı				Omega-3 YA konsantresi		
Yağ asitleri	1	2	3	4	3	4	Deneylerde kullanılan omega-3 YA konsantresi
C14:0	8,5	5,6	9,0	4,8	0,5	1,1	-
C16:0	19,4	21,6	16,7	17,5	0,3	3,2	1,30±0,01
C16:1	10,3	7,9	11,6	17,3	1,6	1,5	2,08±0,03
C16:2	-		2,2	-	2,6	-	2,65±0,04
C16:3n-4	-		1,5	-	3,8	-	9,48±0,19
C17:0	3,9		-	-	-	-	-
C18:0	5,4	9,0	3,1	2,6	3,9	0,6	-
C18:1n9	15,0	15,5	6,8	13	0,2	2,2	2,07±0,02
C18:1n7	-		3,2	-	-	-	-
C18:2	3,5	1,5	1,3	-	0,4	-	1,16±0,04
C18:3n4	-		0,4	-	1,1	-	-
C18:3n3	1,7	1,4	1,2	-	0,7	-	-
C18:4n3	3,6		3,4	2,3	10,8	8,9	21,15±0,28
C20:1n9	1,4		1,1	-	-	-	-
C20:4n6	-		0,8	-	0,9	-	-
C20:4n3	-		1,7	-	2,8	-	-
C20:5 (EPA)	11,9	13,5	12,3	13,5	23,6	29,4	25,00±0,06
C22:5	2,5		2,0	-	2,2	-	1,59±0,03
C22:0	-	5,3	-	-	-	-	-
C22:6 (DHA)	12,9	11,5	13,5	12,6	42,1	41,8	33,53±0,65
Diğer	-	5,8	-	-	-	-	-

¹ Fomuso, 2002; Xu ve diğ., 2000b

² Chen ve diğ., 2006

³ Can ve Özçelik, 2005

⁴ Lin ve diğ., 2006

Tablo 4.3'den görüleceği gibi, çeşitli araştırmacılar tarafından analizlenen menhaden balık yağının YA bileşimleri birbirine oldukça benzemektedir.

Üre fraksiyonlama yöntemi kullanılarak elde edilen omega-3 YA konsantresinde menhaden balık yağındaki özellikle doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri elimine edilerek çoklu doymamış YA'lerinin konsantrasyonu artmıştır. Bu işlem sonucunda omega-3 konsantresindeki EPA miktarı %25 ve DHA miktarı ise %33,53 olmuştur.

4.1.3. Fındık yağının sn-2 pozisyonunda bulunan yağ asidi bileşimi

Pankreatik lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilen sn-2 pozisyonundaki yağ asitlerinin analizi sonucunda TLC'den elde edilen 2-MAG metillendirilmiş ve kapiler gaz-sıvı kromatografisi yöntemi (Agilent Technologies 6890N) ile deneylerde kullanılan fındık yağının sn-2 pozisyonundaki YA oranları belirlenmiş olup, dörtlü paralel çalışma sonuçlarının ortalamaları ve ilgili literatür değerleri Tablo 4.4'de belirtilmektedir.

Tablo 4.4: Fındık yağının sn-2 pozisyonundaki yağ asidi oranları ve ilgili literatür değerleri (% ağırlık)

Yağ asitleri	Deneylerde kullanılan fındık yağı	Türk tipi fındık çeşitleri ¹
Palmitik asit (C16:0)	0,55±0,04	0,3-1,3
Palmitoleik asit (C16:1)	0,17±0,02	0,1
Stearik asit (C18:0)	-	0,2-0,7
Oleik asit (C18:1)	86,60±0,25	78,7-88,2
Linoleik asit (C18:2)	12,68±0,21	11,0-20,0
Linolenik asit (C18:3)	-	0,1-0,2

¹ Crews ve diğ., 2005

Tablo 4.4'deki bulgular Crews ve arkadaşlarının Türkiye'den temin ettikleri 6 farklı fındık numunesinden ekstrakte ettikleri yağlardaki sn-2 pozisyonundaki yağ asidi oranları ile benzerlik göstermektedir (Crews ve diğ., 2005).

4.2. “Anne Sütü Yağına Benzer Yapılandırılmış Yağların Tripalmitin, Fındık Yağı Serbest Yağ Asitleri ve Stearik Asit ile Enzimatik Asidoliz Yoluyla Üretimi”

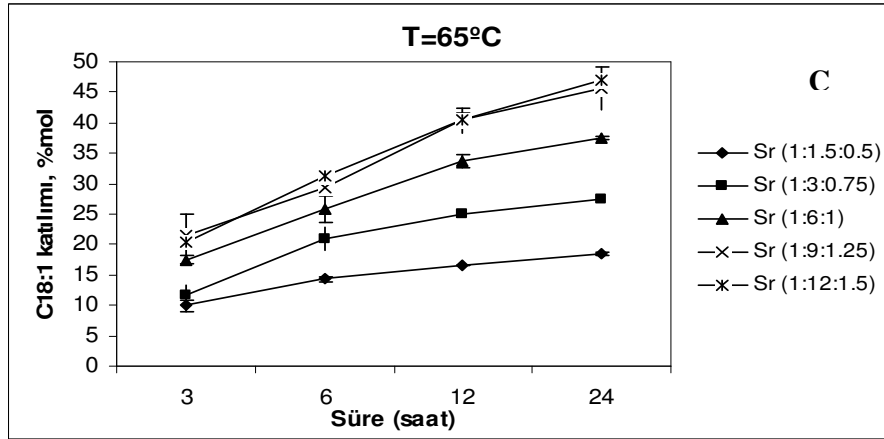
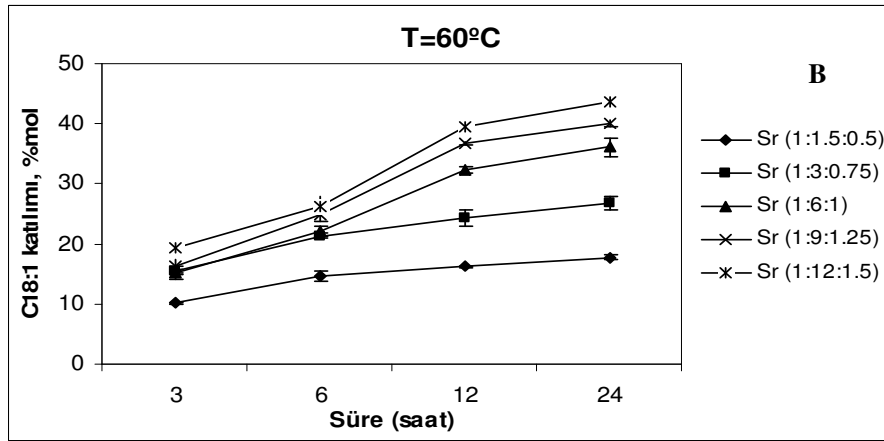
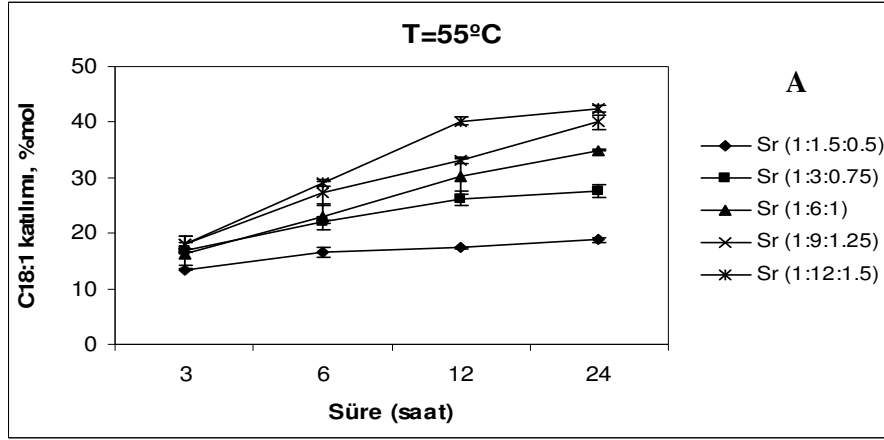
Üç farklı sıcaklıkta (55, 60, 65°C) ve 5 farklı substrat mol oranıyla (1:1,5:0,5, 1:3:0,75, 1:6:1, 1:9:1,25 ve 1:12:1,5) tripalmitin, fındık yağı SYA ve stearik asit arasında sn-1,3 spesifik lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimeleri sonucunda sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında oleik asit, stearik asit ve linoleik asit bulunan, sn-2 pozisyonunda %70 civarında palmitik asit bulunan YY’ların eldesi ve bu YY’larda oleik/palmitik asit oranının anne sütü yağındaki orana (~1,2) benzemesi hedeflenmiştir.

Beş farklı substrat mol oranı (1:1,5:0,5; 1:3:0,75; 1:6:1; 1:9:1,25 ve 1:12:1,5), reaksiyon sıcaklığı (55, 60, 65°C) ve dört farklı reaksiyon sürelerinde (3, 6, 12, 24 saat) oleik ve stearik asidin tripalmitine katılma oranları ve YY’ların oleik/palmitik oranları belirlenmiştir.

4.2.1. Oleik asit katılımı

Farklı substrat mol oranlarındaki ve sıcaklıklardaki oleik asit katılım oranları Şekil 4.1’de gösterilmektedir. Oleik asitin tripalmitine katılımı en fazla (%47,1) 1:12:1,5 S_r, 65°C ve 24 saatlik reaksiyon sonunda olurken, en az (%10) katılım 1:1,5:0,5 S_r, 65°C ve 3 saat reaksiyon sonunda gerçekleşmiştir (Şekil 4.1C). Reaksiyon süresi ve substrat mol oranı arttıkça oleik asit katılımı da çalışılan üç sıcaklıkta da artmıştır. Reaksiyon süresi ve substrat mol oranının YA katılımına olan etkisi çeşitli araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir (Lee ve Akoh, 1998; Fomuso ve Akoh, 1997).

Şekil 4.1A’dan görüleceği gibi, oleik asidin tripalmitine katılma hızı 1:3:0,75 S_r’na kadar hızla artmış, 1:3:0,75 S_r’ndan 1:6:1 S_r’na kadar hızı azalmış, daha sonra 1:12:1,5 S_r’a kadar hızı artmaya devam etmiştir. Ancak daha yüksek S_r’larında yüksek substrat konsantrasyonu nedeniyle oluşabilecek enzim inhibisyonu sonucunda oleik asidin tripalmitine katılma miktarının azalabileceği görülmüştür (Sellapan ve Akoh, 2001).

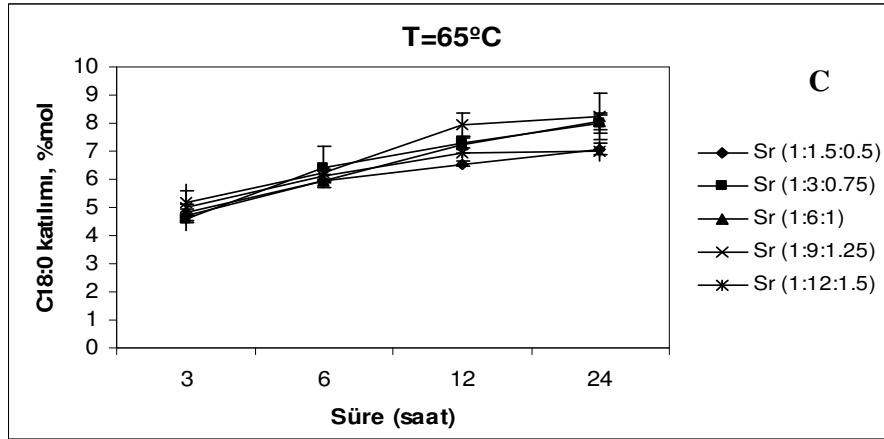
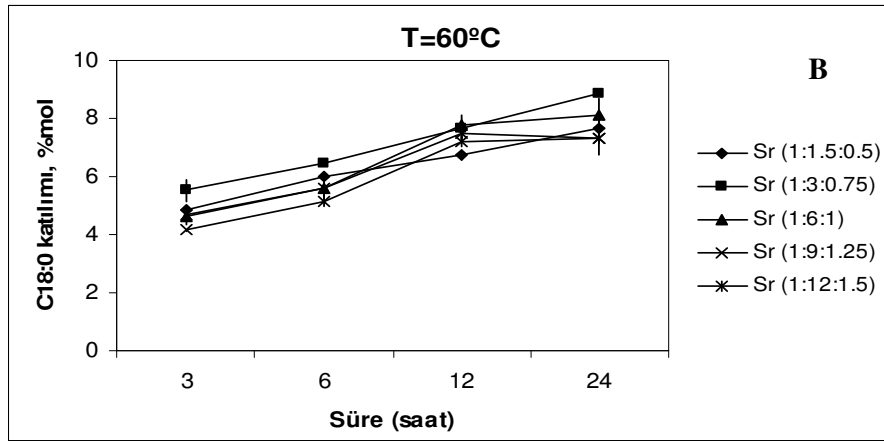
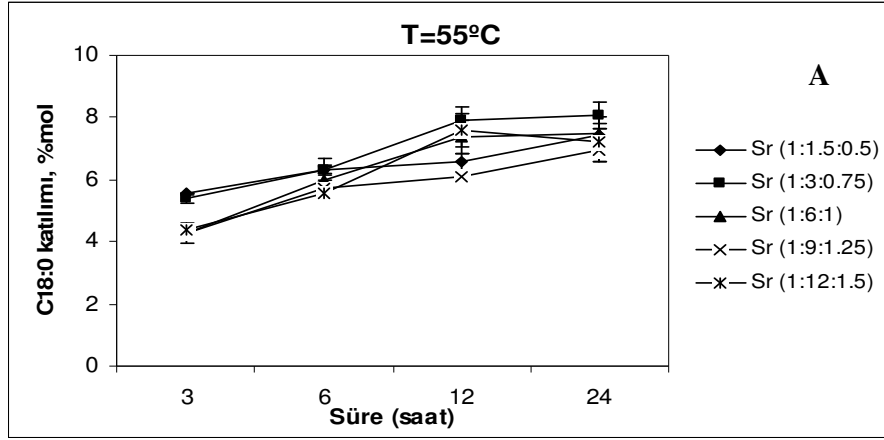


Şekil 4.1: Oleik asidin farklı substrat mol oranlarında [1:1,5:0,5; 1:3:0,75; 1:6:1; 1:9:1,25; 1:12:1,5 (tripalmitin:fındık yağı SYA:stearik asit)] tripalmitine katılımı. Örnekler 3, 6, 12, 24 üncü saatlerde analizlenmiştir (x-ekseni). Y-ekseni C18:1'in katılımını (%mol) göstermektedir. İnkübasyonlar (A) 55°C, (B) 60°C, ve (C) 65°C.

4.2.2. Stearik asit katılımı

Farklı substrat mol oranlarındaki ve sıcaklıklardaki stearik asidin tripalmitine katılım oranları Şekil 4.2’de gösterilmektedir. Stearik asidin tripalmitine en fazla katılımı (%8,9) 1:3:0,75 S_r , 60°C ve 24 saat reaksiyon koşullarında olurken, en az katılım (%4,1) aynı S_r ’nında ve sıcaklıkta fakat 3 saat reaksiyon sonunda gerçekleşmiştir. Reaksiyon süresi arttıkça, incelenen tüm substrat mol oranlarında stearik asit katılımı da artmıştır. Genel olarak, stearik asit katılımı incelenen her üç sıcaklıkta da 1:3:0,75 substrat mol oranında en yüksek olmuştur (Şekil 4.2). Bu substrat mol oranında katılımının yüksek olması reaksiyon karışımındaki stearik asit konsantrasyonun yüksek olmasından kaynaklanabilmektedir.

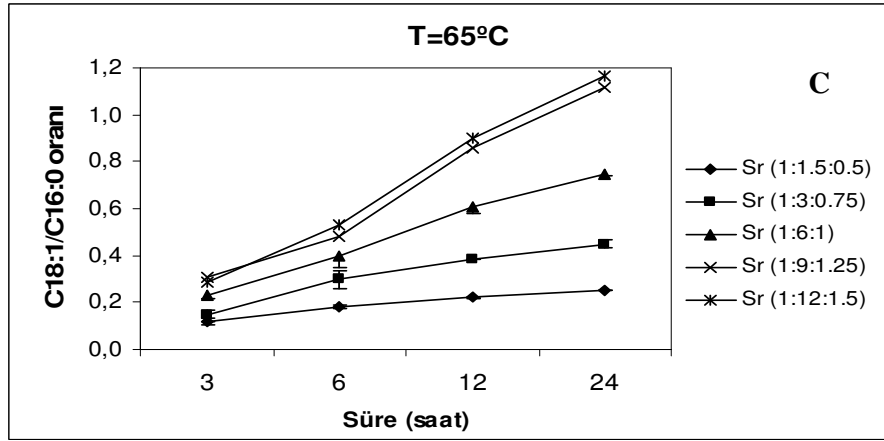
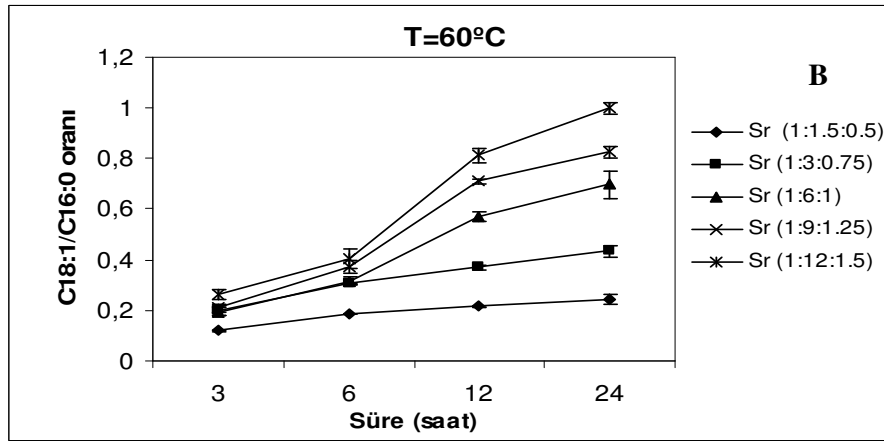
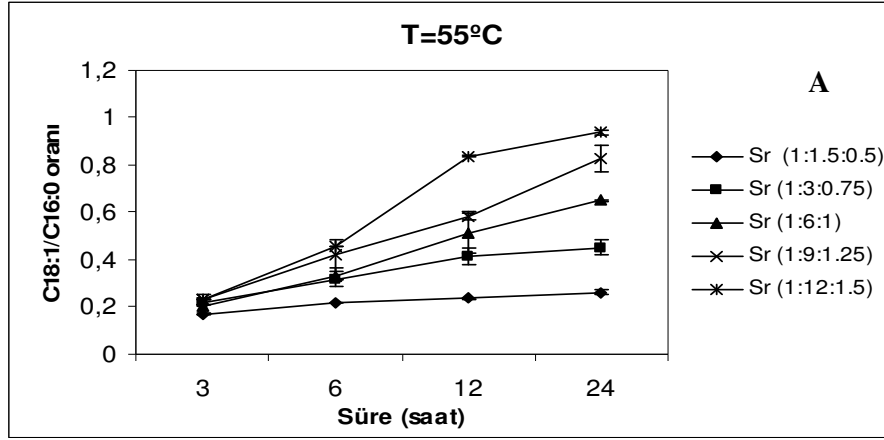
Şekil 4.2B’den de görüleceği üzere, stearik asidin tripalmitine katılımı 1:3:0,75 S_r ’nda optimum olurken, 1:9:1,25 S_r ’nında katılma hızı azalmış ve 1:12:1,5 S_r ’nında sabit kalmıştır. Bu durum substrat mol oranı arttıkça, oleik asidin tripalmitine katılma oranının artmasından dolayı stearik asidin katılım oranını düşürmesi şeklinde açıklanabilir. Enzimin yüksek substrat mol oranlarında oleik aside olan tercihi, bu substrat mol oranlarında stearik asit katılımının düşük olmasını kısmen açıklamaktadır.



Şekil 4.2: Stearik asidin [1:1,5:0,5; 1:3:0,75; 1:6:1; 1:9:1,25; 1:12:1,5 (tripalmitin:fındık yağı SYA:stearik asit)] tripalmitine katılımı. Örnekler 3, 6, 12, 24 üçüncü saatlerde analizlenmiştir (x-ekseni). Y-ekseni C18:0'ın katılımını (%mol) göstermektedir. İnkübasyonlar (A) 55°C, (B) 60°C, ve (C) 65°C.

