

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KABAK ÇEKİRDEĞİNDEN ENZİMATİK SULU EKSTRAKSİYON İLE YAĞ
ELDESİ VE YANIT YÜZEY YÖNTEMİYLE OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülizar BALCIOĞLU

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN

HAZİRAN 2015

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KABAK ÇEKİRDEĞİNDEN ENZİMATİK SULU EKSTRAKSİYON İLE YAĞ
ELDESİ VE YANIT YÜZEY YÖNTEMİYLE OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Gülizar BALCIOĞLU
(506121036)**

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN

HAZİRAN 2015

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506101236 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Gülizar BALCIOĞLU** ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**KABAK ÇEKİRDEĞİNDEN ENZİMATİK SULU EKSTRAKSİYON İLE YAĞ ELDESİ VE YANIT YÜZEY YÖNTEMİYLE OPTİMİZASYONU**” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Melek TÜTER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sevil YÜCEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 4 Mayıs 2015
Savunma Tarihi : 3 Haziran 2015

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince, bilgi ve birikimiyle beni en iyi şekilde yönlendiren ve yardımlarını tüm içtenliğiyle sunarak destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN'e, laboratuvar çalışmalarımda bana yol gösteren deneyimlerini yardımseverlikle aktaran saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Melek TÜTER'e, uzun laboratuvar çalışmalarımda arkadaşlığını ve yardımını esirgemeyen Yiğit AYHAN'a ve maddi ve manevi destekleriyle eğitim ve öğretim hayatım boyunca yanımda olan en değerli varlık hazinem aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Mayıs 2015

Gülizar BALCIOĞLU
(Kimya Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	5
2.1 Kabak Bitkisi ve Üretimi.....	5
2.1.1 Kabak bitkisi ve özellikleri	5
2.1.2 Dünya’da ve Türkiye’de kabak üretimi	7
2.2 Kabak Çekirdeği ve Yağı Hakkında Bilgi.....	11
2.2.1 Kabak çekirdeğinin karakteristik özellikleri	11
2.2.2 Kabak çekirdeği yağının karakteristik özellikleri	13
2.2.3 Kabak çekirdeği ve yağının kullanım alanları ve sağlık üzerine etkileri..	15
2.3 Bitkisel Yağ Eldesi.....	18
2.3.1 Ön işlemler	19
2.3.2 Soğuk/Mekanik presleme.....	21
2.3.3 Süperkritik ekstraksiyon	22
2.3.4 Çözücü ekstraksiyonu	24
2.3.5 Rafinasyon işlemleri	26
2.4 Enzimatik Sulu Ekstraksiyon	27
2.4.1 Enzimler hakkında genel bilgi	30
2.5 Deneysel Tasarım ve Optimizasyon.....	31
2.5.1 Yanıt yüzey deney tasarımları.....	32
2.5.2 Plackett-Burman deney tasarımı	35
2.5.3 Merkezi bileşik deney tasarımı	37
2.6 Literatürde Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Üzerine Yapılmış Çalışmalar	39
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	45
3.1 Kullanılan Hammaddeler	45
3.2 Yöntemler.....	46
3.2.1 Kabak çekirdeği tohumlarının öğütülmesi ve karakterizasyonu	46
3.2.2 Kabak çekirdeği yağının yağ asitleri bileşimlerinin belirlenmesi	47
3.2.3 Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesi ve ekstraksiyon veriminin hesaplanması	48
3.2.4 Deneysel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi	50
3.2.5 Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu	51
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	53
4.1 Kabak Çekirdeği Tohumlarının ve Yağının Karakterizasyonu	53
4.2 Kabak Çekirdeği Tohumu Yağının Yağ Asitleri Bileşimi	53

4.3 Kabak Çekirdeği Tohumlarından Enzimatik Sulu Ekstraksiyon ile Yağ	
Eldesinde Yağ Verimine Ekstraksiyon Parametrelerinin Etkisi	54
4.3.1 Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ	
eldesinde pH aralığının yağ verimine etkisi	55
4.3.2 Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ	
eldesinde enzim miktarının yağ verimine etkisi	56
4.3.3 Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ	
eldesinde ekstraksiyon süresinin yağ verimine etkisi	58
4.3.4 Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ	
eldesinde inkübasyon sıcaklığının yağ verimine etkisi	59
4.4 Plackett- Burman Deneysel Tasarım Yoluyla Ekstraksiyon Parametrelerinin	
Optimizasyonu	61
4.4.1 Plackett- Burman deneysel tasarım yoluyla ekstraksiyon parametrelerinin	
etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	63
4.5 Yanıt Yüzey Yöntemi ile Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Parametrelerinin	
Optimizasyonu	64
4.5.1 Merkezi Bileşik deneysel tasarım yoluyla ekstraksiyon parametrelerinin	
etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	68
4.5.2 Yanıt Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması	71
5. VARGILAR VE ÖNERİLER.....	77
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	89

KISALTMALAR

AOCS	: Amerikan Yağ Kimyacıları Derneği (American Oil Chemist' Society)
CCC	: Dıştan Çemberlenmiş Merkezi Bileşik (Circumscribed Central Composite)
CCD	: Merkezi Bileşik Tasarım (Central Composite Design)
CCF	: Yüzey Merkezi Bileşik (Faced Central Composite)
CCI	: Sınırlandırılmış Merkezi Bileşik (Inscribed Central Composite)
EPA	: Çevre Koruma Ajansı (Environment Protection Agency)
FAO	: Gıda ve Tarım Teşkilatı (Food and Agriculture Organization)
RSM	: Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology)
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
V_K	: Enzimatik Yağ Verimi (Katı bakiye üzerinden)
V_S	: Enzimatik Yağ Verimi (Sıvı fraksiyonlar üzerinden)

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Ülkelerin yıllara göre kabak üretim miktarları (1.000 ton).....	8
Çizelge 2.2 : Türkiye'nin yıllara göre bazı tür kabak üretim miktarları.....	9
Çizelge 2.3 : Türkiye'de ekilen bazı kabak türleri, ekili alan ve üretim değerleri	10
Çizelge 2.4 : Bölgelere göre çerezlik kabak üretimi.....	11
Çizelge 2.5 : Türkiye'de başlıca çerezlik kabak yetiştiren iller, ekili alan ve üretim değerleri.....	11
Çizelge 2.6 : Kabak çekirdeği küspesinin bileşimi.....	12
Çizelge 2.7 : Kabak çekirdeğinin mineral madde bileşimi.....	13
Çizelge 2.8 : Kabak (<i>Cucúrbita pepo</i> ve <i>Cucúrbita maxima</i>) tohumlarından elde edilen ham yağların fizikokimyasal özellikleri	14
Çizelge 2.9 : Kabak çekirdeği yağının yağ asitleri kompozisyonu	15
Çizelge 2.10 : Üç faktörlü ve sekiz deneyli bir Plackett-Burman tasarım matrisi. ...	36
Çizelge 2.11 : Üç faktörlü bir sistem için Dışından Çemberlenmiş Merkezi Bileşik Deney Tasarım Noktaları.	39
Çizelge 3.1 : Gaz kromatografisi analiz koşulları	48
Çizelge 4.1 : Kabak çekirdeği tohumu yağının yağ asitleri bileşimi	54
Çizelge 4.2 : Kabak çekirdeği tohumlarının proteaz enzimi ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine pH etkisi	55
Çizelge 4.3 : Kabak çekirdeği tohumlarının proteaz enzimi ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine enzim miktarının etkisi	57
Çizelge 4.4 : Kabak çekirdeği tohumlarının proteaz enzimi ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine sürenin etkisi	58
Çizelge 4.5 : Kabak çekirdeği tohumlarının proteaz enzimi ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine sıcaklığın etkisi	60
Çizelge 4.6 : 3 değişkenli, 2 seviyeli Plackett-Burman deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviyeler.	61
Çizelge 4.7 : Plackett-Burman deney tasarımındaki tasarım noktaları.....	62
Çizelge 4.8 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Enzim Miktarı: 0,5 mL/g tohum) (Deney No:1-4 Sonuçları).	62
Çizelge 4.9 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Enzim Miktarı: 1 mL/g tohum) (Deney No: 5-8 Sonuçları).	63
Çizelge 4.10 : Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer modelle etkilerin tahminleri ve katsayıları.	63
Çizelge 4.11 : 3 değişkenli, 5 seviyeli merkezi bileşik deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviyeler.	65
Çizelge 4.12 : Dıştan çemberlenmiş merkezi bileşik deney tasarımındaki tasarım noktaları.....	65
Çizelge 4.13 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Enzim Miktarı: 0,75 mL/g tohum) (Deney No:1-4 Sonuçları).	66