4.2.3. “Oleik/palmitik” asit oranı

“Oleik/palmitik” asit oranının farklı substrat mol oranları üç farklı sıcaklıktaki değişimi Şekil 4.3’de verilmiştir. Reaksiyon ürünlerinin oleik/palmitik asit oranının, substrat mol oranı ve reaksiyon süresi ile birlikte arttığı, ve 1:12:1,5 Sr, 65°C’de ve 24 saat reaksiyon süresi koşullarında elde edilen ürünün en yüksek (1,2) “oleik/palmitik” asit oranına sahip olduğu gözlenmiştir. En düşük oran (0,1) ise 1:1,5:0,5 Sr, 60°C ve 65°C’lerde 3 saat reaksiyon süresi sonunda elde edilmiştir. Düşük substrat mol oranlarında düşük “oleik/palmitik” asit oranı gözlenmesi, tripalmitin molekülüne oleik asit katılımının az olmasından ileri gelmektedir.



Şekil 4.3: Oleik/palmitik asit oranı [1:1,5:0,5; 1:3:0,75; 1:6:1; 1:9:1,25; 1:12:1,5 (tripalmitin:fındık yağı SYA:stearik asit)]. Örnekler 3, 6, 12, 24 üncü saatlerde analizlenmiştir (x-ekseni). Y-ekseni C18:1/C16:0 oranını göstermektedir. İnkübasyonlar (A) 55°C, (B) 60°C, ve (C) 65°C.

4.2.4. Yapılandırılmış yağların sn-2 pozisyonunda bulunan yağ asidi bileşimi

24 saat sonunda oleik/palmitik asit oranı 0,9 ve daha yüksek olan YY'ların, sn-2 pozisyonundaki YA kompozisyonları belirlenmiştir. Bu YY'ların toplam yağ asidi kompozisyonu ve sn-2 pozisyonundaki YA kompozisyonu Tablo 4.5'de gösterilmektedir. Tablo 4.5'den de görüleceği üzere, YY'lardaki oleik asit miktarı %42,5-47,1, palmitik asit miktarı %40,5-45,3, stearik asit miktarı %7,0-8,3 ve linoleik asit miktarı %5,0-5,4 arasında değişmektedir. YY'ların sn-2 pozisyonunda bulunan palmitik asit miktarı ise %69,2-76,0 arasında değişmiştir. Palmitik asidi oleik, stearik ve linoleik asit takip etmiştir. Sn-1,3 spesifik lipaz kullanılmasına rağmen sn-2 pozisyonuna YA'lerinin katılımı asidoliz reaksiyonları sırasında olan açıl migrasyon nedeniyle gerçekleşmektedir (Xu ve diğ., 1998).

Tablo 4.5: YY'ların YA kompozisyonu (% mol) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları (% mol)

	(1)		(2)		(3)		(4)	
Yağ asitleri	YA	sn-2 YA	YA	sn-2 YA	YA	sn-2 YA	YA	sn-2 YA
16:0	45,3	76,0	43,8	70,9	41,2	69,2	40,5	70,9
18:0	7,2	5,1	7,3	6,4	8,3	5,8	7,0	6,7
18:1	42,5	17,2	43,8	20,7	45,6	22,7	47,1	20,4
18:2	5,0	1,8	5,1	2,0	5,0	2,4	5,4	2,1
C18:1/C16:0	0,9		1,0		1,1		1,2	

YY'ların elde edildiği koşullar: (1) 1/12/1,5 Sr, 55°C, 24 saat (2) 1/12/1,5 Sr, 60°C, 24 saat (3) 1/9/1,25 Sr, 65°C, 24 saat (4) 1/12/1,5 Sr, 65°C, 24 saat.

Elde edilen YY'larda oleik asit ve diğer YA miktarı arttıkça, sn-1,3 spesifik lipazın etkisi nedeniyle palmitik asidin miktarı azalmıştır. YY'ların sn-2 pozisyonunda sırasıyla palmitik, oleik, stearik ve linoleik asit azalan miktarlarda bulunmaktadır. Tüm bu YY'ların sn-2 pozisyonundaki YA kompozisyonu anne sütü yağının sn-2 pozisyonunun YA kompozisyonuna oldukça yakın bulunmuştur.

Bilindiği üzere, anne sütü yağı TAG'lerindeki palmitik asidin pozisyonu, miktarı ve doymamış YA'lerinin pozisyonu bebeklerde yüksek YA ve kalsiyum absorpsiyonunu ve enerjinin verimli kullanımını etkilemektedir (Innis ve diğ., 1995; López- López ve diğ., 2001). Bu nedenle, anne sütü yağı kompozisyonuna benzer kompozisyona sahip, aynı zamanda bebeklerin beslenmesi ve gelişimi açısından

gerekli olan olan YA'lerini doğru miktarlarda ve pozisyonlarda içeren YY'ların üretilmeleri mümkün olmuştur.

4.2.5. İstatistiksel analiz

Üç farklı sıcaklığın ve 5 farklı substrat mol oranının 24 saat reaksiyon süresi sonundaki stearik asit katılımı, oleik asit katılımı ve “oleik/palmitik asit” oranına etkileri, “iki yollu ANOVA” istatistik yöntemi ile incelenmiştir. Oleik asit katılımı için varyans analizi Tablo 4.6’da, stearik asit katılımı için varyans analizi Tablo 4.7’de ve “oleik/palmitik asit” oranı için varyans analizi Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.6: Oleik asit katılımı için “iki yollu ANOVA” istatistik yöntemi ile değerlendirme sonuçları

	SD	KT	KO	F değeri (Hesap)	F değeri (Tablo)
KT toplam	29	2870,80			
KT substrat	4	2776,53	694,13	517,15	3,06
KT sıcaklık	2	44,55	22,27	16,59	3,68
KT interaksiyon	8	29,59	3,70	2,76	2,64
KT hata	15	20,13	1,34		

SD: Serbestlik derecesi, KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması

Tablo 4.7: Stearik asit katılımı için “iki yollu ANOVA” istatistik yöntemi ile değerlendirme sonuçları

	SD	KT	KO	F değeri (Hesap)	F değeri (Tablo)
KT toplam	29	11,35			
KT substrat	4	4,92	1,23	6,98	3,06
KT sıcaklık	2	0,92	0,46	2,62	3,68
KT interaksiyon	8	2,87	0,36	2,03	2,64
KT hata	15	2,64	0,18		

SD: Serbestlik derecesi, KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması

Tablo 4.7’de gösterilen stearik asit katılımı için yapılan “iki yollu ANOVA” istatistik yöntemi sonucuna göre, sadece substrat mol oranının F değeri (6,98) F_{TABLO} (3,06) değerinden yüksek olduğundan $p < 0,05$ olasılık düzeyinde substrat mol oranı stearik asit katılımı için istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Ancak sıcaklık ve substrat mol oranı ile sıcaklığın interaksiyonunun F değerleri (2,62; 2,03) F_{TABLO} (3,68 ve

2,64) değerlerinden küçük olduğu için $p<0,05$ olasılık düzeyinde stearik asidin katılımında istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

Tablo 4.8: “Oleik/palmitik” asit oranı için “iki yollu ANOVA” istatistik yöntemi ile değerlendirme sonuçları

	SD	KT	KO	F değeri (Hesap)	F değeri (Tablo)
KT _{toplam}	29	2,768147			
KT _{substrat}	4	2,536847	0,634212	174,234	3,06
KT _{sıcaklık}	2	0,089447	0,044723	12,28663	3,68
KT _{interaksiyon}	8	0,087253	0,010907	2,996337	2,64
KT _{hata}	15	0,0546	0,00364		

SD: Serbestlik derecesi, KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması

Tablo 4.6 ve 4.8’den görüleceği gibi, 5 farklı substrat mol oranı (1:1,5:0,5; 1:3:0,75; 1:6:1; 1:9:1,25 ve 1:12:1,5), 3 farklı sıcaklık (55, 60 ve 65°C) ve bunların F değerleri F_{TABLO} değerlerine göre yüksek bulunmuştur ($F_{4,15}$; $F_{2,15}$; $F_{8,15}$ tablo değerleri sırasıyla, 3,06; 3,68; 2,64). Bu nedenle, oleik asit katılımı ve oleik/palmitik asit oranı için incelenen sıcaklık, substrat mol oranı ve bunların interaksiyonlarının $p<0,05$ olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

4.3.“Anne Sütüne Benzer Yapılandırılmış Yağların Tripalmitin ve Fındık Yağı Serbest Yağ Asitleri ile Enzimatik Asidoliz Yoluyla Üretimi: Reaksiyon Koşullarının Tepki-Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu”

Çalışmanın bu kısmında anne sütü yağına benzer YY’lar, tripalmitin ve fındık yağı SYA arasında gerçekleşen enzimatik asidoliz reaksiyonları ile elde edilmiş ve tepki-yüzey yöntemi kullanılarak reaksiyon koşullarının (substrat mol oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen YY’larda oleik/palmitik asit oranının anne sütü yağındaki orana (~1,25) benzemesi ve TAG’ların sn-2 pozisyonunda %70 civarında palmitik asidin bulunması hedeflenmiştir.

4.3.1. Farklı reaksiyon koşullarının oleik/palmitik asit oranına etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirmeleri

3 faktörlü, 5 seviyeli Merkezil Bileşik Deney Tasarımı ve 23 adet deney noktası için elde edilen bağımlı değişken (tepki) değerleri Tablo 4.9’da verilmektedir.

Tablo 4.9: Deney tasarımı ve deney noktalarında gözlenen tepkiler

Deney noktası	Bağımsız değişkenler		Tepki		Ürün
	S _r (mol/mol)	T (°C)	t (saat)	C18:1/C16:0	Oleik asit (% mol)
1	8	55	12	0,66	37,8
2	14	55	12	0,77	41,6
3	8	65	12	0,71	39,2
4	14	65	12	1,1	49,5
5	8	55	24	0,83	43,2
6	14	55	24	1,19	50,7
7	8	65	24	1,03	48,0
8	14	65	24	1,44	55,0
9	5,95	60	18	0,70	38,7
10	16,05	60	18	1,21	50,7
11	11	51,6	18	1,00	47,4
12	11	68,4	18	1,17	50,8
13	11	60	7,91	0,71	39,3
14	11	60	28,1	1,13	49,1
15	11	60	18	0,99	46,0
16	11	60	18	0,94	45,5
17	11	60	18	0,87	43,3
18	11	60	18	0,94	46,2
19	11	60	18	0,89	44,6
20	11	60	18	0,98	46,3
21	11	60	18	1,00	48,2
22	11	60	18	0,98	46,8
23	11	60	18	0,97	47,0

Tablo 4.9’da verilen bağımsız değişken değerlerine karşılık elde edilen tepki değerleri için çoklu regresyon ve ‘geriye dönük eleme’ yöntemleri uygulanarak başarılı kuadratik modeller elde edilmiştir. Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin hesaplanan regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P) Tablo 4.10’da gösterilmiştir.

Tablo 4.10: Lineer ve kuadratik modellerde geriye dönük eleme sonucunda elde edilen regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P -değeri)

Bağımsız değişkenler	β	P -değeri
Kesişim/Sabit	0,94	<0,0001
S_r	0,16	<0,0001
T	0,08	<0,0001
t	0,14	<0,0001
$T*T$	0,04	0,007
S_r*T	0,04	0,049

Geriye dönük eleme yöntemi uygulandıktan sonra regresyon katsayılarının önem derecelerinin 0,05'den küçük olduğu görülmektedir. Modelin katsayısı (R^2) ve düzeltilmiş katsayısı ($R^2_{düz.}$) sırasıyla 0,94 ve 0,92, modelin tahminleme gücü (Q^2) ise 0,84 olarak bulunmuştur. Tablo 4.10'dan da görüleceği gibi, bütün birinci derece katsayıların "oleik/palmitik" asit oranına etkisi pozitif olmuştur. Faktörler içinde "oleik/palmitik" asit oranına substrat mol oranının etkisi en fazla iken, bunu sırasıyla reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı izlemiştir. İkinci derece parametrelerden sıcaklık-sıcaklık ve substrat mol oranı-sıcaklık arasındaki etkileşimin pozitif yönde olduğu ve bu terimlerin model için istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur.

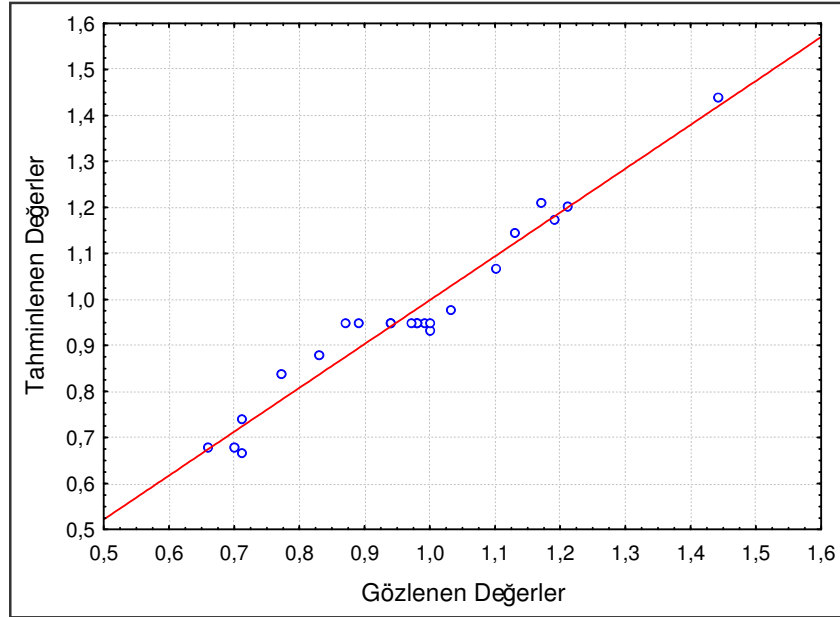
Varyans analizi (ANOVA) sonuçları Tablo 4.11'de belirtilmektedir. ANOVA analizine göre, $F_{model}(49,4) > F_{5,17}(2,81)$ olduğundan modelin tahminleme için uygun olduğu, ayrıca model hatasının yani model yetersizliğinin olasılık değeri ($p > 0,05$) olduğundan, modelin incelenen verilere uygun olduğu görülmektedir (Muralidhar ve diğ., 2001; Rao ve diğ., 2002; Naessens ve diğ., 2004; Lumor ve Akoh, 2005).

Tablo 4.11: ANOVA analizi sonuçları

"Oleik/palmitik" asit oranı	SD	KT	KO	F değeri	P -değeri	R^2 ; $R^2_{düz.}$
Toplam	23	22,24	0,97			0,94; 0,92
Sabit	1	21,45	21,45			
Toplam düzeltilen	22	0,80	0,04			
Regresyon	5	0,75	0,15	49,38	0	
Hata	17	0,05	0,003			
Model yetersizliği	9	0,04	0,004	1,88	0,19	
Tekrar hatası	8	0,02	0,002			

SD: Serbestlik derecesi, KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması, p : Olasılık değeri

Modelin uygunluğu, belirlenen model katsayısı (R^2), düzeltilmiş katsayı ($R^2_{düz}$) ve model tarafından tahminlenen değerler ile deney sonucu elde edilen değerler arasında çizilen grafik yardımıyla belirlenmektedir. Yüksek R^2 değeri modelin deney noktalarına uygunluğunu göstermektedir (Xu ve diğ., 1998; Muralidhar ve diğ., 2001; Naessens ve diğ., 2004). Bu çalışmada $R^2=0,94$ olarak belirlenmiş, ve modelden tahminlenen değerler ile deneyler sonucu gözlenen değerler arasında lineer ilişkinin olduğu, Şekil 4.4’den de görüleceği gibi, modelin ölçülen tepki ile reaksiyon parametrelerinin birbiriyle ilişkisini başarılı bir şekilde temsil ettiği gözlenmiştir.



Şekil 4.4: Gözlenen değerlere karşılık modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki

“Oleik/palmitik” asit oranı için istatistiksel olarak önemli olan 1. derece, 2. derece ve etkileşim terimleri ile oluşturulan model denklemi aşağıdaki gibidir:

$$Y = 0,94 + 0,16Sr + 0,08T + 0,14t + 0,04T^2 + 0,04Sr * T \quad (4.1)$$

Bu denklemde;

Y: Tepki (“oleik/palmitik asit”)

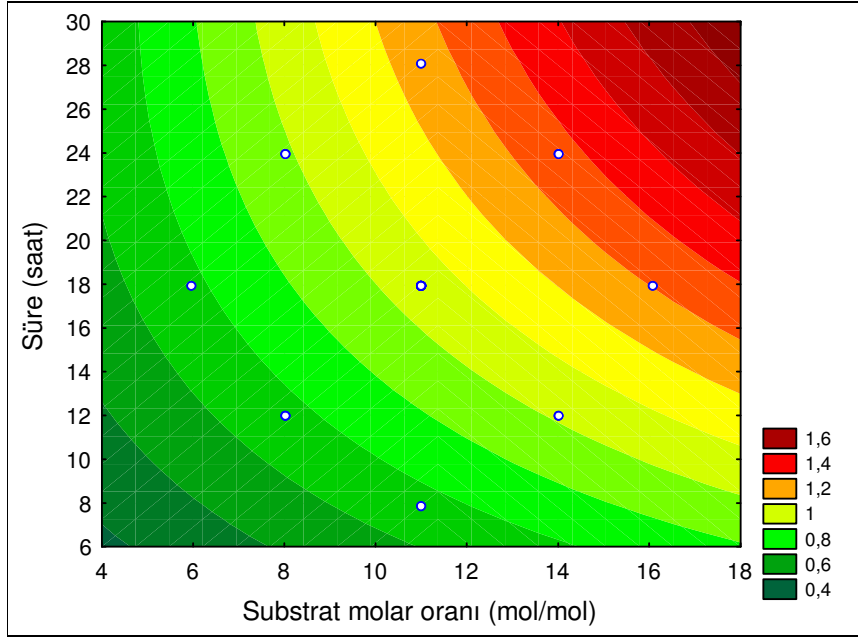
S_r : Substrat mol oranı

T: Reaksiyon sıcaklığı

t: Reaksiyon süresidir.

4.3.2. Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması

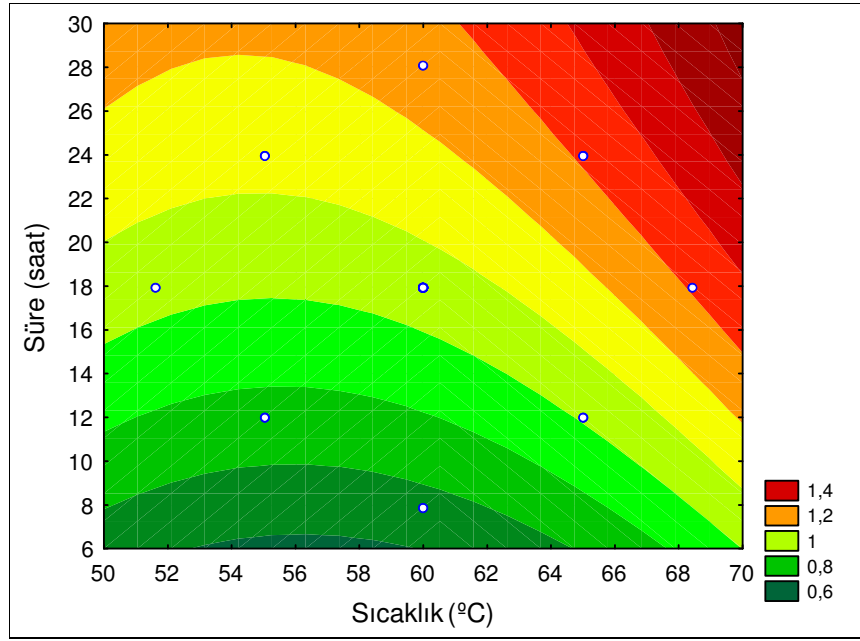
Tripalmitin'in fındık yağı serbest YA'leri ile enzimatik asidoliz reaksiyonu sonucu elde edilen ürünün "oleik/palmitik asit oranı"nın, bağımsız değişkenlerin etkileşimine göre değişimini gösteren izdüşüm grafikleri (surface plot) oluşturulmuştur. Şekil 4.5'de süre ve substrat mol oranının "oleik/palmitik asit" oranı üzerine olan etkisi görülmektedir.