Çizelge 4.14 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Enzim Miktarı: 1,25 mL/g tohum) (Deney No: 5-8 Sonuçları).	66
Çizelge 4.15 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Sıcaklık 55 °C) (Deney No: 9-12 Sonuçları).....	67
Çizelge 4.16 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Enzim Miktarı: 1,0 mL/g tohum, Süre: 30 saat) (Deney No: 13-17 Sonuçları).	67
Çizelge 4.17 : Dıştan çemberlenmiş merkezi bileşik deney tasarımına göre yürütülmüş deneylerden elde edilen yanıtlar.....	68
Çizelge 4.18 : Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer, kuadratik ve ikili etkileşimli modellerde etkilerin katsayıları.....	69
Çizelge 4.19 : Varyans analizi sonuçları.	70
Çizelge 4.20 : Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri.....	71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Ülkemizde yetiştirilen çekirdeklik kabaklar.....	5
Şekil 2.2 : Yıllara göre Türkiye kabak üretim değerleri.....	9
Şekil 2.3 : İki parametrenin yanıt yüzey ve izdüşüm grafiği.....	35
Şekil 2.4 : Merkezi bileşik deney tasarımında üç değişkenli bir sistem için deney noktaları.....	37
Şekil 2.5 : Merkezi bileşik deney tasarım örnekleri	38
Şekil 3.1 : Soxhlet düzeneği.	46
Şekil 3.2 : Enzimatik ekstraksiyon sonrası fazlar	49
Şekil 4.1 : Kabak çekirdeği tohumunun proteaz ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine pH etkisi.....	56
Şekil 4.2 : Kabak çekirdeği tohumunun proteaz ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine enzim miktarının etkisi	57
Şekil 4.3 : Kabak çekirdeği tohumunun proteaz ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine sürenin etkisi.....	59
Şekil 4.4 : Kabak çekirdeği tohumunun proteaz ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine sıcaklığın etkisi	60
Şekil 4.5 : Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki.	71
Şekil 4.6.a : Ekstraksiyon veriminin, sıcaklık ve enzim miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.	72
Şekil 4.6.b: Ekstraksiyon veriminin, sıcaklık ve enzim miktarı ile değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği	73
Şekil 4.7.a : Ekstraksiyon veriminin, süre ve enzim miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	74
Şekil 4.7.b: Ekstraksiyon veriminin, süre ve enzim miktarı ile değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği.....	74
Şekil 4.8.a : Ekstraksiyon veriminin, sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	75
Şekil 4.8.b: Ekstraksiyon veriminin, sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği.....	76

KABAK ÇEKİRDEĞİNDEN ENZİMATİK SULU EKSTRAKSİYON İLE YAĞ ELDESİ VE YANIT YÜZEY YÖNTEMİYLE OPTİMİZASYONU

ÖZET

Kabak çekirdeği (*Cucurbita pepo* L.), sıcak iklimlerde ve nemli bölgelerde yetişen ülkemizde de geniş coğrafyada yetiştiriciliği yapılan türlerdendir. Özellikle, tohumlarındaki %40-60 yağ oranı ile önemli bitkisel yağ kaynakları arasındadır. İçerdiği yüksek yağ asitlerinin %73-80 civarını, doymamış yağ asitlerinden olan linoleik ve oleik asit oluşturmaktadır. Kabak çekirdeği yapısında bulunan zengin yağ asitleri, antioksidan maddeler ve E vitamini ile gıda, ilaç, kozmetik endüstrisinde ve medikal alanlarda son yıllarda ilgi çeken bir bitkisel tohum haline gelmiştir.

Bu çalışmanın amacı, bitkisel tohumlardan yüksek kalitede ve verimde yağ ekstraksiyonunda, geleneksel olarak kullanılan çözücü ekstraksiyonu yöntemine alternatif olabilecek bir yöntem geliştirilmesi ve ekstraksiyon işlemine etki eden parametrelerin optimizasyonudur. Ekstraksiyon yöntemi olarak enzimatik sulu ekstraksiyon seçilmiş olup, hücre duvarını degrade etmek için proteaz enzimi eklenmiştir. Deneylerde içerisinde %46,43 oranında yağ içeren Nevşehir menşeli kabuksuz kabak çekirdeği tohumları kullanılmıştır. Proteaz olarak Alcalase 2.5L ticari enzimi kullanılmıştır. Enzimatik ekstraksiyonlar, 0,6-1 mm tohum fraksiyonu ile, 1:7 tohum:tampon çözelti oranında, pH 4-8 aralığında, 0,25-1,50 mL/g enzim miktarlarında, 4-36 saatlik sürede ve 40-70°C sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon öncesi deneyler yapılarak, proteaz enzimi için pH, enzim miktarı, süre ve sıcaklık açısından yüksek ekstraksiyon verimi sağlayacak çalışma aralıkları belirlenmiştir. Ön deneyler sonucunda, pH parametresinin çalışılan aralıkta, verim değerlerinde çok az etki yaptığı görülmüş ve değişken bir parametre olarak seçilmemesine karar verilmiştir.