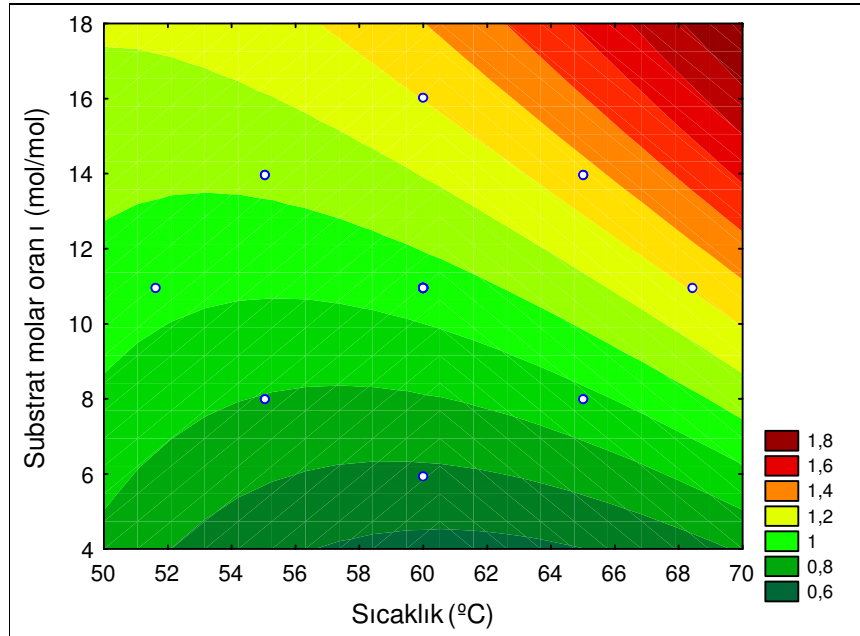
Şekil 4.5: Oleik/palmitik asit oranına süre ve substrat mol oranının etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Süre ve substrat mol oranının "oleik/palmitik asit" oranı üzerine olan etkileşimlerinden "maksimum tepki" olarak tanımlanan grafik elde edilmiştir (Montgomery, 1997). Bu grafiklerde, substrat mol oranı ve reaksiyon süresi arttıkça, "oleik/palmitik" asit oranının da arttığı ve hedeflenen C18:1/C16:0 oranının (1,25) incelenen aralıkta olduğu görülmektedir.

Şekil 4.6'da "oleik/palmitik" asit oranına süre ve sıcaklığın etkisi, Şekil 4.7'de ise substrat mol oranı ve sıcaklığın etkisi görülmektedir.



Şekil 4.6: “Oleik/palmitik” asit oranına süre ve sıcaklığın etkisini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.7: “Oleik/palmitik” asit oranına substrat mol oranı ve sıcaklığın etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Şekil 4.6 ve 4.7’den görüleceği gibi, reaksiyon sıcaklığı ile reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı ile substrat mol oranı etkileşimleri sonucunda literatürde “sırt noktası” olarak tanımlanan izdüşüm grafikleri elde edilmiştir (Montgomery, 1997).

Şekil 4.6’da, reaksiyon süresi özellikle 12 saatin üzerinde sabit tutulup reaksiyon sıcaklığı artırıldığında C18:1/C16:0 oranının da arttığı görülmektedir.

Oleik/palmitik” asit oranına substrat mol oranı ve sıcaklığın etkisinin gösterildiği Şekil 4.7’de ise hedeflenen “C18:1/C16:0” oranını sağlamak için, yüksek substrat mol oranlarında ya reaksiyon sıcaklığı düşürülmeli ya da düşük substrat mol oranlarında reaksiyon sıcaklığı arttırılmalıdır.

Hedeflenen oleik/palmitik asit oranına (1,25) sahip YY elde etmek için, Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı yardımıyla belirlenen optimum reaksiyon koşulları Tablo 4.12’de yer almaktadır.

Tablo 4.12: Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı ile belirlenen optimum koşullar

Deney no	Sr (mol/mol)	T (°C)	t (saat)	Tahminlenen C18:1/C16:0 oranı
1	13,4	62	23,6	1,25
2	12,9	62,7	23,4	1,24
3	12,2	64,5	22,8	1,24
4	13,2	62,7	23,6	1,26
5	12,9	64,1	22,1	1,25
6	12,5	64	22,6	1,24

Bu koşullar arasından en düşük substrat mol oranına sahip reaksiyon koşulu hem substrat maliyetini hem de saflaştırma maliyetini azaltmak için optimum değer olarak seçilmiştir (Yang ve diğ., 2003a). “12,2 mol/mol substrat mol oranı”, “64,5°C reaksiyon sıcaklığı” ve “22,8 saat reaksiyon süresi” optimum koşullar olarak belirlenmiştir.

4.3.3. Modelin doğrulanması ve karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde üretim

TYT ile elde edilen optimum koşullar kullanılarak modelin doğruluğunun araştırılması için, asidoliz reaksiyonları belirlenmiş optimum koşullar olan substrat mol oranı (12,2 mol/mol), reaksiyon sıcaklığı (64,5°C), reaksiyon süresi (22,8 saat)’nde önce test tüplerinde, daha sonra pilot ölçekte karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda elde edilen YY’ların YA kompozisyonu ve sn-2 pozisyonundaki YA kompozisyonu Tablo 4.13’de belirtilmiştir.

Tablo 4.13: Optimum koşullarda elde edilen YY'ların YA kompozisyonu (% mol) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları (% mol)

Yağ asidi	Küçük ölçekli üretim		Karıştırmalı tank tipi biyoreaktörde üretim	
	YA	sn-2 pozisyonu	YA	sn-2 pozisyonu
16:0	39,9	75,7	37,2	76,9
18:0	1,5	3,0	1,2	2,4
18:1	52,1	19,3	54,0	18,2
18:2	5,9	2,0	7,10	1,5
C18:1/C16:0	1,3		1,45	

Tablo 4.12 ve Tablo 4.13 birlikte incelendiğinde, modelden tahminlenen değerler ile deneyler sonucu elde edilen değerlerin birbirine yakın oldukları görülmektedir.

Küçük ölçekli üretim sonucunda elde edilen anne sütü yağına benzer YY'ın, %52,1 oleik asit, %39,9 palmitik asit, ve %5,9 linoleik asit içerdiği ve palmitik asidin %75,7'sinin de TAG'in sn-2 pozisyonunda bulunduğu belirlenmiştir. Tank tipi kesikli biyoreaktörde yapılan üretim sonucunda ise, YY %54,0 oleik asit, %37,2 palmitik asit, ve %7,10 linoleik asit içermiş ve palmitik asidin %76,9'u TAG'ün sn-2 pozisyonunda bulunmuştur. Karıştırmalı tank tipi biyoreaktördeki yapılan üretim sonucunda elde edilen YY ise küçük ölçekli üretime göre daha yüksek miktarda oleik asit içermiştir, bunun nedeni tank tipi biyoreaktörde çalkalamalı su banyosuna göre daha etkin bir karıştırmanın yapılmasından kaynaklanabilmektedir.

Yapılandırılmış yağların sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında doymamış YA'lerinin, sn-2 pozisyonunda ise yüksek miktarlarda palmitik asidin bulunması, bebek beslenmesi ve bebeklerin kemik gelişimi açısından oldukça önemli olduğundan, bu değerler anne sütü yağına benzetme amacına ulaşıldığı şeklinde değerlendirilmiştir (Jensen, 2001; Innis ve diğ., 1995).

4.4.Gamma-Linolenik Asit ile Zenginleştirilmiş Anne Sütü Yağına Benzer Yapılandırılmış Yağların Enzimatik Asidoliz Yoluyla Üretimi: Reaksiyon Koşullarının Tepki-Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY'ların üretimi, tripalmitin, fındık yağı serbest YA'leri ve GLA konsantresi arasında enzimatik asidoliz reaksiyonları ile gerçekleştirilmiş ve tripalmitine %10 GLA, %45 oleik asit katılımı hedeflenerek, "Tepki Yüzey Yöntemi" (TYY) ile reaksiyon koşullarının (substrat

mol oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzimatik asidoliz tepkimelerinde Lipozyme® RM IM ve Lipozyme® TL IM enzimleri kullanılmış bu iki enzimin GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY'ların üretimi üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır.

4.4.1. Farklı reaksiyon koşullarının gamma-linolenik ve oleik asit katılımı üzerindeki etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirmeleri

3 faktörlü, 5 seviyeli Merkezil Bileşik Deney Tasarımı ve 17 adet deney noktasında gözlenen tepkiler (Tepki 1: GLA katılımı, % mol; Tepki 2: Oleik asit katılımı, % mol) Tablo 4.14'de gösterilmektedir.

Tablo 4.14: Deney tasarımı ve deney noktalarında gözlenen tepkiler (GLA ve oleik asit katılımı)

Deney noktası	Bağımsız değişkenler			Lipozyme® RM IM enzimi ile		Lipozyme® TL IM enzimi ile	
	S _r (mol/mol)	T (°C)	t (saat)	GLA katılımı, % mol	Oleik asit katılımı, % mol	GLA katılımı, % mol	Oleik asit katılımı, % mol
1	12	55	12	6,2	35,5	4,9	35,8
2	16	55	12	6,9	38	6,7	40,6
3	12	65	12	7,1	37,1	5,9	36,9
4	16	65	12	7,2	40	7,1	38,6
5	12	55	24	11	39,9	9	41,3
6	16	55	24	10,4	44,3	11,4	43,5
7	12	65	24	11,3	41,1	7,4	41,6
8	16	65	24	11	46,3	10,1	44
9	10,64	60	18	9,9	39,6	7	39,3
10	17,36	60	18	9,9	44,4	8,1	42,5
11	14	51,59	18	7,9	38,8	9,4	41,3
12	14	68,41	18	10,4	43,7	6,8	41,4
13	14	60	7,91	5,4	33,6	3,9	30,9
14	14	60	28,09	9,8	45,9	10,3	46
15	14	60	18	11,3	41,3	8,1	41
16	14	60	18	10,4	40,3	7,3	41,5
17	14	60	18	11,4	40,3	7,3	43,3

Her iki enzimle katalizlenen reaksiyonlarda elde edilen tepkiler (Tepki 1: GLA katılımı, % mol; Tepki 2: Oleik asit katılımı, % mol) için çoklu regresyon ve “geriye dönük eleme” yöntemi uygulanarak başarılı kuadratik modeller elde edilmiştir.

Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerin regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P) hesaplanmış ve Tablo 4.15 ve Tablo 4.16’da gösterilmiştir.

Tablo 4.15: Lipozyme[®] RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için lineer ve kuadratik modellerde geriye dönük eleme sonucunda elde edilen regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P -değeri)

	Tepki 1: GLA katılımı		Tepki 2: Oleik asit katılımı	
Bağımsız değişkenler	β	P-değeri	β	P-değeri
Kesişim/Sabit	10,55	< 0,0001	41,09	< 0,0001
Sr	-0,001	0,969	1,69	< 0,0001
T	0,46	0,031	1,10	0,002
t	1,74	< 0,0001	3,05	< 0,0001
T*T	-0,53	0,021	-0,04	0,889
t*t	-1,07	0,0002	-0,57	0,074

Tablo 4.15’den görüleceği üzere, Lipozyme[®] RM IM ile katalizlenen reaksiyonlarda, birinci derece terimlerden substrat mol oranının GLA katılımına etkisi negatif yönde olmuştur. GLA katılımı için süre en önemli 1. derece terim olurken, bunu sırasıyla sıcaklık ve substrat mol oranı izlemiştir. Her iki tepki için, “sıcaklık*sıcaklık” ve “süre*süre” terimlerinin etkisi negatif olmuş, ancak her iki etki de istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Tablo 4.16: Lipozyme[®] TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için lineer ve kuadratik modellerde geriye dönük eleme sonucunda elde edilen regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P -değeri)

	Tepki 1: GLA katılımı		Tepki 2: Oleik asit katılımı	
Bağımsız değişkenler	β	P-değeri	β	P-değeri
Kesişim/Sabit	7,83	<0,0001	41,43	<0,0001
Sr	0,73	0,002	1,21	0,011
T	-0,43	0,035	0,01	0,990
t	1,76	<0,0001	3,21	<0,0001
t*t	-0,18	0,348	-1,08	0,022
T*t	-0,54	0,042	0,21	0,688

Tablo 4.16’dan görüleceği üzere, Lipozyme[®] TL IM ile katalizlenen reaksiyonlarda GLA katılımına 1. derece terimler arasında sıcaklığın etkisi negatif olmuştur; her iki tepki için 1. derece terimlerden sürenin etkisi en önemli olurken, bunu substrat mol oranı ve sıcaklık izlemiştir. İkinci derece terimlerden “süre-süre” ve etkileşim

terimlerinden “sıcaklık-süre”nin her iki tepki için istatistiksel olarak ($p<0,05$) önemli olduğu görülmüştür.

Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için varyans analizi (ANOVA) sonuçları Tablo 4.17’de, Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için varyans analizi (ANOVA) sonuçları Tablo 4.18’de gösterilmektedir.

Tablo 4.17: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için ANOVA analizi sonuçları

GLA katılımı	SD	KT	KO	F değeri	P-değeri	R ² ;R ² _{düz.}
Toplam	17	1523,75	89,63			0,92; 0,88
Sabit	1	1459,19	1459,19			
Toplam düzeltilen	16	64,56	4,04			
Regresyon	5	59,33	11,87	24,96	0	
Hata	11	5,23	0,48			
Model yetersizliği	9	4,62	0,51	1,69	0,43	
Tekrar hatası	2	0,61	0,30			
Oleik asit katılımı	SD	KT	KO	F değeri	P-değeri	R ² ;R ² _{düz.}
Toplam	17	28212,3	1659,55			0,94; 0,92
Sabit	1	28014	28014			
Toplam düzeltilen	16	198,35	12,40			
Regresyon	5	186,93	37,39	36,02	0	
Hata	11	11,42	1,04			
Model yetersizliği	9	10,75	1,20	3,58	0,24	
Tekrar hatası	2	0,67	0,33			

SD: Serbestlik derecesi, KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması, p: Olasılık değeri

Tablo 4.18: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için ANOVA analizi sonuçları

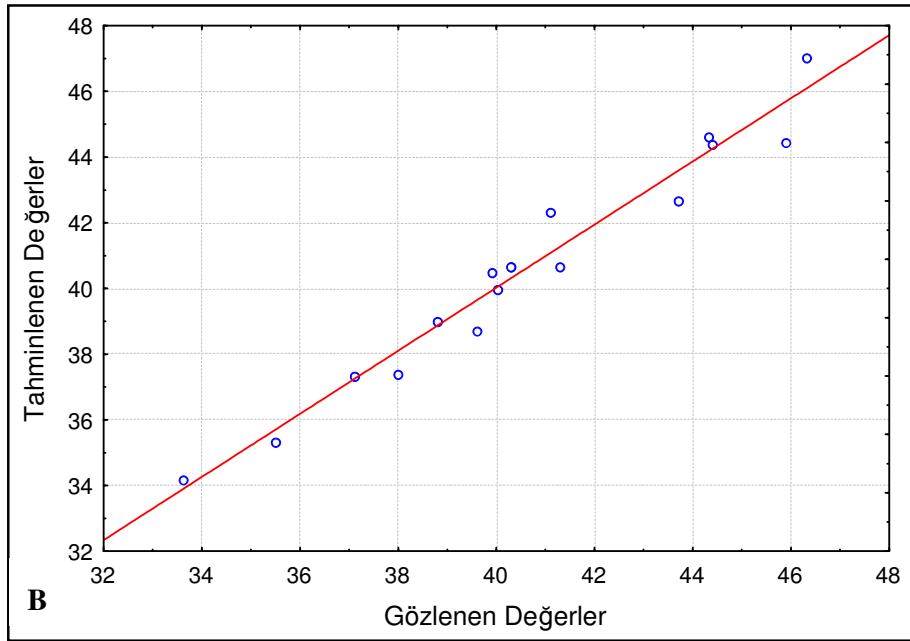
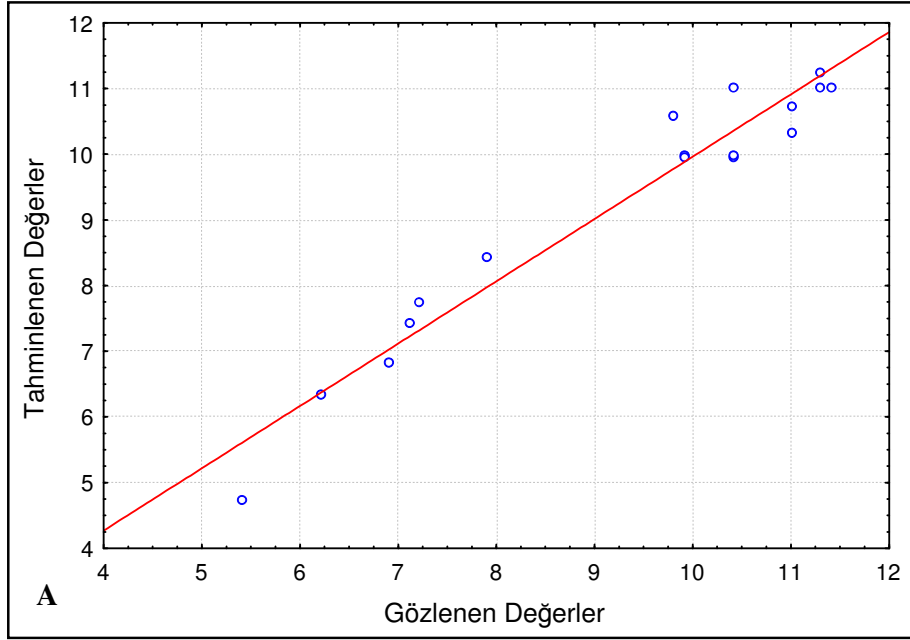
GLA katılımı	SD	KT	KO	F değeri	P-değeri	R ² ;R ² _{düz}
Toplam	17	1064,55	62,62			0,92; 0,88
Sabit	1	1004,85	1004,85			
Toplam düzeltilen	16	59,70	3,73			
Regresyon	5	54,90	10,98	25,20	0	
Hata	11	4,79	0,44			
Model yetersizliği	9	4,37	0,49	2,27	0,34	
Tekrar hatası	2	0,43	0,21			
Oleik asit katılımı	SD	KT	KO	F değeri	P-değeri	R ² ;R ² _{düz}
Toplam	17	28165,40	1656,79			0,88; 0,83
Sabit	1	27965,30	27965,30			
Toplam düzeltilen	16	200,11	12,51			
Regresyon	5	176,61	35,32	16,53	0	
Hata	11	23,50	2,14			
Model yetersizliği	9	20,57	2,29	1,56	0,45	
Tekrar hatası	2	2,93	1,46			

SD: Serbestlik derecesi, KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması, p: Olasılık değeri

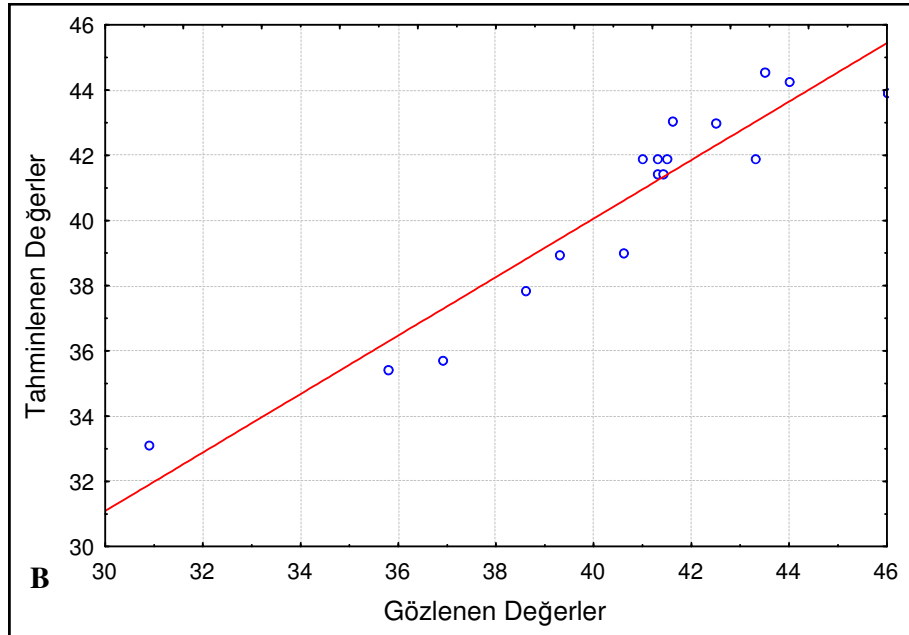
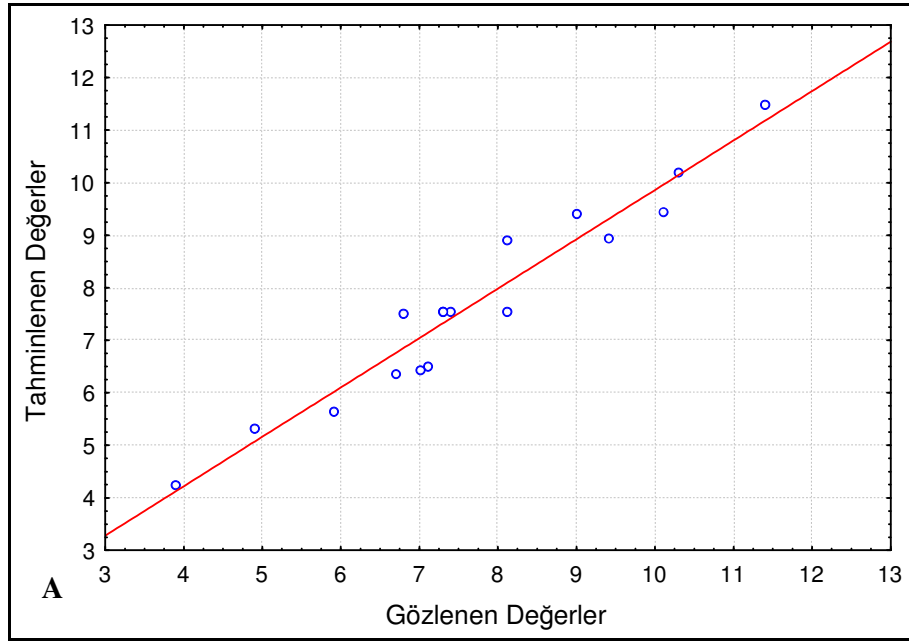
ANOVA analizine göre, Lipozyme® RM IM ve Lipozyme® TL IM ile katalizlenen reaksiyonların F değerleri (F_{model}) (24,96; 36,02; 25,20; 16,53) F_{TABLO} ($F_{5,11}$) (3,20) değerinden büyük oldukları için ($p < 0,05$), modellerin tahminleme için uygun olduğu, ayrıca her iki tepki için oluşturulan modellerde model yetersizliğinin (model hatasının) p -değeri $> 0,05$ olduğu için, modellerin elde edilen verilere uygun olduğu görülmektedir (Muralidhar ve diğ., 2001; Naessens ve diğ., 2004; Lumor ve Akoh, 2005; Rao ve diğ., 2002; Xu ve diğ., 1998; Shieh ve diğ., 1995).

Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlarda, iki tepki için oluşturulan modellerin katsayıları (R^2) ve düzeltilmiş katsayıları ($R^2_{\text{düz.}}$), GLA katılımı için sırasıyla 0,92 ve 0,88, oleik asit katılımı için ise sırasıyla 0,88 ve 0,83 olarak bulunmuştur. Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlarda, iki tepki için oluşturulan modellerin katsayıları (R^2) ve düzeltilmiş katsayıları ($R^2_{\text{düz.}}$), GLA katılımı için sırasıyla 0,92 ve 0,88; oleik asit katılımı için sırasıyla 0,88 ve 0,83 olarak bulunmuştur.

Modellerden tahminlenen değerler ile deneyler sonucu gözlenen değerler arasındaki ilişkiler Şekil 4.8. ve Şekil 4.9’da görülmektedir.



Şekil 4.8: Lipozyme® RM IM ile katalizlenen reaksiyonlarda gözlenen değerlere karşılık modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki (A) GLA katılımı (B) Oleik asit katılımı



Şekil 4.9: Lipozyme® TL IM ile katalizlenen reaksiyonlarda gözlenen değerlere karşılık modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki (A) GLA katılımı (B) Oleik asit katılımı.

Bu çalışmaların sonunda modellerden tahminlenen değerler ile deneyler sonucu gözlenen değerler arasında lineer ilişkinin olduğu, diğer bir deyişle ölçülen tepkilerin reaksiyon parametrelerinin birbiriyle ilişkisini başarılı bir şekilde temsil ettiği görülmüştür (Muralidhar ve diğ., 2001; Rao ve diğ., 2002; Naessens ve diğ., 2004; Lumor ve Akoh, 2005).

Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar sonucunda, GLA ve oleik asit katılımı için istatistiksel olarak önemli olan 1. derece, 2. derece ve etkileşim terimleri ile oluşturulan model denklemleri aşağıdaki gibidir:

$$Y_1 = 10.55 - 0.001S_r + 0.46T + 1.74t - 0.53T^2 - 1.07t^2 \quad (4.2)$$

$$Y_2 = 41.09 + 1.69S_r + 1.10T + 3.05t - 0.04T^2 - 0.57t^2 \quad (4.3)$$

Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar sonucunda, GLA ve oleik asit katılımı için istatistiksel olarak önemli olan 1. derece, 2. derece ve etkileşim terimleri ile oluşturulan model denklemleri aşağıdaki gibidir:

$$Y_3 = 7.83 + 0.73S_r - 0.43T + 1.76t - 0.18t^2 - 0.54T * t \quad (4.4)$$

$$Y_4 = 41.43 + 1.21S_r + 0.01T + 3.21t - 1.08t^2 + 0.21T * t \quad (4.5)$$

Y_1 ve Y_3 : Tepki (GLA katılımı, %mol)

Y_2 ve Y_4 : Tepki (Oleik asit katılımı, %mol)

S_r : Substrat mol oranı

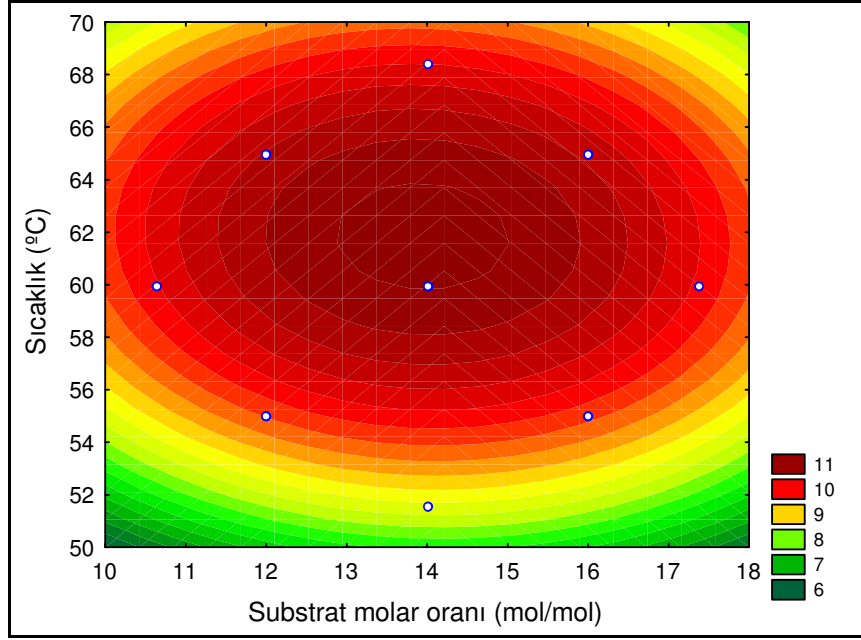
T : Reaksiyon sıcaklığı

t : Reaksiyon süresidir.

4.4.2. Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması

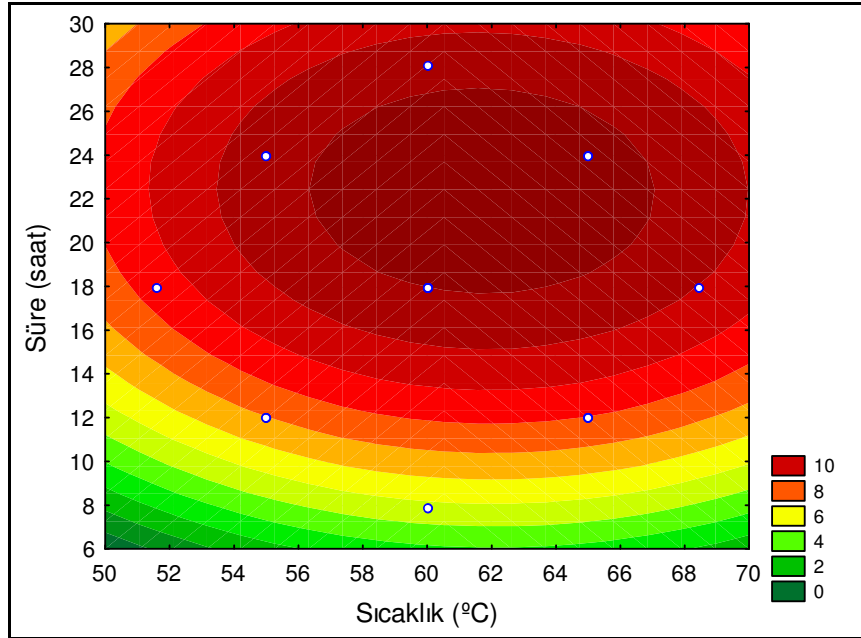
Tripalmitin'in fındık yağı serbest yağ asitleri ve GLA ile enzimatik asidoliz reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünün GLA ve oleik asit içeriğinin, bağımsız değişkenlerin etkileşimine göre değişimi tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile incelenmiştir.

Şekil 4.10'da Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için GLA katılımına substrat mol oranı-sıcaklığın etkisi görülmektedir. Şekil 4.11'de sıcaklık-süre etkisini, Şekil 4.12'de ise substrat mol oranı-süre etkisini gösteren izdüşüm grafikleri yer almaktadır.



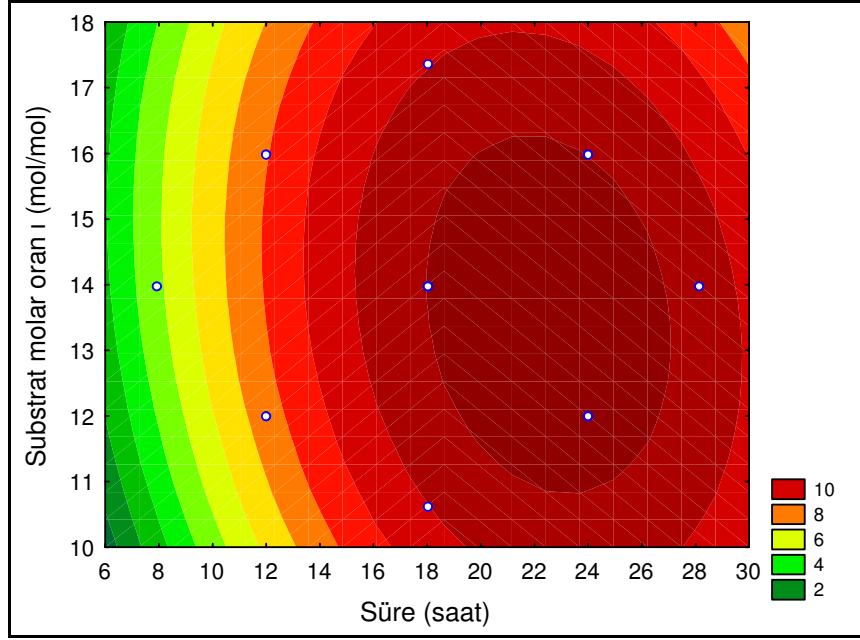
Şekil 4.10: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına substrat mol oranı-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği

“Substrat mol oranı” ve sıcaklık arasındaki ilişkinin verildiği Şekil 4.10’da GLA katılımının orta noktadan uzaklaştıkça azaldığı görülmektedir.



Şekil 4.11: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına sıcaklık-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği

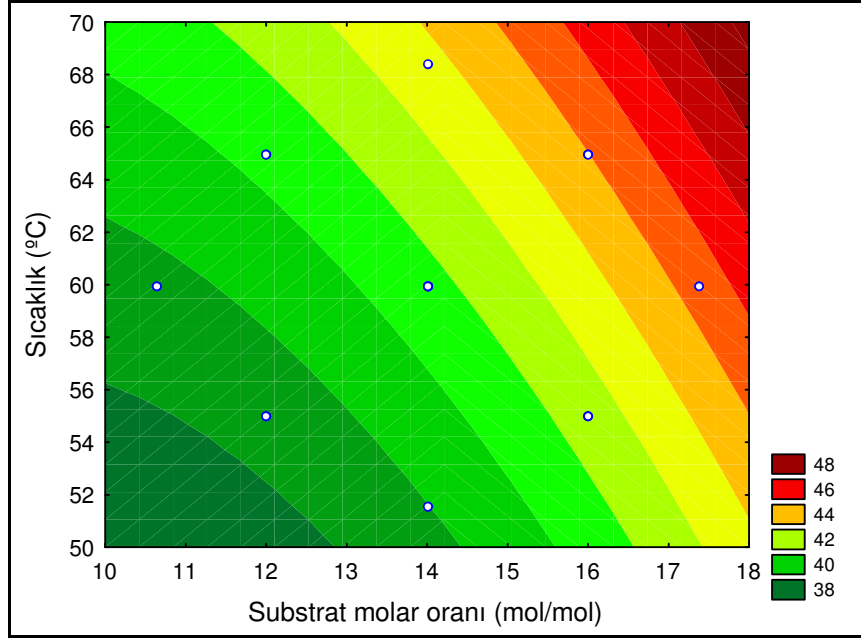
Şekil 4.11’de reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresinin artmasıyla GLA katılımının arttığı görülmektedir.



Şekil 4.12: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına substrat mol oranı-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği

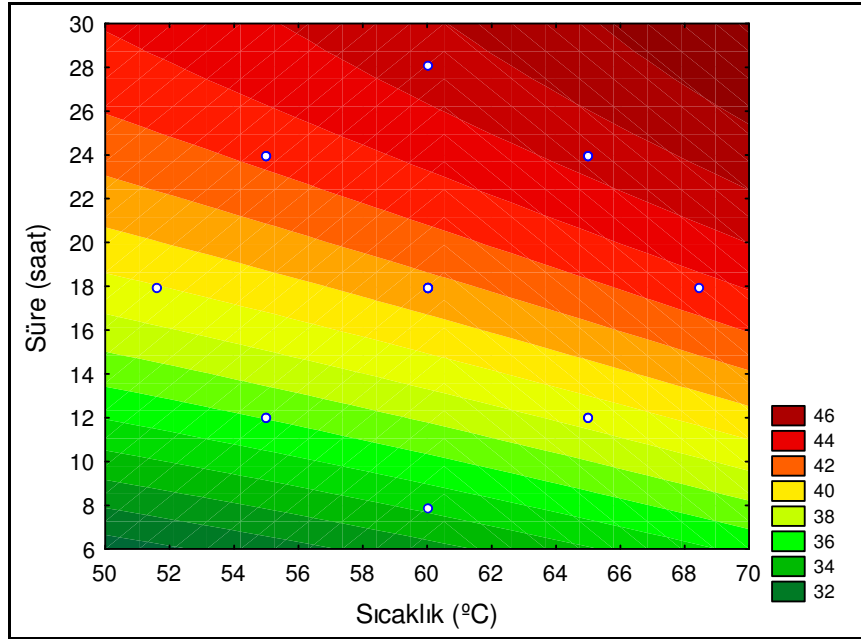
Şekil 4.12’de ise GLA katılımının 22 saat reaksiyon süresinin altında ve üzerinde substrat mol oranından bağımsız bir şekilde azaldığı görülmektedir. Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12 izdüşüm grafikleri “maksimum tepki” grafikleri olarak da adlandırılmaktadır (Montgomery, 1997).

Şekil 4.13’de Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için oleik asit katılımına substrat mol oranı-sıcaklık etkisi görülmektedir. Sıcaklık-süre ve substrat mol oranı-süre arasındaki ilişki ise sırasıyla Şekil 4.14 ve 4.15’de gösterilmektedir.



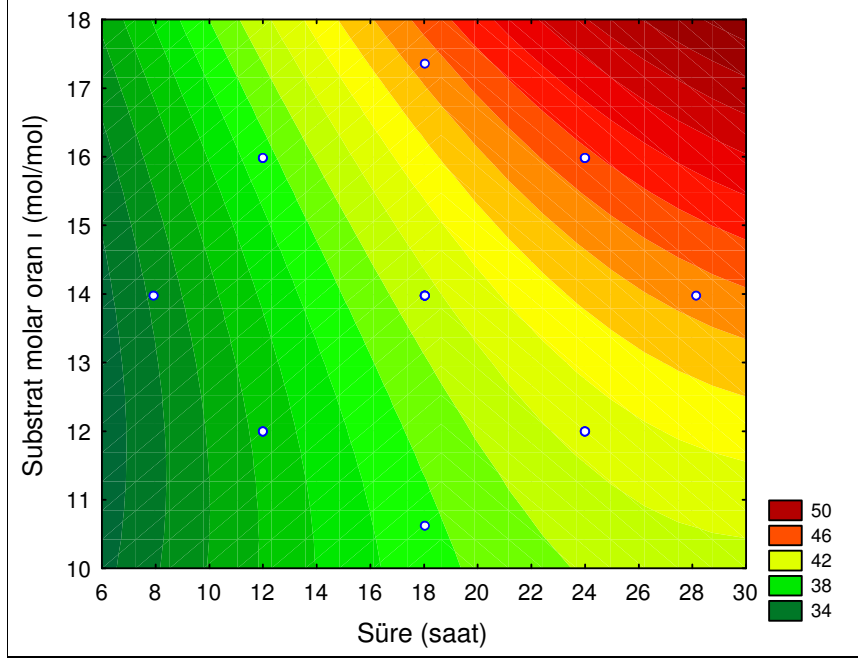
Şekil 4.13: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına substrat mol oranı-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Şekil 4.13'de oleik asit katılımına substrat mol oranı ve sıcaklığın etkisinin görüldüğü grafikte, substrat mol oranı ve sıcaklığın artırılması ile oleik asit katılımının da arttığı görülmektedir.



Şekil 4.14: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına sıcaklık-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği

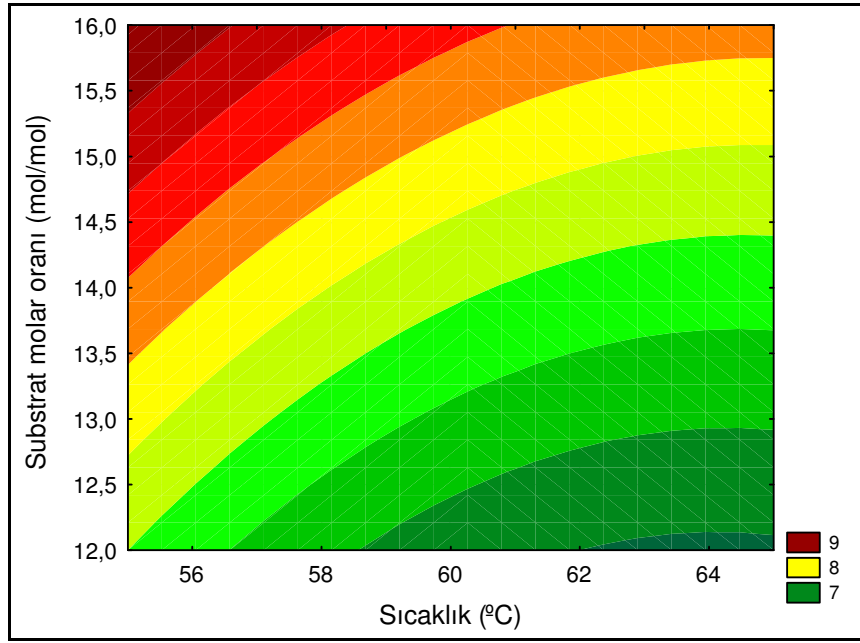
Şekil 4.14’den, reaksiyon süresinin 6-17 saat olduğu koşullarda oleik asit katılımına sıcaklıktaki artışın etkisinin olmadığı, reaksiyon süresinin 17-30 saat olduğu durumlarda, reaksiyon süresindeki ve sıcaklıktaki artış ile birlikte oleik asit katılımının da arttığı görülmektedir.