Deneysel tasarımın ilk kısmında, Plackett-Burman yöntemiyle üç değişkenli (enzim miktarı, süre, sıcaklık), iki seviyeli (-1, +1) ve iki tekrarlı deneysel tasarım matrisine göre 16 adet deney yapılmıştır. Seviyelerin seçimi, birinci kısımdaki deney sonuçlarına göre yapılmış olup, düşük ve yüksek seviyeler sırasıyla; enzim miktarı için 0,5-1,0 mL/g tohum, süre için 18-30 saat ve sıcaklık için 45-55°C olarak belirlenmiştir. Deney sonuçlarının programa girilmesiyle lineer yaklaşım denklem modelinin katsayıları sırasıyla; 0,6537, 1,7625 ve 0,6238 olarak elde edilmiştir. Bu değerlere göre, ileri aşamadaki merkezi bileşik deneysel tasarımında merkez noktanın (0), üç parametre için de yüksek seviyeli değerlerinin seçilmesine karar verilmiştir.

Deneysel tasarımın ikinci kısmında, dıştan çemberlenmiş merkezi bileşik kübik tasarım yoluyla üç değişkenli (enzim miktarı, süre, sıcaklık), beş seviyeli (-1,68, -1, 0, +1, +1,68) ve iki tekrarlı deneysel tasarım matrisine göre 34 adet deney yapılmış ve Yanıt Yüzey Yöntemi'yle kabak çekirdeğinden enzimatik sulu ekstraksiyonla yağ eldesinde etkisi olduğu düşünülen parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu seviyeler sırasıyla; enzim miktarı için 0,58 mL/g tohum, 0,75 mL/g tohum, 1 mL/g tohum, 1,25 mL/g tohum, 1,42 mL/g tohum; süre için 19,92 saat, 24 saat, 30 saat, 36 saat, 40,08 saat ve sıcaklık için 46,6°C, 50°C, 55°C, 60°C ve 63,4°C olarak belirlenmiştir. Elde edilen istatistiki sonuçlara göre; her üç faktörün de ekstraksiyon veriminde etkin oldukları görülmektedir. Sonuç katsayılarına göre ekstraksiyon veriminde sırasıyla, sıcaklık (lineer), sıcaklık (kuadratik), enzim miktarı (lineer), süre (lineer) ve süre (kuadratik)

etkili parametreler olarak bulunmuştur. Parametreler arası etkileşimler gözlenmemiştir. Yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde temel(lineer) etkilerin yanıtta etkileri daha belirgin biçimde görülmüştür. Kontrol edilebilir faktörlerin optimal değerleri enzim miktarı 0,72 mL/g tohum, süre 35,56 h ve sıcaklık 49,7°C olarak bulunmuştur. Optimum noktada yapılan deney sonucu %54,56 olarak bulunmuş olup modelden tahminlenen değere oldukça yakındır.

AQUEOUS ENZYMATIC EXTRACTION OF OIL FROM PUMPKIN SEEDS AND OPTIMIZATION BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

SUMMARY

Lipids are one of the most important sources of energy because of being among essential substances as carbohydrates and proteins that have vital value and play important role in human nutrition and necessary for human body. They have healthy effects on body in terms of having characteristics of high nutritional value with high fatty acids for cell structure, low saturated fat, dissolving soluble vitamins in oil such as A, D, E, K.

Oil seeds used and cultivated widely at oil production in our country are sunflower, corn, olive, canola, peanuts, nuts, soy and cotton. Due to the rapid increase in the demand for vegetable oil and the failure to meet this demand at the national level, it is needed to find out alternative sources of the production of vegetable oil from oilseeds and alternative methods to achieve the most effective way of it. Pumpkin seeds with approximately 40-60% fat content are one of the alternative sources of oilseeds to meet the needs of our country.

The genus *Cucurbita* belonging to Cucurbits (*Cucurbitaceae*) family of plant has some species as *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata*. In our country, the seeds of *Cucurbita pepo* L. species are often used in common to obtain the edible vegetable oil as well as snack. This plant grows widely in tropical, subtropical and temperate regions over the world and are cultivated in many areas of the world. Pumpkin production in the world is almost 25 million tons per year and China, India and Russia are the countries of making most production. Turkey ranks 12th among the world countries with the amount of 388.785 tonnes of production. In our country, the leading areas of cultivating pumpkin seeds are Kayseri, Nevsehir, Aksaray, Konya and Edirne, respectively.

Pumpkin seeds, in addition to the consumption as snack, are excellent sources for human health due to rich in fat, protein, mineral and amino acid content. It is known that pumpkin seed contains 35-40% of oil, 37% carbohydrates, 35-40% protein ratio, as well as macro and micro elements Ca, K, P, Mg, Fe, Zn and vitamins in it.

The pumpkin seed oil has an important place among other vegetable oils because it contains the linoleic and linolenic acids, two very important unsaturated fatty acid that must be taken in food, and have the positive effects on human health with beneficial ingredient. In particular, it is an important source of two of the essential fatty acids for the body, ω -3 and ω -6.