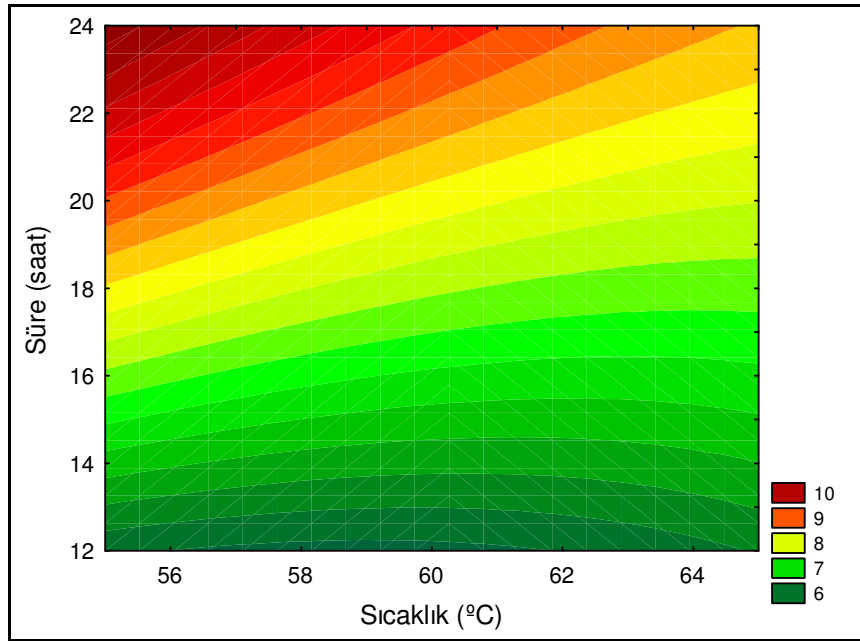
Şekil 4.15: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına substrat mol oranı-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Şekil 4.15’de ise substrat mol oranı ve süre etkileşimleri sonucunda literatürde “sırt noktası” olarak tanımlanan izdüşüm grafikleri elde edilmiştir (Montgomery, 1997). Reaksiyon süresinin 8-12 saat olduğu durumda oleik asit katılımına substrat mol oranının etkisi olmamaktadır.

Tripalmitin’in fındık yağı serbest YA’leri ve GLA ile Lipozyme® TL IM enzimi katalizörlüğündeki enzimatik asidoliz reaksiyonu sonucu elde edilen ürünün GLA ve oleik asit içeriğinin, bağımsız değişkenlerin etkileşimine göre değişimi tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile gösterilmektedir. Şekil 4.16’da sıcaklık-substrat mol oranının, Şekil 4.17’de sıcaklık-süre ve Şekil 4.18’de süre-substrat mol oranı etkilerinin GLA katılımına etkileri görülmektedir.



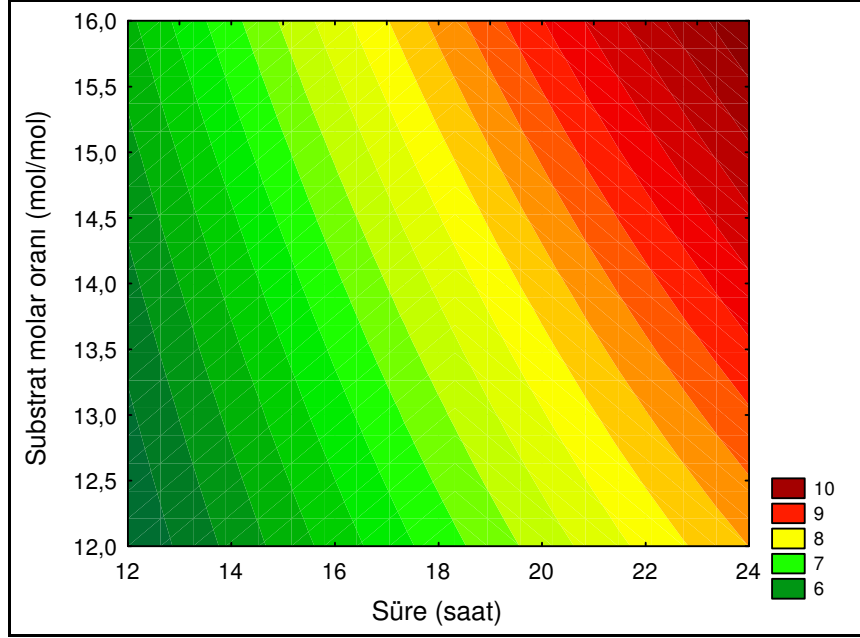
Şekil 4.16: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına substrat mol oranı-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.17: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına sıcaklık-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Reaksiyon sıcaklığı ve substrat mol oranının GLA katılımına etkisinin incelendiği Şekil 4.16'dan görüleceği üzere, GLA katılımı düşük sıcaklıklarda ve yüksek substrat mol oranlarında daha yüksek olmuştur.

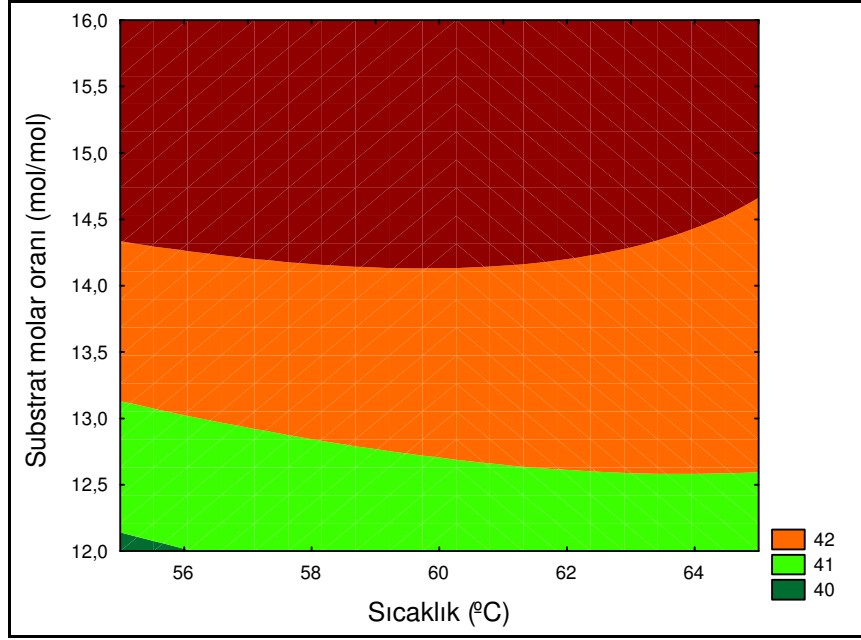
Şekil 4.17’de sıcaklık ve sürenin etkisinin GLA katılımına etkisi incelenmiş ve reaksiyon süresi 22-24 saat ve reaksiyon sıcaklığı 55-57°C’de sabit olduğunda, hedeflenen GLA katılımı (%10) gerçekleşmiştir. Ayrıca, düşük sıcaklıklarda reaksiyon süresinin arttırılmasıyla GLA katılımı da artmıştır.



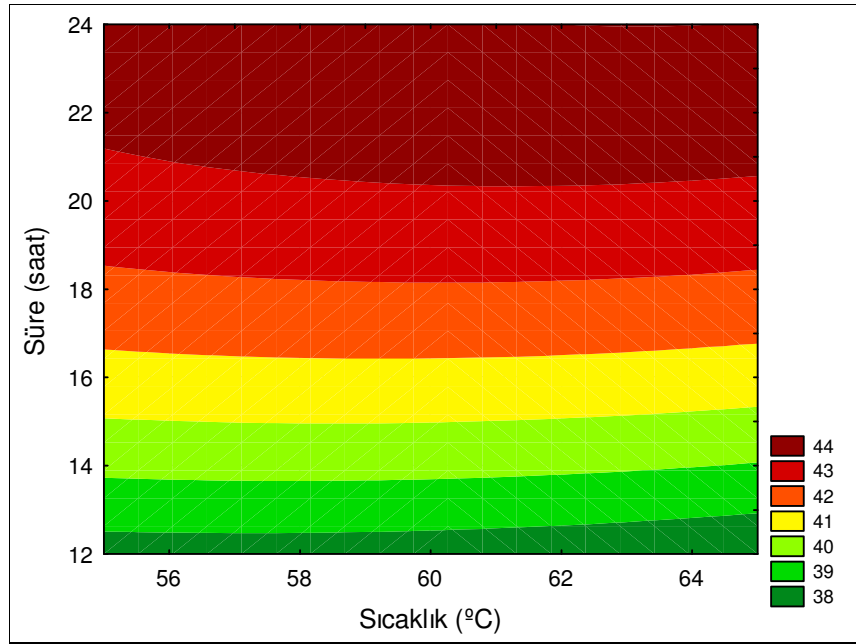
Şekil 4.18: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, GLA katılımına substrat mol oranı-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Şekil 4.18’de substrat mol oranı ve reaksiyon süresinin GLA katılımına etkisi gösterilmektedir. Bu grafiğe göre, substrat mol oranı ve reaksiyon süresi arttıkça GLA miktarı da artmıştır.

Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, sırasıyla oleik asit katılımına substrat mol oranı-sıcaklık, sıcaklık-süre ve substrat mol oranı-süre etkisini gösteren izdüşüm grafikleri yer almaktadır.



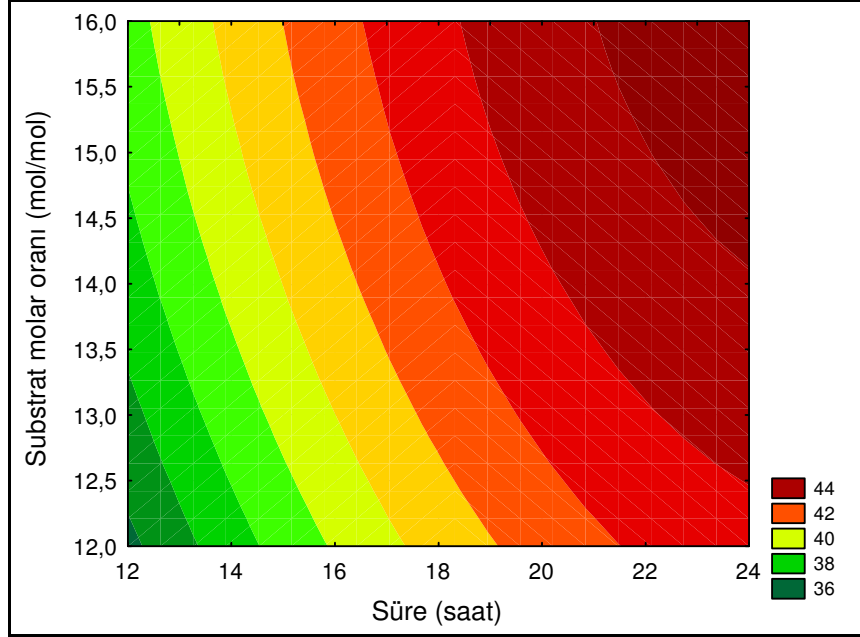
Şekil 4.19: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına substrat mol oranı-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.20: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına sıcaklık-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Reaksiyon sıcaklığı ve substrat mol oranının oleik asit katılımına etkisi Şekil 4.19’da gösterilmiş olup, hedeflenen oleik asit katılımı yüksek substrat mol oranlarında sıcaklıktan bağımsız olarak gerçekleşmiştir. Reaksiyon süresinin reaksiyon sıcaklığı

ile birlikte oleik asit katılımına etkisinin incelendiği Şekil 4.20'ye göre hedeflenen oleik asit katılımı yüksek reaksiyon sürelerinde sıcaklıktan bağımsız olarak artmıştır.



Şekil 4.21: Lipozyme® TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için, oleik asit katılımına substrat mol oranı-süre etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Şekil 4.21'de substrat mol oranı ve reaksiyon süresinin oleik asit katılımına etkisi gösterilmektedir. Bu grafiğe göre, substrat mol oranı ve reaksiyon süresi arttıkça oleik asit katılımı da artmıştır.

Lipozyme® RM IM ve Lipozyme® TL IM enzimleri ile hedeflenen GLA (%10) ve oleik asit (%45) katılımı için Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı yardımıyla elde edilen optimum koşullar Tablo 4.19 ve 4.20'de belirtilmiştir.

Tablo 4.19: Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı ile elde edilen optimum koşullar

Deney no	S _r (mol/mol)	T (°C)	t (saat)	Tahminlenen GLA katılımı, % mol	Tahminlenen oleik asit katılımı, % mol
1	14,8	55	24	10,2	43,1
2	15,6	56	21,3	10,5	43
3	15,6	55,1	22,8	10,3	43,4
4	16	65	24	11,1	46,3
5	15,4	55,5	22,3	10,4	43,1
6	16	55	21,6	10,2	43,3

Lipozyme[®] RM IM ile katalizlenen reaksiyonlar için, hedeflenen GLA (%10) ve oleik asit (%45) katılımları için Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı yardımıyla belirlenen optimum koşullar: Substrat mol oranı “14,8 mol/mol”, reaksiyon sıcaklığı “55°C” ve reaksiyon süresi “24 saat” olarak seçilmiştir. Bu koşullarda modelden tahminlenen GLA katılımı %10,2, oleik asit katılımı ise %43,1’dir.

Tablo 4.20: Lipozyme[®] TL IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı ile elde edilen optimum koşullar

Deney no	Sr (mol/mol)	T (°C)	t (saat)	Tahminlenen GLA katılımı, % mol	Tahminlenen oleik asit katılımı, % mol
1	14	55	24	10,4	43,3
2	15,2	58	23,7	10,1	44,1
3	16	59,5	24	10,2	44,7
4	16	63	24	9,6	44,9
5	15,8	58,8	23,5	10,1	44,5
6	16	55	21,6	10,3	44

Lipozyme[®] TL IM ile katalizlenen reaksiyonlar için, hedeflenen GLA (%10) ve oleik asit (%45) katılımları için Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı yardımıyla belirlenen optimum koşullar: Substrat mol oranı “14 mol/mol”, reaksiyon sıcaklığı “55°C” ve reaksiyon süresi “24 saat” olarak seçilmiştir. Bu koşullarda modelden tahminlenen GLA katılımı %10,4, oleik asit katılımı ise %43,3’dür.

4.4.3. Modellerin doğrulanması

TYT ile elde olunan modellerin doğruluğunun araştırılması için, interesterifikasyon reaksiyonları test tüplerinde optimum koşullarda gerçekleştirilmiş ve elde edilen YY’nın YA bileşimi ve sn-2 pozisyonundaki YA bileşimi belirlenmiştir. Lipozyme[®] RM IM enzimi ile 14,8 mol/mol, 55°C, 24 saat; Lipozyme[®] TL IM enzimi ile ise 14 mol/mol, 55°C, 24 saat optimum koşulları kullanılmıştır. Yapılan analizlere ait sonuçlar Tablo 4.21’de belirtilmektedir. Tablo 4.19, Tablo 4.20 ve Tablo 4.21’den görüleceği gibi, ürünlerdeki GLA ve oleik asit miktarlarının (sırasıyla, %9,7 ve %43,3; %9,8 ve %43,8) modelden tahminlenen değerlere (%10,2 ve %43,1; %10,4 ve %43,3) oldukça yakın oldukları gözlenmiştir. Lipozyme[®] RM IM ile katalizlenen asidoliz reaksiyonları sonucunda elde edilen GLA ile zenginleştirilmiş YY’da, %43,3 oleik asit, %41,6 palmitik asit, %5,4 linoleik asit ve %9,7 GLA içermiş ve palmitik asidin %74,9’unun da TAG’ün sn-2 pozisyonunda bulunduğu belirlenmiştir. Lipozyme[®] TL IM ile katalizlenen asidoliz reaksiyonları sonucunda elde edilen GLA

ile zenginleştirilmiş YY'da, %43,8 oleik asit, %40,9 palmitik asit, %5,5 linoleik asit ve %9,8 GLA içermiş ve palmitik asidin %73,9'unun da TAG'ün sn-2 pozisyonunda bulunduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.21: Optimum koşullarda elde edilen YY'ların YA kompozisyonu (% mol) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları (% mol)

	Lipozyme® RM IM enzimi ile elde edilen YY		Lipozyme® TL IM enzimi ile elde edilen YY	
Yağ asitleri	YA	sn-2 pozisyonu	YA	sn-2 pozisyonu
16:0	41,6	74,9	40,9	73,9
18:1	43,3	18,1	43,8	19,7
18:2	5,4	2,1	5,5	2,2
18:3n-6	9,7	2,0	9,8	1,4

Her iki enzimin GLA ve oleik asit katılımına etkisini karşılaştırmak için, iki enzim ile substrat mol oranı 16 mol/mol, reaksiyon sıcaklığı 55°C ve reaksiyon süresi 21,6 saat reaksiyon koşulu kullanılarak asidoliz tepkimeleri gerçekleştirilmiştir.

İki enzimin karşılaştırması için yapılan çalışma sonucunda, elde edilen YY'ların GLA ve oleik asit içerikleri birbirine ve modelden tahminlenen değerlere oldukça yakın bulunmuştur. Lipozyme® RM IM ile elde edilen YY % 43,6 oleik asit, %10,1 GLA, Lipozyme® TL IM ile elde edilen YY ise %44,3 oleik asit ve % 10,0 GLA içermiştir. Belirtilen reaksiyon koşulları altında her iki enzim ile benzer YA bileşimine sahip ürünler elde edilmiş olup bunların YA dağılımı anne sütü yağına oldukça benzemiş ve aynı zamanda bebek beslenmesi ve gelişimi için önemli bir YA olan GLA ile zenginleştirme sağlanmıştır.

4.5.“Omega-3 Yağ Asitleri ile Zenginleştirilmiş Anne Sütü Yağına Benzer Yapılandırılmış Yağların Enzimatik Asidoliz Yoluyla Üretimi: Reaksiyon Koşullarının Tepki-Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

EPA ve DHA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY'ların üretimi, tripalmitin, fındık yağı serbest YA'leri ve omega-3 YA konsantresi arasında enzimatik asidoliz reaksiyonları ile gerçekleştirilmiş ve tripalmitine %5 oranında omega-3 YA, %40 oranında oleik asit katılımı hedeflenerek, “Tepki Yüzey Yöntemi” ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzimatik asidoliz tepkimelerinde Lipozyme® RM IM enzimi kullanılmıştır.

4.5.1. Farklı reaksiyon koşullarının omega-3 yağ asitleri ve oleik asit katılımı üzerindeki etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirmeleri

3 faktörlü, 5 seviyeli Merkezil Bileşik Deney Tasarımı ve 17 adet deney noktasında gözlenen tepkiler (Tepki 1: EPA+DHA katılımı, % mol; Tepki 2: Oleik asit katılımı, % mol) Tablo 4.22’de gösterilmektedir.

Tablo 4.22: Deney tasarımı ve deney noktalarında gözlenen tepkiler (EPA+DHA ve oleik asit katılımı)

Deney noktası	Bağımsız değişkenler			Tepkiler (katılım, %mol)	
	S _r (mol/mol)	T (°C)	t (saat)	EPA ve DHA katılımı	Oleik asit katılımı
1	12	55	12	3,3	31,1
2	16	55	12	4,2	33,1
3	12	65	12	4,7	34,6
4	16	65	12	4,7	36,8
5	12	55	24	5,3	36,2
6	16	55	24	7,4	41,5
7	12	65	24	6,1	38,2
8	16	65	24	6,6	41,0
9	10,64	60	18	5,8	34,8
10	17,36	60	18	6,3	38,3
11	14	51,59	18	4,9	35,9
12	14	68,41	18	5,1	39,0
13	14	60	7,91	3,7	31,3
14	14	60	28,09	6,9	40,0
15	14	60	18	5,9	38,6
16	14	60	18	5,6	37,4
17	14	60	18	5,9	37,7

Elde edilen tepkiler (Tepki 1: EPA ve DHA katılımı, % mol ; Tepki 2: Oleik asit katılımı, % mol) için çoklu regresyon ve “geriye dönük eleme” yöntemi uygulanarak başarılı kuadratik modeller elde edilmiştir.

Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerin regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P) hesaplanmış ve Tablo 4.23’te gösterilmiştir. Tablodan görüleceği gibi, birinci derece parametreler arasında reaksiyon süresi her iki tepki için de en önemli parametre iken, bunu substrat mol oranı ve sıcaklık takip etmektedir. Her iki tepki için birinci derece parametrelerin pozitif yönde etkisi olmuştur, ikinci derece parametrelerin ise negatif yönde etkisi olmuştur. Omega-3 YA katılımı için, sıcaklık*sıcaklık ve süre*süre terimleri ve substrat mol oranı*sıcaklık etkileşim teriminin etkisi önemli olmuştur.