When the oil composition is analyzed, it has high unsaturated fatty acid content with the rate of 73-80% including basically linoleic, oleic, palmitic and stearic acids. Also, it is one of the richest oil including Vitamin E with biological antioxidant properties. Due to the described features, these oils have potential usage areas not only in the food industry but also in the pharmaceutical and cosmetics industries. Especially, thanks to double bonds in the unsaturated fatty acids having tendency to

react facilely, it is important for the development of numerous functional pharmaceutical products.

To obtain oil from oil seeds, the most common methods in the world are mechanical pressing, solvent extraction or the combination of pressing and solvent extraction. The most commonly used solvent in the solvent extraction is n-hexane. Generally, the use of hexane provides high efficiency but low protein quality, and leads to high investment costs and energy requirements for the refinery. Also hexane has the negative environmental effects of being emitted to the atmosphere and reacting with other pollutants during extraction, solvent recovery and refinery processes. For these reasons, aqueous and enzyme additive aqueous extraction method has been developed as an environmentally friendly alternative method to extract oil from the oilseeds in safe operating conditions with high-yield edible quality oil and protein.

In the aqueous extraction process, certain enzymes are added to the extraction medium to get oil from seeds to provide high extraction efficiency at the same time reduce side products of it and provide better process conditions for extraction. Compared with solvent extraction method, enzymatic processes allow obtain higher quality oil and the fat and protein-rich cake at a lower temperature. It is reported that the quality of the resulting oil is better, especially in terms of colour and free fatty acid content of it. However, this process has some limitations, mainly for; lower yields of oil extraction, enzyme costs, causing emulsification, and struggling with the aqueous waste.

Many researchers have done a lot of work on aqueous enzymatic oil extraction from oil seeds and fruits in order to obtain oil and different compounds and they have found that the yield value could be obtained the same or close the results of the solvent extraction processes. However, laboratory scale researches are needed to continue further researches to provide optimum conditions for extraction and separation stages of the process in order to take it to bring commercially more attractive.

Optimization is an essential tool in food engineering for the efficiency of the processing operations and high acceptability of the processes yield. In other wods, it is the simultaneous application of the independent variables considered have effects on the results and the interaction with each other. It is intended to make the most efficient contribution to the results of the independent variables in the process design by applying together with the numerical analysis and engineering in computer software. The biggest advantage of the experimental design is the minimization of the experimental waste of time and the reduction of material consumption and the industrial workforce.

The response surface methodology is a statistical technique including optimization. The parameters affecting the process are called as independent variables while the responses are designated as dependent variables. Optimum regions are derived by superimposition of the contour plots or using desirability function or non-linear programming approaches. Response Surface Methodology (RSM) has been also widely used in many food processing application.

The aim of this study is the investigation of a method as an alternative to conventional solvent extraction.method with high oil yield and quality and the optimization of the parameters that affect the extraction process. For this purpose, enzymatic aqueous extraction method is selected, and the protease enzymes are added to degrade the cell wall of the plant seeds. Nevşehir origin unhulled pumpkin

seeds containing 46,43% lipids are used in the experiments. Commercial enzymes of Alcalase 2.5L were supplied Novozymes Co. used as protease.

Alcalase 2.5L is a serine protease enzyme obtained from *Bacillus licheniformis* microorganisms. It has a high proteolytic activity of 2,5 AU/g (Anson Units/gram). The optimum conditions for enzyme activity are at the temperature between 55-70°C and pH 4-8 interval depending upon the substrate type.

Enzymatic extraction experiments were carried with 0.6 to 1 mm grain fraction of seeds and 1:7 seed: buffer ratio. The experiments with the use of Alcalase 2.5L protease enzyme are conducted at interval of 40-70°C temperature, pH 4-8, 0,25-1,0 mL/g seed enzyme amount, 4-36 hours duration. Thus, the interval of the optimum conditions in respect to pH, enzyme amount, time and temperature for the enzyme of protease were determined.

By performed pre-experiments before the experimental design, it is intended to determine the interval of high oil yield in terms of pH, enzyme amount, time and temperature for protease enzymes. In preliminary experiments, it is seen that the pH parameter was found to have very little effect on yield and it has been decided not to select as a variable parameter in this study.

Aqueous enzymatic extraction conditions to maximize oil yield from pumpkin seeds were optimized using two statistical experimental designs; Plackett-Burman and Circumscribed Central Composite Cubic Design.

In the first part of the experimental design, it is made 16 experiments based on Plackett-Burman experimental design matrix with three variables (enzyme amount, duration, temperature), two levels (-1, +1) and two replicates. Selection of the low and high levels is performed according to experimental results in the first part of the study. These values are 0,5-1,0 mL/g seed enzyme amount, 18-30 hours, 45-55°C temperature, respectively. After entering the results of the experiments proposed by the Plackett-Burman design, the model equation was obtained according to the linear approximation. The equation coefficients and also the effects of the independent variables are obtained as 0.6537, 1.7625 and 0.6238, respectively. Thus, three critical factor -amount of enzyme, incubation temperature, incubation time- for oil extraction were pre-evaluated by the Plackett-Burman design using low and high levels of the three variables. High amount of enzyme, high incubation temperature and incubation time significantly influenced parameters.

According to these coefficient values, it was decided that the high-level values for the three parameters in Plackett-Burman must be selected as the center point (0) in the advanced stages of the central composite experimental design.

A central composite design (CCD) and response surface plots are used to optimize the proved significant factors and to obtain maximum oil yield. In the second part of the experimental design, it is made 34 experiments based on circumscribed centered composite cubic experimental design matrix with three variables (enzyme amount, time, temperature), five levels (-1.68, -1, 0, +1, +1.68) and two replicates. These levels of three parameters, respectively; 0,58 mL/g seed, 0,75 mL/g seed, 1 mL/g seed, 1,25 mL/g seed, 1,42 mL/g seed enzyme amount; 19,92 h, 24 h, 30 h, 36 h, 40,08 h time; 46,6°C, 50°C, 55°C, 60°C and 63,4°C temperature. After entering these experiments' results to the computer software, by using Response Surface Methodology, it was found that all of three parameters are effective for the aqueous enzymatic extraction process of oil from pumpkin seeds. According to the results the linear effect of temperature, the quadratic effect of temperature, the linear effect of enzyme amount, the linear effect of time and the quadratic effect of time were found

effective parameters, respectively. Interactions between parameters were not observed. In response surface plots, the basic (linear) effects of the response effect was seen more clearly.

The optimal amount of enzyme is 0.72 ml/g seed, time is 35.56 h and temperature is 49,7°C. Finally, one more experiment is done at the optimum point and the result was found very close to the value estimated from the model as 54,56%.

1. GİRİŞ

Yağlar, insan vücudu için gerekli olan enerjinin en önemli kaynaklarından biri olup, karbonhidratlar ve proteinler gibi insanların beslenmesinde önemli yer tutan temel besin maddeleri arasında yer almaktadır. Özellikle doymuş yağ oranlarının düşük olması, hücre yapısı için gerekli olan serbest yağ asitlerini içermesi ve insan vücudunda A, D, E, K gibi yağda eriyen vitaminleri çözmesi gibi özellikleriyle bitkisel yağlar, insan sağlığına katkıları ve yüksek besin değerine sahip olmaları bakımından ayrı bir yere sahiptir.

Ülkemizde bitkisel yağ üretiminde yaygın olarak kullanılan yağlı tohumlar ayçiçeği, mısır, zeytin, kanola, yerfıstığı, fındık, soya ve pamuktur. Bitkisel yağlara olan talebin hızla artması ve ulusal düzeyde bu talebin karşılanamamasından dolayı bitkisel yağ üretimi için alternatif yağlı tohum kaynaklarına yönelme ve tohumdaki yağın en etkin şekilde eldesi için alternatif yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Kabak çekirdeği tohumu, yaklaşık olarak % 40-60 yağ içeriğiyle ülkemizdeki ihtiyacı karşılayabilecek alternatif yağlı tohum kaynaklarından biridir.

Kabakgiller (*Cucurbitaceae*) familyasının Cucurbita cinsine dahil olan kabak bitkisi, sakızkabağı (*Cucurbita pepo*), helvacı kabağı (*Cucurbita maxima*) ve balbakabağı (*Cucurbita moschata*) çeşitlerine sahiptir. Ülkemizde yemeklik ve çerezlik kullanımı yaygın olan kabak bitkisi tohumlarından bitkisel yağ elde etmek amacıyla çoğunlukla Cucurbita pepo L. türüne ait olanlar kullanılır.

Dünyada kabak üretimi yıllık ortalama 25 milyon ton olup, üretimin en çok yapıldığı ülkeler sırasıyla Çin, Hindistan ve Rusya'dır. Türkiye, üretim miktarı bakımından 388.785 ton ile dünya ülkeleri arasında 12. sırada yer almaktadır. Ülkemizde çerezlik kabak yetiştiriciliğinin en çok yapıldığı iller, Kayseri, Nevşehir, Aksaray, Konya ve Edirne'dir.