Tablo 4.23: Lineer ve kuadratik modellerde geriye dönük eleme sonucunda elde edilen regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P-değeri)

	Tepki 1: EPA ve DHA katılımı		Tepki 2: Oleik asit katılımı	
Bağımsız değişkenler	β	P-değeri	β	P-değeri
Kesişim/Sabit	5,88	< 0,0001	37,31	< 0,0001
S _r	0,32	0,007	1,33	0,0003
T	0,16	0,103	1,02	0,001
t	1,02	< 0,0001	2,63	< 0,0001
T*T	-0,33	0,007	-0,003	0,99
t*t	-0,23	0,042	-0,64	0,03
S _r *T	-0,31	0,027	-0,29	0,37
T*t	-0,24	0,075	-0,71	0,047

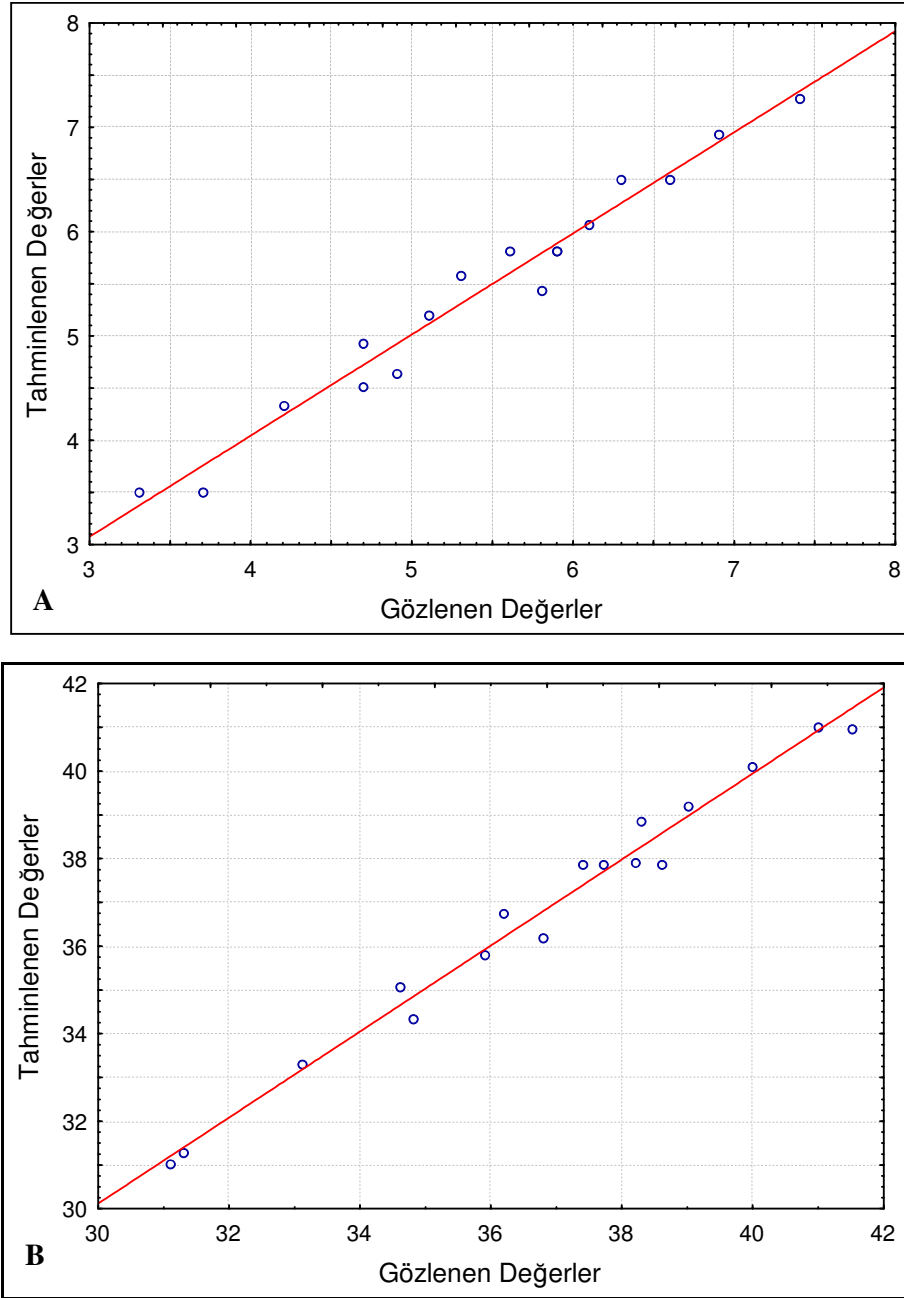
Oleik asit katılımı için ise, ikinci derece parametre olan süre*süre ve etkileşim terimi olan sıcaklık*süre'nin önemli olduğu görülmektedir. ANOVA analizi sonuçları Tablo 4.24'de belirtilmektedir. ANOVA analizi sonuçlarına göre, elde edilen modellerin F değerleri F_{model} (23,95; 26,65), F_{TABLO} ($F_{7,9}$) (3,29) ($p < 0,05$) değerinden büyük oldukları için, modellerin tahminleme için uygun olduğu, ayrıca Tablo 4.24'den görüleceği gibi, iki tepki için oluşturulan modellerde model hatası değerlerinin p-değerleri (0,194 ve 0,343) $> 0,05$ olduğu için, modellerin elde edilen verilere uygun olduğu görülmektedir (Shieh ve diğ., 1995; Xu ve diğ., 1998; Xu ve diğ., 2000b; Muralidhar ve diğ., 2001; Rao ve diğ., 2002, Naessens ve diğ., 2004; Lumor ve Akoh, 2005).

Tablo 4.24: ANOVA analizi sonuçları

	SD	KT	KO	F değeri	P-değeri	R²; R²_{düz.}
EPA+DHA katılımı						0,95; 0,91
Toplam	17	521,96	30,70			
Sabit	1	502,22	502,22			
Toplam düzeltilen	16	19,74	1,23			
Regresyon	7	18,73	2,68	23,95	0,000	
Hata	9	1,01	0,11			
Model yetersizliği	7	0,95	0,14	4,50	0,194	
Tekrar hatası	2	0,06	0,03			0,95; 0,92
Oleik asit katılımı						
Toplam	17	23164,60	1362,62			
Sabit	1	23014,70	23014,70			
Toplam düzeltilen	16	149,87	9,37			
Regresyon	7	142,97	20,42	26,65	0,000	
Hata	9	6,90	0,77			
Model yetersizliği	7	6,12	0,87	2,24	0,343	
Tekrar hatası	2	0,78	0,39			

SD: Serbestlik derecesi, KT: Kareler toplamı, KO: Kareler ortalaması, p: Olasılık değeri

Modellerden tahminlenen değerler ile deneyler sonucu gözlenen değerler arasındaki ilişki Şekil 4.22’de verilmektedir.



Şekil 4.22: Gözlenen değerlere karşılık modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki (A) EPA ve DHA katılımı (B) Oleik asit katılımı

Şekil 4.22’deki grafiklerden, modellerden tahminlenen değerler ile deneyler sonucu gözlenen değerler arasında lineer ilişkinin olduğu [EPA+DHA katılımı için $R_1^2=0,95$, oleik asit katılımı için $R_2^2=0,95$], diğer bir deyişle ölçülen tepkilerin reaksiyon parametrelerinin birbiriyle ilişkisini başarılı bir şekilde temsil ettiği görülmektedir.

İki tepki için oluşturulan modellerin katsayıları (R^2) ve düzeltilmiş katsayıları ($R_{düz.}^2$), [EPA+DHA] katılımı için sırasıyla ($R_1^2=0,95$, $R_{1,düz.}^2=0,91$) ve oleik asit katılımı için ise ($R_2^2=0,95$; $R_{2,düz.}^2=0,92$) olarak bulunmuştur. Ayrıca regresyon p -değerleri $<0,001$ ve model yetersizliğinin (model hatası) p -değeri $>0,05$ olduğu için modellerin deney noktaları için iyi bir şekilde temsil ettiği söylenebilmektedir (Shieh ve diğ., 1995; Xu ve diğ., 1998; Muralidhar ve diğ., 2001; Rao ve diğ., 2002; Naessens ve diğ., 2004; Lumor ve Akoh, 2005).

EPA+DHA katılımı ve oleik asit katılımı için istatistiksel olarak önemli olan 1. derece, 2. derece ve etkileşim terimleri ile oluşturulan model denklemleri aşağıdaki gibidir:

$$Y_1 = 5.88 + 0.32S_r + 0.16T + 1.02t - 0.33T^2 - 0.23t^2 - 0.31S_r * T - 0.24T * t \quad (4.6)$$

$$Y_2 = 37.31 + 1.33S_r + 1.02T + 2.63t - 0.003T^2 - 0.64t^2 - 0.29S_r * T - 0.71T * t \quad (4.7)$$

Y_1 : Tepki (EPA ve DHA katılımı, %mol)

Y_2 : Tepki (Oleik asit katılımı, %mol)

S_r : Substrat mol oranı

T : Reaksiyon sıcaklığı

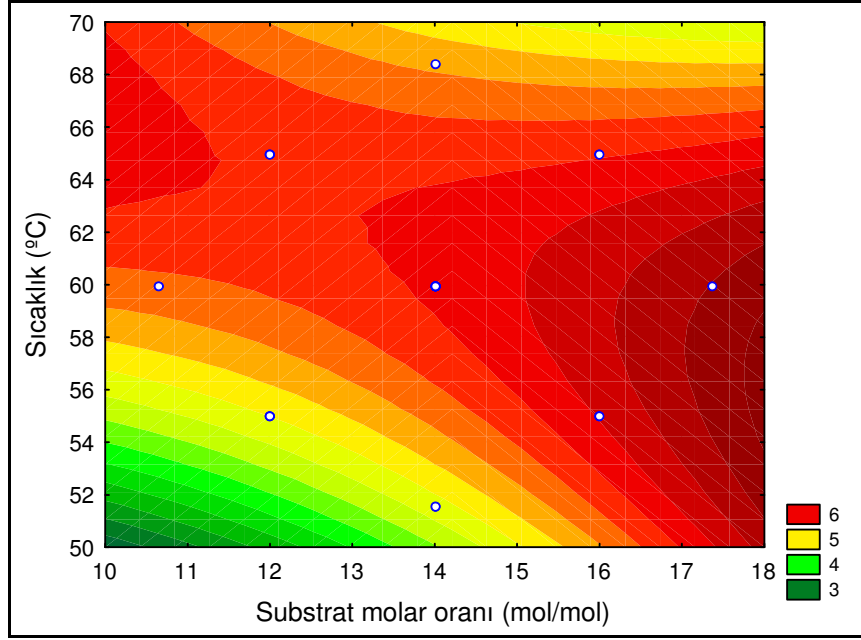
t : Reaksiyon süresidir.

Eşitlik 4.6'daki birinci derece sıcaklık terimi (T) önemli olmamasına rağmen sıcaklığın substrat mol oranı ile etkileşim terimi ve aynı zamanda sıcaklığın ikinci derece terimi (T^2) önemli olduğu için denklemden yer almıştır. Aynı şekilde $T*t$ etkileşimi de ikinci tepki için (oleik asit katılımı) önemli olduğundan aynı eşitlikte yer almıştır. Eşitlik 4.7'de yine T^2 ikinci derece terimi EPA+DHA katılımı için önemli olduğundan dolayı denklemden yer almıştır.

4.5.2. Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması

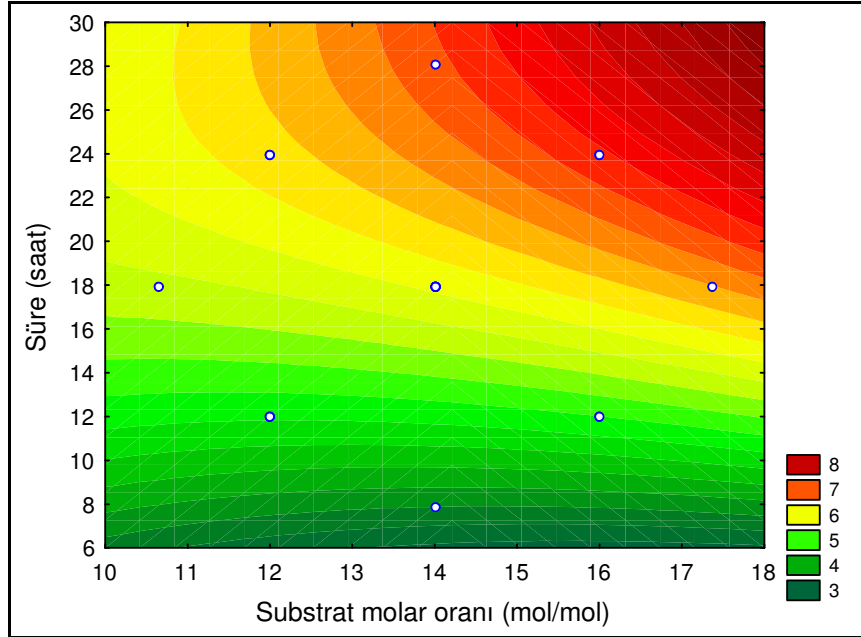
Tripalmitin'in fındık yağı serbest YA'leri ve omega-3 YA konsantresi ile enzimatik asidoliz reaksiyonu sonucunda elde edilen ürünün EPA+DHA ve oleik asit içeriğinin, bağımsız değişkenlerin etkileşimine göre değişimi tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile gösterilmektedir.

Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'de sırasıyla omega-3 katılımına reaksiyon sıcaklığı ve substrat mol oranının, reaksiyon süresi ve substrat mol oranının, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığının etkileri görülmektedir.



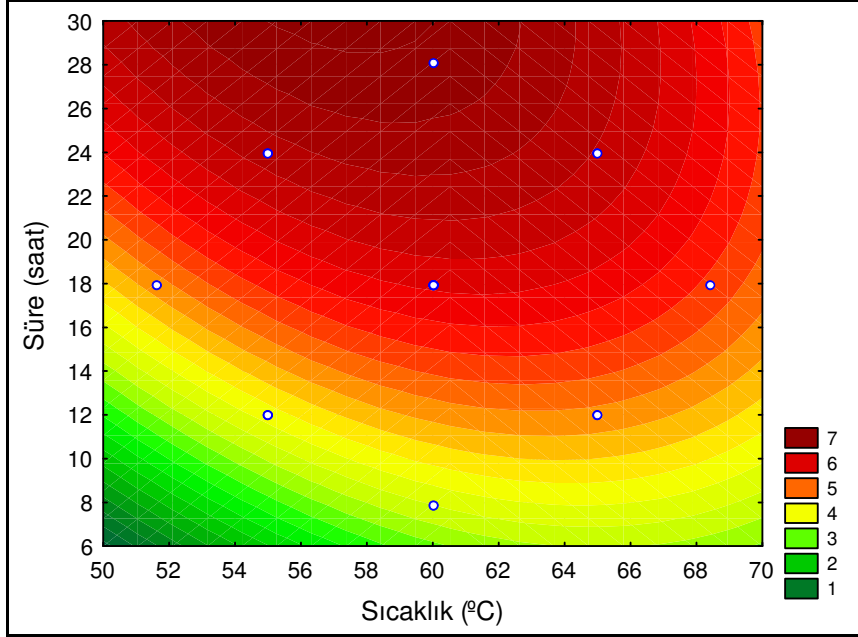
Şekil 4.23: EPA+DHA katılımına sıcaklık-substrat mol oranı etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Şekil 4.23'den görüleceği gibi, substrat mol oranı arttıkça omega-3 YA katılımı da artmıştır. Çalışılan deney koşullarında reaksiyon sıcaklığının 55°C'den ve substrat mol oranının 15 mol/mol'den daha düşük olduğu durumlarda DHA+EPA katılımı hedeflenen katılımdan (%5) daha düşük miktarda gerçekleşmektedir.



Şekil 4.24: EPA+DHA katılımına süre-substrat mol oranı etkisini gösteren izdüşüm grafiği

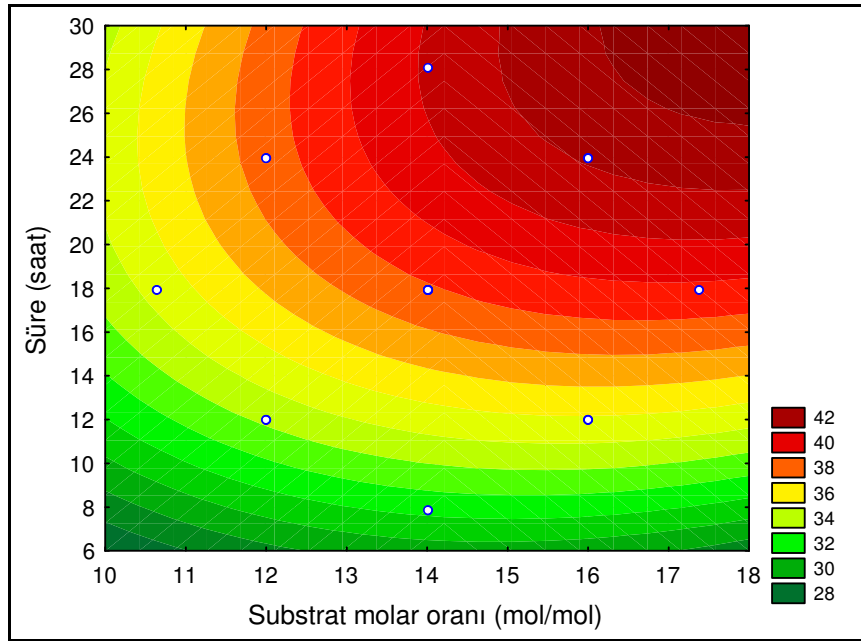
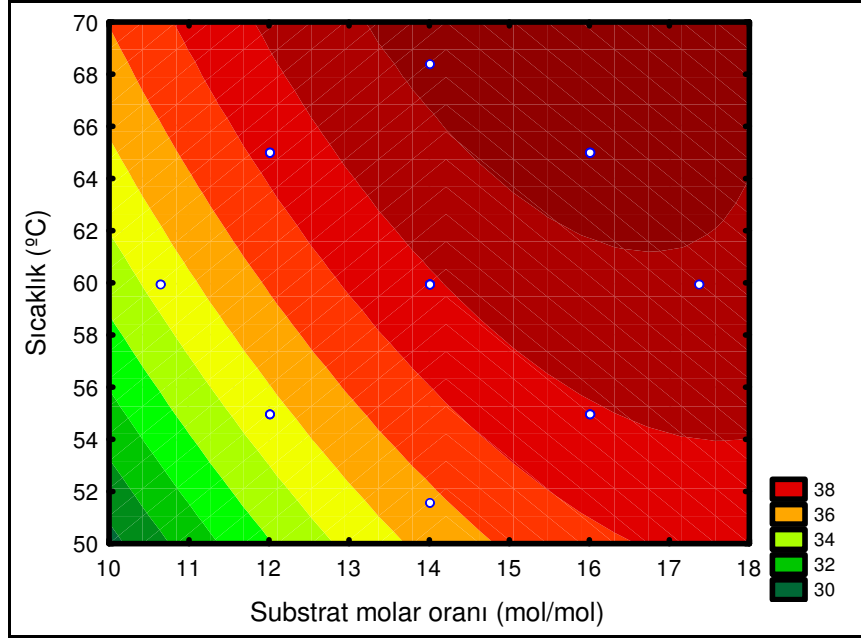
Şekil 4.24’de kısa reaksiyon sürelerinde substrat mol oranının çok fazla etkisinin olmadığı, omega-3 YA’lerinin katılımının 18-30 saat arasında substrat mol oranının artmasıyla arttığı görülmektedir.

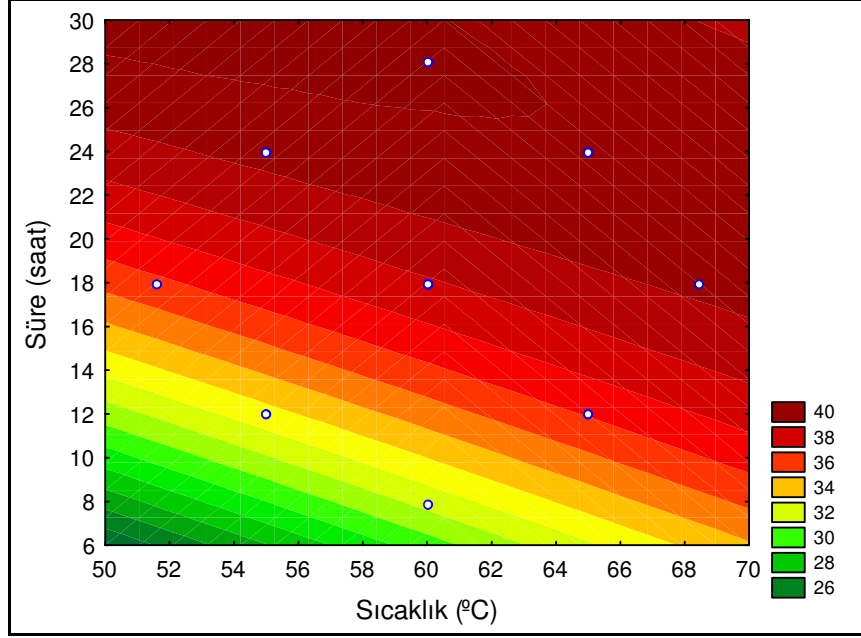


Şekil 4.25: EPA+DHA katılımına süre-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Şekil 4.25’de ise omega-3 YA katılımı orta noktadan uzaklaştıkça azalmaktadır. Süre ve sıcaklığın EPA+DHA katılımına olan etkileşimlerinden “maksimum tepki” grafiği elde edilmiştir (Montgomery, 1997).

Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’de sırasıyla oleik asit katılımına reaksiyon sıcaklığı ve substrat mol oranının, reaksiyon süresi ve substrat mol oranının, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığının etkileri görülmektedir.





Şekil 4.28: Oleik katılımına süre-sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafiği

Şekil 4.26 ve 4.27’den görüleceği üzere, substrat mol oranı ve sıcaklığın, substrat mol oranı ve sürenin oleik asit katılımına olan etkileşimlerinden “maksimum tepki” grafikleri elde edilmiştir (Montgomery, 1997).

Oleik asit katılımı çalışılan aralıklarda reaksiyon sıcaklığı ve substrat mol oranı, reaksiyon süresi ve substrat mol oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi arttıkça artmaktadır.

Ayrıca tüm grafikler incelendiğinde, substrat mol oranı, sıcaklık ve sürenin hem omega-3 YA katılımına hem de oleik asit katılımına etkisinin pozitif yönde olduğu görülmektedir.

Hedeflenen omega-3 YA (%5) ve oleik asit (%40) katılımı için Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı yardımıyla elde edilen optimum koşullar: Substrat mol oranı “12,4 mol/mol”, reaksiyon sıcaklığı “55°C” ve reaksiyon süresi “24 saat” olarak seçilmiştir. Bu koşullarda modelden tahminlenen EPA+DHA katılımı %5,9, oleik asit katılımı ise %37,7’dir.

4.5.3. Modellerin doğrulanması

TTY ile elde olunan modellerin doğruluğunun araştırılması için, interesterifikasyon reaksiyonları test tüplerinde optimum koşullarda (Sr: 12,4 mol/mol, T: 55°C, t: 24 saat) gerçekleştirilmiş ve elde edilen YY'ın YA bileşimi ve sn-2 pozisyonundaki YA bileşimi belirlenmiştir. Yapılan analizlere ait sonuçlar Tablo 4.25'de belirtilmektedir.

Tablo 4.25: Optimum koşullarda elde edilen YY'ların YA kompozisyonu (% mol) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları (% mol)

Yağ asitleri	YA	sn-2 pozisyonu
C16:0	45,5	76,6
C18:1	37,5	14,9
C18:2	4,4	2,0
C20:5n-3+ C22:6n-3	6,2	<1,0

Tablo 4.25'den görüleceği gibi, YY üründeki EPA+DHA miktarı %6,2, oleik asit miktarları ise %37,5 olmuştur. Bu değerlerin modelden tahminlenen değerlere yakın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca palmitik asidin %76,6 oranında sn-2 pozisyonunda bulunduğu belirlenmiştir. TAG'ün sn-2 pozisyonunda büyük oranda bulunan palmitik asidin, sn-1,3 pozisyonlarında ise doymamış yağ asitlerinin bulunması elde edilen YY'ın hem anne sütü yağına bileşim bakımından benzerlik göstermesi hem de absorpsiyon özelliklerini taşıyacak olması bakımından önemlidir (Innis ve diğ., 1995; Xu, 2000; O'Shea ve diğ., 2005). Ayrıca elde edilen YY ürünü, EPA ve DHA ile zenginleştirildiği için bu ürünün EPA ve DHA'nın bebek sağlığı ve gelişmesindeki olumlu etkilerine de sahip olacağı beklenmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışması sonucunda, sn-1,3 spesifik lipazlar katalizörlüğünde gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonları ile, anne sütündeki TAG'lere çok benzer yapıda, ayrıca GLA, EPA ve DHA gibi uzun zincirli YA ile de zenginleştirilmiş yapılandırılmış yağların laboratuvar ölçeğinde üretimleri mümkün olmuştur. Bu süreçte tepki-yüzey yöntemi ile substrat mol oranı, reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi gibi faktörlerin de reaksiyonlar üzerindeki etkileri incelenmiş ve reaksiyonların optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada anne sütü yağı üretiminde fındık yağı serbest yağ asitleri ilk defa substrat olarak kullanılmış, ayrıca Lipozyme® RM IM ve Lipozyme® TL IM enzimleri de ilk defa GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY'ların üretiminde kullanılarak, iki enzimin karşılaştırması yapılmıştır.

Çalışmanın ilk kısmında, uzun zincirli YA'lerini içeren anne sütü yağına benzer YY eldesinde substrat olarak tripalmitin, fındık yağı SYA ve stearik asit kullanılmış, asidoliz tepkimeleri Lipozyme® RM enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilmiştir. Farklı substrat mol oranı (1:1,5:0,5; 1:3:0,75; 1:6:1; 1:9:1,25 ve 1:12:1,5), reaksiyon sıcaklığı (55, 60, 65°C) ve reaksiyon sürelerinde (3, 6, 12, 24 saat) oleik asidin ve stearik asidin tripalmitine katılma oranları ve YY'daki oleik/palmitik asit oranları belirlenmiştir. Reaksiyonlar sonucunda, reaksiyon süresinin artmasıyla tüm substrat mol oranlarında stearik asidin katılımı da artmıştır (Sellapan ve Akoh, 2001). Reaksiyon süresi ve substrat mol oranı arttıkça da oleik asit miktarı ve dolayısıyla oleik/palmitik asit oranı artmıştır.

Farklı sıcaklık ve farklı substrat mol oranlarının 24 saat reaksiyon süresi sonundaki stearik asit, oleik asit katılımı ve oleik/palmitik asit oranına etkileri, "iki yollu ANOVA" istatistik yöntemi ile incelenmiştir. Oleik asit katılımı ve oleik/palmitik asit oranı için incelenen substrat mol oranlarının ve sıcaklıkların ve bunların interaksiyonlarının $p<0,05$ olasılık düzeyinde istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir ($p<0,05$).

Stearik asit katılımı için yapılan “iki yollu ANOVA” istatistik yöntemi sonucuna göre ise, sadece substrat mol oranı $p<0,05$ olasılık düzeyinde stearik asit katılımı için istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sıcaklık ve substrat mol oranı ile sıcaklığın interaksyonu $p<0,05$ olasılık düzeyinde stearik asidin katılımında istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur.

En yüksek stearik asit katılımı 1:3:0,75 S_r’ında gerçekleşmiştir. 24 saat sonunda oleik/palmitik asit oranı 0,9 ve daha yüksek olan YY’ların, sn-2 pozisyonundaki YA kompozisyonları belirlenmiştir. Bu YY %42,5’den fazla miktarlarda oleik asit ve %7’den fazla miktarlarda stearik asit içermiş, YY’ların sn-2 pozisyonunda bulunan palmitik asit miktarı ise %69,2-76,0 arasında değişmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, anne sütü yağına benzer YY’lar, tripalmitin ve fındık yağı SYA arasında gerçekleşen enzimatik asidoliz reaksiyonları ile üretilmiş ve tepki-yüzey yöntemi kullanılarak reaksiyon koşullarının [substrat mol oranı, yağ asitleri/triaçilgliserol, mol/mol), reaksiyon sıcaklığı (T, °C) ve reaksiyon süresi (t, saat)] optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Anne sütü yağına benzer YY eldesinde, hedeflenen “oleik/palmitik” asit oranını (1,25) elde etmek için gerekli optimum reaksiyon koşulları 12,2 mol/mol substrat mol oranı, 64,5°C sıcaklık ve 22,8 saat reaksiyon olarak bulunmuştur. Bu koşullar altında elde edilen anne sütü yağına benzer YY %52,1 oleik asit, %39,9 palmitik asit, ve %5,9 linoleik asit içermiş ve palmitik asidin %75,7’sinin de TAG’ın sn-2 pozisyonunda bulunduğu belirlenmiştir. Elde edilen optimum koşullar kullanılarak asidoliz reaksiyonları laboratuvar ölçekli karıştırılmalı tank tipi biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Karıştırılmalı tank tipi biyoreaktördeki yapılan üretim sonucunda elde edilen YY %54,0 oleik asit, %37,2 palmitik asit, ve %7,1 linoleik asit içermiş ve palmitik asidin %76,9’u TAG’ın sn-2 pozisyonunda bulunmuştur.

Çalışmanın üçüncü aşamasında ise anne sütü yağına benzer YY’ların bebeklerin sağlığı ve gelişimleri açısından önemli bir YA olan GLA ile zenginleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için, tripalmitin, fındık yağı SYA ve hodan yağından “üre fraksiyonlama” yöntemi ile elde edilen GLA konsantresi arasında enzimatik asidoliz reaksiyonları ile gerçekleştirilmiş ve tripalmitine %10 GLA ve %45 oleik asit katılımı hedeflenerek, “Tepki Yüzey Yöntemi” (TYY) ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzimatik asidoliz tepkimelerinde Lipozyme® RM IM ve Lipozyme® TL IM enzimleri kullanılmış ve bu iki enzimin GLA ile

zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY'ların üretimi üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır.

Lipozyme® RM IM ile katalizlenen reaksiyonlar için, hedeflenen GLA (%10) ve oleik asit (%45) katılımları için optimum koşullar substrat mol oranı 14,8 mol/mol, reaksiyon sıcaklığı 55°C ve reaksiyon süresi 24 saat olarak bulunmuştur. Bu koşullarda üretilen YY %43,3 oleik asit, %41,6 palmitik asit, %5,4 linoleik asit ve %9,7 GLA içermiş ve palmitik asidin %74,9'unun da TAG'ün sn-2 pozisyonunda bulunduğu belirlenmiştir. Lipozyme® TL IM ile katalizlenen reaksiyonlar için ise, optimum koşullar substrat mol oranı 14 mol/mol, reaksiyon sıcaklığı 55°C ve reaksiyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen YY %43,8 oleik asit, %40,9 palmitik asit, %5,5 linolenik asit ve %9,8 GLA içermiş ve palmitik asidin %73,9'unun da TAG'ün sn-2 pozisyonunda bulunduğu belirlenmiştir.

İki enzimin GLA ve oleik asit katılımına etkisini karşılaştırmak için, her iki enzim substrat mol oranı 16 mol/mol, reaksiyon sıcaklığı 55°C ve reaksiyon süresi 21,6 saat reaksiyon koşulu kullanılarak asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Lipozyme® RM IM ile elde edilen YY %43,6 oleik asit, %10,1 GLA, Lipozyme® TL IM ile elde edilen YY ise %44,3 oleik asit ve % 10,0 GLA içermiştir. Sonuç olarak, belirtilen reaksiyon koşulları altında her iki enzim ile benzer YA kompozisyonuna sahip ürün elde edilmiştir.

Vücutta hızla DGLA'e ve ardından prostaglandin E1 (PGE1) ve 15-OH DGLA gibi bağışıklık sağlayan ve iltihaplanmayı önleyici hormonlara dönüşen GLA'in de bilinen sağlık üzerine etkileri ve AA'nın öncüsü olması nedeniyle YY'lara eklenmesi ve bebek mamalarında potansiyel kullanım alanına sahip olması bebek beslenmesi ve sağlığı açısından önemli bir gelişmedir.

Çalışmanın dördüncü aşamasında ise, anne sütü yağına benzer YY'ların EPA ve DHA gibi iki önemli omega-3 YA ile zenginleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, tripalmitin, fındık yağı serbest YA'leri ve menhaden balık yağından "üre fraksiyonlama" yöntemi ile elde edilen omega-3 YA konsantresi arasında Lipozyme® RM IM enzimi varlığında enzimatik asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve tripalmitine %5 omega-3 YA, %40 oleik asit katılımı hedeflenerek, "Tepki Yüzey Yöntemi" (TYY) ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda hedeflenen omega-3 YA (%5) ve oleik asit (%40) katılımı için gerekli optimum koşullar: Substrat mol oranı "12,4 mol/mol",

reaksiyon sıcaklığı “55°C” ve reaksiyon süresi “24 saat” olarak bulunmuştur. Bu koşullarda elde edilen YY ürünündeki EPA+DHA miktarı %6,2, oleik asit miktarı %37,5, palmitik asit miktarı %45,5 ve linoleik asit miktarı %4,4 olmuştur. Ayrıca elde edilen YY’ın sn-2 pozisyonunda %76,6 oranında palmitik asit n-2 pozisyonunda bulunmuştur.

Her dört çalışmanın sonucunda elde edilen YY’ların sn-2 pozisyonundaki YA kompozisyonu anne sütü yağının sn-2 pozisyonunun YA kompozisyonuna oldukça yakın bulunmuştur. YY’ların sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında doymamış YA’lerinin, sn-2 pozisyonunda ise yüksek miktarlarda palmitik asidin bulunması bebek beslenmesi, yağ asidi absorpsiyonu ve bebeklerin kemik gelişimi açısından oldukça önemli bir husustur (Innis ve diğ., 1995; Jensen, 2001). Bu nedenle, anne sütü yağı kompozisyonuna benzer kompozisyona sahip, aynı zamanda bebeklerin beslenmesi ve gelişimi açısından gerekli olan olan YA’lerini doğru miktarlarda ve pozisyonlarda içeren YY’ların üretimi önem kazanmaktadır.

Ayrıca GLA, EPA ve DHA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY’lar hem sözkonusu yağ asitlerinin bebek sağlığı ve gelişmesindeki olumlu etkilerini hem de anne sütünün absorpsiyon karakteristikleri/YA bileşimini ürüne kazandırmak için başarıyla üretilmiştir. Bu ürünlerin endüstriyel ölçekte üretimleri bebek mamalarının formülasyonlarında bebek beslenmesi ve gelişimi için çok değerli bileşenler olarak kullanılmalarına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- AB-96/4/EEC**, Avrupa Birliği Regölasyonları
http://www.fsai.ie/legislation/food/legislation_foodnutritional.asp,
Şubat 2006 tarihinde alınmıştır.
- Akoh, C.C. and Moussata, C.O.**, 1998. Lipase-catalysed modification of borage oil: incorporation of capric acid and eicosapentaenoic acids to form structured lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 6, 697-701.
- Akoh, C.C. and Xu, X.**, 2002. Enzymatic production of Betapol and other specialty fats, in *Lipid Biotechnology*, pp. 461-478, Eds. Kuo, T.M. & Gardner, H.W., Marcel Dekker, New York.
- Akoh, C.C.**, 2002. Structured lipids, in *Food Lipids*, pp. 877-908, Eds. Akoh, C.C. & Min, D.B., Marcel Dekker Inc., New York.
- Akoh, C.C., Jennings, B.H. and Lillard, D.A.**, 1996. Enzymatic modification of evening primrose oil: incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 8, 1059-1062.
- Akoh, C.C., Sellappan, S., Fomuso, L.B. and Yankah, V.V.**, 2002. Enzymatic synthesis of structured lipids, in *Lipid Biotechnology*, pp. 433-460, Eds. Kuo, T.M. & Gardner, H.W., Marcel Dekker, New York.
- Alaşalvar, C., Shahidi, F., Ohshima, T., Wanasundara, U., Yurttaş, H.C., Liyanapathirana, C.M. and Rodrigues, F.B.**, 2003, Turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana L.*) 2. Lipid characteristics and oxidative stability, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3797-3805.
- Anon.**, 2006a. USDA Database http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl, Şubat 2006 tarihinde alınmıştır.
- Anon.**, 2003a. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliđi Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar ve Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2001/29) Resmi Gazete Sayı: 24452, 13.10.2001, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
- Anon.**, 2003b. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliđi Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2003/19) Resmi Gazete Sayı: 25150, 26.06.2003, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
- Anon.**, 2006b. Lipid Nutrition BV <http://www.lipidnutrition.com>, Ekim 2006 tarihinde alınmıştır.
- Anon.**, 2006c. Meadjohnson Nutritionals, <http://www.meadjohnson.com>, Şubat 2006 tarihinde alınmıştır.
- Anon.**, 2006d. Abbott Laboratories <http://www.abbott.com>, Şubat 2006 tarihinde alınmıştır.

- Anon.**, 2006e. Brightbeginnings Products <http://www.brightbeginnings.com>, Şubat 2006 tarihinde alınmıştır.
- Anon.**, 2006f. Nestle Nutrition Products <http://www.nutrition.nestle.com>, Şubat 2006 tarihinde alınmıştır.
- Ayala, S. and Brenner, R.R.**, 1983. Essential fatty acid status in zinc deficiency. Effect on lipid and fatty acid composition, desaturation capacity and structure of microsomal membranes of rat liver and testes, *Acta Physiol. Lat. Am.*, **33**, 3, 193-204.
- Bada, J.C., León-Camacho, M., Prieto, M. and Alonso, L.**, 2004, Characterization of oils of hazelnuts from Asturias, Spain, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **106**, 294–300.
- Balta, M.F., Yarılgac, T., Aşkın, M.A., Kuçuk, M., Balta F. and Özrenk, K.**, 2006. Determination of fatty acid compositions, oil contents and some quality traits of hazelnut genetic resources grown in eastern Anatolia of Turkey, *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 681-686 .
- Brenner, R.R.**, 1981. Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids, *Prog. Lipid Res.*, **20**, 41-47.
- Can, A. and Ozcelik, B.**, 2005. Enrichment of hazelnut oil with long-chain n-3 PUFA by lipase-catalyzed acidolysis: Optimization by response surface methodology, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 27-32.
- Carnielli, V.P., Luijendijk, I.H., van Beek, R.H., Boerma, G.J., Degenhart, H.J. and Sauer, P.J.**, 1995b. Effect of dietary triacylglycerol fatty acid positional distribution on plasma lipid classes and their fatty acid composition in preterm infants, *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 776-781.
- Carnielli, V.P., Luijendijk, I.H., van Goudoever, J.B., Johannes, B., Sulkers, E.J., Boerlage, A.A., Degenhart, H.J. and Sauer, P.J.**, 1996. Structural position and amount of palmitic acid in infant formulas: effects on fat, fatty acid, and mineral balance, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **23**, 5, 553-560.
- Carnielli, V.P., Luijendijk, I.H., van Goudoever, J.B., Sulkers, E.J., Boerlage, A.A., Degenhart, H.J. and Sauer, P.J.**, 1995a. Feeding premature newborn infants palmitic acid in amounts and stereoisomeric position similar to that of human milk: effects on fat and mineral balance, *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**, 1037-1042.
- Carnielli, V.P., Verlato, G., Pederzini, F. Luijendijk, I.H.T., Boerlage, A., Pedrotti, D. and Sauer, P.J.J.**, 1998, Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula, *Am. J. Clin. Nutr.*, **67**, 97- 103.
- Chandler, L.C., Quinlan, P.T. and McNeill, G.P.**, 1998. Lipase-catalyzed synthesis of chiral triglycerides, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 1513-1518.
- Chandrasekharan, N. And Basiron, Y.**, 2001. Changing perceptions on the role of saturated fats in human nutrition. palm oil developments, MPOB Pub., Malaysia.