Kabak çekirdeği, kuruyemiş olarak tüketiminin yanında, zengin yağ, protein, mineral madde ve aminoasit içeriği nedeniyle, insan sağlığı açısından ayrı bir öneme sahiptir. Kabak tohumlarının %35-40 oranında yağ, %37 oranında karbonhidrat, % 35-40 oranında protein içerdiği, ayrıca makro ve mikro elementlerden Ca, K, P, Mg, Fe, Zn

yönünden zengin olduğu bilinmektedir. Kabak çekirdeği yağı ise, gıdalarla mutlaka alınması gereken linoleik ve linolenik isimli iki çok önemli doymamış yağ asidini içermesi ve bunun dışında sahip olduğu yararlı bileşenlerle insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri sebebiyle bitkisel yağlar içerisinde önemli bir yere sahiptir. Özellikle vücut için temel yağ asitlerinden olan ω -3 ve ω -6 'nın önemli bir kaynağını oluşturur. Yağ bileşimi incelendiğinde, linoleik, oleik, palmitik ve stearik asit başta olmak üzere %73-80 oranında yüksek doymamış yağ asiti içeriğine sahiptir. Ayrıca içeriğindeki yüksek miktarda biyolojik antioksidan özellikli E vitamini (α -tokoferol) ile E vitaminince en zengin yağlardandır. Belirtilen özelliklerinden dolayı bu yağlar sadece gıda sektöründe değil aynı zamanda farmasötik ve kozmetik endüstrilerinde de potansiyel kullanım alanına sahiptir. Doymamış yağ asitlerindeki çift bağlar kolay tepkimeye girme eğiliminde olmaları, farmasötik amaçlı çok sayıda fonksiyonel ürünlerin geliştirilmesi açısından önemlidir.

Yağlı tohumlardan yağ eldesinde mekanik presleme, çözücü ekstraksiyonu ya da bunların birleştirildiği önpresleme-çözücü ekstraksiyonu tekniklerinden yararlanılmaktadır. Çözücü ekstraksiyonunda en yaygın kullanılan çözücü n-hekzandır. Genellikle hekzan kullanımı yüksek ekstraksiyon verimi sağlamakla birlikte düşük protein kalitesi ve rafinasyon için yüksek yatırım maliyeti ve enerji gereksinimine neden olmaktadır. Ayrıca hekzan, ekstraksiyon ve çözücü geri kazanım işlemleri sırasında atmosfere yayılma ve diğer kirleticilerle etkileşime girerek çevreye olumsuz olabilecek etkilere sahiptir. Bu gibi sebeplerden dolayı, yağlı tohumlardan yağ eldesinde alternatif olarak çevre dostu, güvenli işletme koşullarında, yenilebilir protein ve yüksek verimde kaliteli yağ eldesi sağlayan sulu ve enzim katkılı sulu ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir.

Sulu ekstraksiyon prosesinde yağ ekstraksiyon verimini arttırmak, yan ürünleri azaltmak ve daha hafif proses koşullarında ekstraksiyon için, bazı enzimler, ekstraksiyon işleminde ilave edilmiştir. Çözücü ekstraksiyonu yöntemiyle karşılaştırıldığında enzimatik proseste daha düşük sıcaklıkta daha yüksek kalitede yağ ve proteince zengin küspe eldesine imkan sağlamaktadır. Elde edilen yağın kalitesinin, özellikle renk ve serbest yağ asidi içeriği açısından da daha iyi olduğu saptanmıştır. Ancak bu prosesin bazı sınırlamaları vardır, başlıcaları; yağ ekstraksiyonunda düşük verim, demülsifikasyona neden olma, enzim maliyetleri ve sulu atık işlemleri. Birçok araştırmacı, yağlı tohum ve meyvelerden enzimatik sulu

ekstraksiyon yoluyla yağ ve farklı bileşenlerin eldesi amacıyla birçok çalışma yapılmış ve çözücü ekstraksiyonunda elde edilen verim değerlerine eş ya da yakın sonuçlar alınabilmektedir. Ancak, laboratuvar ölçeğinde araştırmalar ele alınarak ekstraksiyon ve ayırma aşamaları hakkında prosesin ticari olarak daha cazip hale getirebilmek için araştırmaların optimum koşulların sağlanması yönünde sürdürülmesi gereklidir.

Optimizasyon, fiziksel veya endüstriyel bir prosesin belirlenen sonuçlar doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin bir-birleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin sonuca olan etkileri de göz önünde bulundurularak bir araya getirilip uygulanması işlemidir. Bilgisayar yazılımlarında matematiğin, sayısal analizin ve mühendisliğin birarada uygulandığı bu tekniklerle, proses tasarımında bağımsız değişkenlerin sonuca olan katkısının en verimli hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Deney tasarımının en büyük avantajı, deneysel zaman kaybını, malzeme tüketimini ve endüstriyel çapta iş gücünü azaltarak zaman kaybını önemli ölçüde minimize etmesidir.