- Chen, C.C., Chaungb, H.C., Chunga, M.Y. and Huang, L.T.,** 2006. Menhaden fish oil improves spatial memory in rat pups following recurrent pentylenetetrazole-induced seizures, *Epilepsy & Behavior*, **8**, 3, 516-521.
- Chen, M.L., Vali, S.R., Lin, J.Y. and Ju, Y.-H.,** 2004. Synthesis of the structured lipid 1,3-dioleoyl-2-palmitoylglycerol from palm oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **81**, 6, 525-532.
- Christensen, T.C. and Holmer, G.,** 1993. Lipase-catalyzed acyl-exchange reactions of butter oil, synthesis of a human milk fat substitute for infant formulas, *Milchwissenschaft*, **48**, 543-547.
- Clough, P.M.,** 2001. Specialty vegetable oils containing gamma-linolenic acid and steridionic acid, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 75-117, Ed. Gunstone, F.D., Marcel Dekker Inc., New York.
- Crews, C, Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S. and Winkelmann, W.,** 2005. Study of the main constituents of some authentic hazelnut oils, *J. Agr. Food Chem.*, **53**, 12, 4843-4852.
- Dziezak, J.D.,** 1990. Taking the gamble out of product development, *Food Technology*, **44**, 6, 109-117.
- Elliot, M.L., de Antueno, R.J., Bai, M. and Horrobin, D.F.,** 1998. Effect of dietary oils enriched in dilinoleoyl-mono- γ -linolenin (DLMG) on the total lipid n-6 fatty acid composition of human tumors grown in nude mice, in *Structural and Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use*, pp. 129-138, Ed. Christophe, A.B., AOCS Press, Illinois.
- Engler, M.M., Engler, M.B., Erickson, S.K. and Paul, S.M.,** 1992. Dietary gamma-linolenic acid lowers blood pressure and alters aortic reactivity and cholesterol metabolism in hypertension, *J. Hypertens.*, **10**, 1197-1204.
- Fewtrell, M.S., Abbott, R.A., Kennedy, K., Singhal, A., Morley, R., Caine, E., Jamieson, C., Cockburn, F. and Lucas, A.,** 2004. Randomized, double-blind trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation with fish oil and borage oil in preterm infants, *The Journal of Pediatrics*, **4**, 471-479.
- Fomuso, L.B. and Akoh, C.C.,** 1997. Enzymatic modification of triolein: incorporation of caproic and butyric acids to produce reduced calorie structured lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **74**, 269-272.
- Fomuso, L.B.,** 2002. Lipase-catalyzed synthesis of structured lipids and their food applications, *PhD Thesis*, University of Georgia, Athens, Georgia.
- Fouw, N.J.De, Kivits, G.A.A., Quinlan P.T. And Van Nielen, W.G.L.,** 1994, Absorption of isomeric, palmitic acid-containing triacylglycerols resembling human milk fat in the adult rat, *Lipids*, **29**, 11.
- Grompone, M.A.,** 1992. Enrichment of omega-3 PUFAs from fur seal oil, *Fett-Wissenschaft-Technologie*, **94**, 388-394.
- Guil-Guerrero, J.L., Gomez-Mercado, F., Rodriguez-Garcia, I., Campra-Madrid, P. and Garcia-Maroto, F.,** 2001. Occurrence and characterization of oils rich in gamma-linolenic acid (III): the

- taxonomical value of the fatty acids in *Echium* (*Boraginaceae*), *Phytochemistry*, **58**, 1, 117-120.
- Haraldsson, G.G. and Hjaltason, B.**, 2001. Fish oils as sources of important polyunsaturated fatty acids, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 313-350, Ed. Gunstone, F.D., Marcel Dekker, New York.
- Hayat, L., Al-Sughayer, M. and Afzal, M.**, 1999. A comparative study of fatty acids in human breast milk and breast milk substitutes in Kuwait, *Nutr. Res.*, **19**, 827-841.
- Horrocks, L.A. and Yeo, Y.K.**, 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA), *Pharmacol. Res.*, **40**, 211-225.
- Høy, C.E. and Xu, X.**, 2001. Structured triacylglycerols, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 209-239, Ed. Gunstone, F.D. Marcel Dekker, New York.
- Huo, C.T.**, 2002. Industrial use of lipase, in *Lipid Biotechnology*, pp. 387-399, Eds. Kuo, T.M., & Gardner, H.W., Marcel Dekker Inc., New York.
- Innis, S.M., Quinlan, P. and Diersen-Schade, D.**, 1993, Saturated fatty acid chain length and positional distribution in infant formula: effects on growth and plasma lipids and ketones in piglets, *Am. J. Clin. Nutr.*, **57**, 382-390.
- Innis, S.M.**, 1994. Fatty acid requirements of the newborn, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **72**, 12, 1483-1492.
- Innis, S.M., Dyer R., Quinlan, P. and Diersen-Schade, D.**, 1995. Palmitic acid is absorbed as sn-2 monopalmitin from milk and formula with rearranged triacylglycerols and results in increased plasma triglyceride sn-2 and cholesteryl ester palmitate in piglets, *J. Nutr.*, **125**, 73-81.
- Innis, S.M., Dyer, R., Quinlan, P. and Diersen-Schade, D.**, 1996, Dietary triacylglycerol structure and saturated fat alter plasma and tissue fatty acids in piglets, *Lipids*, **31**, 5, 3.
- Innis, S.M., Quinlan, P.T. and Nelson, CM.**, 1998. Structured triacylglycerols in infant nutrition and metabolism, in *Lipids in Infant Nutrition*, pp. 268-281, Eds. Huang Y.S. & Sinclair, A.J., AOCS Press, Illinois
- Jennings, B.H. and Akoh, C.C.**, 1999. Enzymatic modification of triacylglycerol of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 1133-1137.
- Jennings, B.H. and Akoh, C.C.**, 2000. Lipase-catalysed modification of rice bran oil to incorporate capric acid, *J. of Agr. Food Chem.*, **48**, 9, 4439-4443.
- Jensen, R.G. and Jensen G.L.**, 1992, Specialty lipids for infant nutrition: I. Milks and formulas, *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*, **15**, 232-245.
- Jensen, R.G.**, 2001. Infant formulas, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 455-464, Ed. Gunstone, F.D., Marcel Dekker, New York.
- Kapoor, R.**, 2005. γ -Linolenic acid: the health effects, in *Healthful Lipids*, pp.301-334, Ed. Akoh, C.C., & Lai, O.M., AOCS Press, Champaign, IL,

- Kawashima, A., Shimada, Y., Nagao, T., Ohara, A. Matsuhisa, T., Sugihara, A. and Tominaga, Y.**, 2002. Production of structured TAG rich in 1,3-dicapryloyl-2- γ -linolenoyl glycerol from borage oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79**, 2, 871-877.
- Kennedy, K., Fewtrell, M.S., Morley, R., Abbott, R., Quinlan, P.T., Wells, J.C.K., Bindels, J.G. and Lucas, A.**, 1999. Double-blind, randomized trial of a synthetic triacylglycerol in formula-fed term infants: effects on stool biochemistry, stool characteristics, and bone mineralization, *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**, 920-927.
- Koletzko, B., Baker, S., Cleghorn, G., Neto, U. F., Gopalan, S., Hernell, O., Hock, Q. S., Jirapinyo, P., Lonnerdal, B., Pencharz, P., Pzyrembel, H., Ramirez-Mayans, J., Shamir, R., Turck, D., Yamashiro, Y. and Zong-Yi, D.**, 2005. Global standards for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group, *J. Pediatr. Gastro Nutr.*, **41**, 584-599.
- Lai, M.O., Ghazali, H. M. and Chong, C.L.**, 1998. Effect of enzymatic transesterification on the fluidity of palm stearin-palm kernel olein mixtures, *Food Chemistry*, **63**, 2, 155-159.
- Lee, K.T. and Akoh, C.C.**, 1998. Solvent-free enzymatic synthesis of structured lipids from peanut oil and caprylic acid in a stirred tank batch reactor, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 11, 1533-1537.
- Lien, E.L.**, 1994. The role of fatty acid composition and positional distribution in fat absorption in infants, *Journal of Pediatrics*, **125**, 5, 62-68
- Lien, E.L., Boyle, F.G., Yuhas, R., Tomarelli, R.M. and Quinlan, P.**, 1997. The effect of triglyceride positional distribution on fatty acid absorption in rats, *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*, **25**, 2, 167-174.
- Lin, T.-J., Chen, S.-W. and Chang, A.-C.**, 2006. Enrichment of n-3 PUFA contents on triglycerides of fish oil by lipase-catalyzed trans-esterification under supercritical conditions, *Biochemical Engineering Journal*, **29**, 1-2, 27-34.
- López- López, A., Castellote-Bargalló, A.I., Campoy-Folgoso, C., Rivero-Urgel, M., Tormo-Carnicé, R., Infante-Pina, D. and López-Sabater, M.C.**, 2001. The influence of dietary palmitic acid triacylglyceride position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces, *Early Human Development*, **6**, 83-94.
- Lucas, A., Quinlan, P., Abrams, S., Ryan, S., Meah, S. and Lucas, P.J.**, 1997. Randomised controlled trial of a synthetic triglyceride milk formula for preterm infants. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal. Ed.*, **77**, F178-F184.
- Lumor, S.E. and Akoh, C.C.**, 2005. Enzymatic incorporation of stearic acid into a blend of palm olein and palm kernel oil: Optimization by response surface methodology, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 421-426.

- Marangoni, A.G.**, 2002. Lipases: structure, function, and properties, in *Lipid Biotechnology*, pp. 357-387, Eds. Kuo, T.M., & Gardner, H.W., Marcel Dekker Inc., New York.
- Miller, C.C. and Ziboh, V.A.**, 1998. Gamma-linolenic acid-enriched diet alters cutaneous eicosanoids, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 3, 967-974.
- Montgomery, D.C.**, 1997. Design and Analysis of Experiments, John Wiley & Sons, New York.
- Mu, H., Xu, X. and Høy, C.E.**, 1998. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed interesterification in a laboratory-scale continuous reactor, *Applied J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 9, 1187-1193.
- Mukherjee, K.D. and Kiewitt, I.**, 1998. Structured triacylglycerols resembling HMF by transesterification catalyzed by papaya (*Carica papaya*) latex, *Biotechnol. Lett.*, **20**, 613-616.
- Muralidhar, R.V., Chirumamila, R.R., Marchant, R. and Nigam, P.**, 2001. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources, *Biochemical Engineering Journal*, **9**, 17-23.
- Myers, R.H. and Montgomery, D.C.**, 2002. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, John Wiley & Sons Inc., New York.
- Naessens, M., Vercauteren, R. and Vandamme, E.J.**, 2004, Three-factor response surface optimization of the production of intracellular dextran dextrinase by *Gluconobacter oxydans*, *Process Biochemistry*, **39**, 10, 1299-1304.
- Nagao, T., Shimada, Y., Sugihara, A., Murata, A., Komemushi, S. and Tominaga, Y.**, 2001. Use of thermostable *Fusarium heterosporum* lipase for production of structured lipid containing oleic and palmitic acids in organic-solvent system, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78**, 2, 167-172.
- Nielsen, N.S., Yang, T., Xu, X. and Jacobsen, C.**, 2006. Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor, *Food Chemistry*, **94**, 53-.
- O'Shea, M., Gerritsen, J. and Mohede, I.**, 2006. Clinical benefits of a structured lipid (BetapolTM) in infant formula, in *Handbook of Functional Lipids*, pp. 261-278, Ed. Akoh, C.C., CRC Press, FL.
- Osborne, H.T. and Akoh, C.C.**, 2002. Structered lipids-novel fats with medical, nutraceutical, and food applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **1**, 93-103.
- Özçelik, B. ve Karaali, A.**, 2002. Omega-3 yağ asitleri ve sağlığımız, *Gıda*, 2002, **1**, 34-38.
- Özdemir, M., Açıktur, F., Kaplan, M., Yıldız, M., Löker, M., Gürçan, T., Biringen, G., Okay, A. and Seyhan, F.G.**, 2001. Evaluation of new Turkish hybrid hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties: fatty acid

- composition, α -tocopherol content, mineral composition and stability, *Food Chemistry*, **73**, 4, 411-415.
- Paez, B.C., Medina, A.R., Rubio, F.C., Moreno, P.G. and Grima, E.M.**, 2002. Production of structured triglycerides rich in n-3 polyunsaturated fatty acids by the acidolysis of cod liver oil and caprylic acid in a packed-bed reactor: equilibrium and kinetics, *Chemical Engineering Science*, **57**, 1237-1249.
- Puiggros, C., Chacon, P., Armadans, L.I., Clapes, J. and Planas, M.**, 2002. Effects of oleic-rich and omega-3-rich diets on serum lipid pattern and lipid oxidation in mildly hypercholesterolemic patients, *Clinical Nutrition*, **21**, 1, 79-87.
- Quinlan, P.T., Lockton, S., Irwin, J. and Lucas, A.L.**, 1995. The relationship between stool hardness and stool composition in breast- and formula-fed infants, *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*, **20**, 81-90.
- Rao, R. B., Manohar, Sambaiah, K. and Lokesh, B.R.**, 2002. Enzymatic acidolysis in hexane to produce n-3 or n-6 FA-enriched structured lipids from coconut oil: optimization of reactions by response surface methodology, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 9: 885-890.
- Ratledge, C.**, 2001. Microorganisms as sources of polyunsaturated fatty acids, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 351-400, Ed. Gunstone, F.D., Marcel Dekker, New York.
- Ratnayake, W.M.N., Olsson, B., Matthews, D. and Ackman, R.G.**, 1988. Preparation of omega-3 PUFA concentrates from fish oils via urea complexation, *Fett-Wissenschaft-Technologie*, **90**, 381-386.
- Redden, P.R., Lin, X. and Horrobin, D.F.**, 1998. Di-linoleoyl-mono-gamma-linolenin (DLMG) and di-gamma-linolenoyl-mono- linolein (DGML); naturally occurring structured triacylglycerols in evening primrose oil, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use*, pp. 121-128, Ed. Christophe, A.E., AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Schmid U., Bornscheuer, U.T., Soumanou, M.M., McNeill, G.P. and Schmid, R.D.**, 1999. Highly selective synthesis of 1,3-oleoyl-2-palmitoylglycerol by lipase catalysis, *Biotechnology and Bioengineering*, **64**, 678-684.
- Schmid, U., Bornscheuer, U.T., Soumanou, M.M., McNeill, G.P. and Schmid, R.D.**, 1998. Optimization of the reaction conditions in the lipase-catalyzed synthesis of structured triglycerides, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 1527-1531.
- Sellappan, A. and Akoh, C.C.**, 2001. Synthesis of structured lipids by transesterification of trilinolein catalyzed by Lipozyme IM60, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2071-2076.
- Senanayake, N. and Shahidi, F.**, 1999. Enzymatic incorporation of docosahexaenoic acid into borage oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 9, 1009-1015.
- Senanayake, N. and Shahidi, F.**, 2000. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) from algal oil via urea complexation, *J. Food Lipids*, **7**, 51-61.

- Shieh, C.-J., Akoh, C.C. and Koehler, P.E.**, 1995. Four-factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 6, 619-623.
- Shimada, Y., Nagao, T., Hamasaki, Y., Akimoto, K., Sugihara, A., Fujikawa, S., Komemushi, S. and Tominaga, Y.**, 2000. Enzymatic synthesis of structured lipid containing arachidonic and palmitic acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **77**, 1, 89-93.
- Shimada, Y., Suenaga, M., Sugihara, A., Nakai, S. and Tominaga, Y.**, 1999. Continuous production of structured lipid containing γ -linolenic and caprylic acids by immobilized *Rhizopus delemar* lipase, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 2, 189-193.
- Sidhu, K.S.**, 2003. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil, *Regul. Toxicol. Pharm.*, **38**, 336-344.
- Simopolous, A.P.**, 2004. Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases, *Food Rev. Int.*, **20**, 1, 77-90.
- Spurgeon, M.J., Palmer, A.K. and Hepburn, P.A.**, 2003. An investigation of the general, reproductive and postnatal developmental toxicity of BetapolTM, a human mil fat equivalent, *Food Chem. Tox.*, **41**, 10, 1355-1366.
- Spurvey, S.A. and Shahidi, F.**, 2000. Concentration of gamma linolenic acid (gla) from borage oil by urea complexation: optimization of reaction conditions, *Journal of Food Lipids*, **7**, 163-173.
- Srivastava, A., Akoh, C.C, Shu-Wei-Chang; Guan-Chiun-Lee and Jei-Fu-Shaw**, 2006. *Candida rugosa* lipase LIP1-catalyzed transesterification to produce human milk fat substitute, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 14, 5175-5181.
- Summers L.K.M., Fielding B.A., Ilic, V., Quinlan, P.T. And Frayn, K.N.**, 1998, The effect of triacylglycerol fatty acid positional distribution on postprandial metabolism in subcutaneous adipose tissue, *Brit. J. Nutr.*, **79**, 141-147.
- Şahin, N., Özçelik, B. ve Karaali, A.**, 2003. Yapılandırılmış yağlar ve üretimlerinde lipaz enzimlerinin kullanımı, *Gıda*, **8**, 72-77.
- Thompson, D.**, 1982. Response Surface Experimentation, *Journal of Food Processing and Preservation*, **6**, 155-188.
- Wainwright, P.E., Huang, Y. and Ward, G.R.**, 2001. Effects of supplementation of formula with docosahexaenoic acid, arachidonic acid, and gamma-linolenic acid on brain fatty acid composition in artificially reared rat pups, in *Gamma-Linolenic Acid: Recent Advances in Biotechnology and Clinical Applications*, pp. 180-190, Eds. Huang, Y.S. & Ziboh, V.A., AOCS Press, Illinois.
- Wanasundara, U.N. and Shahidi, F.**, 1999. Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions, *Food Chemistry*, **65**, 41- 49.

- Wanasundara, U.N. and Wanasundara, J.P.D.**, 2005. γ -Linolenic acid: purification and functionality, in *Handbook of Functional Lipids*, pp. 47-189. Ed. Akoh, C.C., CRC Taylor & Francis Group, New York.
- Watkins S.M. and German, J.B.**, 2002. Unsaturated fatty acids, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Second Edition, Revised and Expanded*, pp. 559- 588, Eds. Akoh, C.C. & Min, D.B., Marcel Dekker Inc., New York.
- Winter, C.H., Hoving, E.B. and Muskiet, F.A.J.**, 1993. Fatty acid composition of human milk triglyceride species. Possible consequences for optimal structures of infant formula triglycerides, *J. Chromatogr.*, **616**, 9-24.
- Xu, X.**, 2000. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: A review, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **102**, 4, 287-303.
- Xu, X., Balchen, S., Høy, C.-E. and Adler-Nissen, J.**, 1998. Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalyzed interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration. *Ibid.*, **75**, 301-308.
- Xu, X., Fomuso, L. B. and Akoh, C. C.**, 2000b. Synthesis of structured TAG by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **48**, 3-10.
- Xu, X., Fomuso, L.B. and Akoh, C.C.**, 2000a. Modification of menhaden oil by enzymatic acidolysis to produce structured lipids: optimization by response surface design in a packed bed reactor, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **77**, 2, 171-176.
- Xu, X., Skands, A.R.H., Hoy, C.E., Mu, H., Balchen, S. and Nissen, J.A.**, 1998. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: elucidation of acyl migration by response surface design, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **75**, 9, 1179-1186.
- Yang, T.K., Xu, X., He, C. and Li, L.**, 2003a. Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes, *Food Chemistry*, **80**, 4, 473-481.
- Yang, T.K., Fruekilde, M.B. and Xu, X.**, 2003b. Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 9, 881-887.
- Zampelas, A., Williams, C.M., Morgan, L.M., Wright, J. and Quinlan, P.T.**, 1994. The effect of triacylglycerol fatty acid positional distribution on postprandial plasma metabolite and hormone responses in normal adult men, *Br J Nutr*, **71**, 401-410.
- Zock, P.L., Gerritsen, J. and Katan, M.B.**, 1996. Partial conservation of the sn-2 position of dietary glycerides in fasting plasma lipids in humans, *Eur. J. Clin. Invest*, **26**, 141-150.
- Zuta, C.P., Simpson, B.K., Chan, H.M. and Philips, L.**, 2003. Concentrating PUFA from mackerel processing waste, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 933-936.

ÖZGEÇMİŞ

Neşe Şahin Yeşilçubuk 25.11.1975 tarihinde Edirne’de doğdu. Orta ve lise öğrenimini Edirne Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 1993 yılında başladığı İ.T.Ü. Gıda Mühendisliği’nden 1997 yılında mezun oldu. Aynı yıl İ.T.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü’nde yüksek lisans programına başlamıştır. 1997-1999 yılları arasında Mayasan Gıda San. Ve Tic. A.Ş.’de çalıştıktan sonra 2000 yılında Gıda Mühendisliği Bölümü’nde doktora öğrenimine başladı. Yine 2000 yılında aynı bölümde araştırma görevlisi kadrosuna atandı. 2004 yılında TÜBİTAK (NATO-A2) yurtdışı araştırma bursu ile gittiği A.B.D.’de University of Georgia’da 6 ay süreyle doktora araştırmalarını gerçekleştirdi. 1-4 Mayıs 2005 tarihlerinde ABD’nin Salt Lake City şehrinde Amerikan Yağ Kimyagerleri Birliği (AOCS) tarafından düzenlenen toplantıda doktora çalışmasının bir kısmını oluşturan ‘Lipase-catalyzed interesterification of tripalmitin to produce human milk fat substitutes containing gamma-linolenic acid by response surface methodology’ konulu yayını ile biyoteknoloji alanında ikincilik ödülü aldı. Haziran 2006’da evlendi. Üç adet SCI (A tipi) uluslararası makalesi ve toplam 27 adet ulusal ve uluslararası kongrelerde sunulmuş bildirisi bulunmaktadır.