Bu çalışmada, endüstriyel olarak değerlendirmek amacıyla yüksek linoleik ve oleik asit içeren kabuksuz kabak çekirdeğinden geleneksel yağ elde yöntemlerine alternatif olarak enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesi ve yüksek verimle yağ eldesi için ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu hedeflenmiştir. Ekstraksiyon parametreleri olarak inkübasyon süresi, sıcaklığı ve ortama ilave edilen enzim miktarının seçildiği ön deneylerle yapılan çalışmalarda, tasarımda kullanılacak seviyelerin incelemesi yapılmıştır. Daha sonra Plackett-Burman deneysel tasarım yoluyla, ön optimizasyon yapılmış ve ileri deneysel tasarım noktaları daha hassas olarak belirlenmesi hedeflenmiştir. Son olarak, kabak çekirdeğinden enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde etkiye sahip olduğu düşünülen parametreler Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılarak ileri deneysel tasarımla optimize edilmiş ve yüksek ekstraksiyon verimi sağlayan koşullar bulunmuştur.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 Kabak Bitkisi ve Üretimi

Kabakgiller (*Cucurbitaceae*) kavun, karpuz, hıyar ve kabak gibi dünyada yetiştiriciliği yaygın olan sebzeleri içine alan önemli bir ailedir [1]. *Cucurbitaceae* familyası içinde 118 cins ve 825 tür bulunduğu bildirilmektedir [2]. Bu familyada yer alan *Cucurbita* cinsi bitkiler aleminde morfolojik olarak en çok çeşitlilik gösteren cinslerden biridir [3]. Bu familyadaki sebzelerin yetiştiriciliği, ekolojik koşulların uygunluğu nedeniyle Türkiye’de de yaygın olarak yapılır [1].

2.1.1 Kabak bitkisi ve özellikleri

Cucurbitaceae familyasına ait olan kabak bitkisi, meyvesi yenen sebzeler grubunda yer almaktadır. Meyveleri insan beslenmesinde, gıda ve kozmetik sanayinde, tohumları ise çerezlik olarak kullanılabilir [4,5]. *Cucurbita* cinsi içinde en fazla kültürü yapılan türler *Cucurbita pepo* L. (sakız kabağı), *Cucurbita maxima* Duch. (kestane kabağı) ve *Cucurbita moschata* Pour. (bal kabağı)’dur. Bu türlerin tohumları çerezlik olarak kullanılmakta birlikte en fazla yetiştiriciliği yapılan çerezlik kabak türü *Cucurbita pepo* L.’dur [6]. Ülkemizde yetiştirilmekte olan çekirdeklik kabak türleri Şekil 2.1’de görülmektedir [5].



Şekil 2.1 : Ülkemizde yetiştirilen çekirdeklik kabaklar.

Kabaklar yazlık, kışlık ve süs kabakları olarak sınıflandırılmaktadır. Yazlık kabaklar grubunda Sakız, Girit, Su ve Asma kabağı yer almaktadır. Çerezlik veya çekirdek kabakları genelde *Cucurbita pepo L.* botanik sınıfında yer alan yazlık kabak grubunda yer almaktadır. Kışlık kabaklar ise Bal, Kestane ve diğer iri kabaklardan oluşmaktadır. Süs kabakları dış ülkelerden ithal edilmiş olan Mis ve Parmak kabağı gibi çeşitlerdir. Bu sınıflandırmaya ek olarak kabaklar, botanik özellikleri göz önünde bulundurularak farklı şekillerde de sıralandırılmaktadır [7].

Ülkemizde yetiştirilmekte olan çerezlik tüketim amaçlı çekirdek kabakları, çoğunlukla *Cucurbita pepo L.* türünden olup, az miktarda da *Cucurbita moschata* türünden olan bal kabağı tohumları da kullanılmaktadır. Çekirdek kabaklarında meyve hasadı, tohumların irileşip olgunlaşması için tam olgunluk döneminde yapılmaktadır. Ülkemizde kabak hasat dönemi ağustos sonu ve eylül aylarıdır [5].

Günümüzde tüketilen kabakların çoğu Amerikan orijinli olduğu ve tohumlarının günümüzden 10.000 yıl önce Oaxaca (Meksika)'daki Guila Naquits yerlileri tarafından yetiştirildiği, hatta en eski bilinen mısır ve fasulye türlerinden 4000 yıl daha önce bu bölgede bulunduğu arkeolojik kazılarla tespit edilmiştir [8]. Meksika'nın yüksek yerleri ve Orta Amerika'nın kuzeyi *Cucurbita pepo L.*'nin anavatanı olarak bilinmektedir [9]. Kabak ilk kültüre alındığında zehirli ve acı meyveleri için değil, daha çok besleyici ve daha az acı olan tohumları için yetiştirilmiştir [10,11]. Geçmişte Amerikan yerli halkları arasında kabak çekirdeği hem tıbbi amaçlı hem de besin maddesi olarak yaygın şekilde kullanılmıştır. Güney Amerika'da kullanımının 14-16. yüzyıllarda Aztek Uygarlığı'na kadar uzandığı bilinmektedir [12]. Kabak, diğer ülkelere 16. yüzyılda deniz yoluyla taşınmış ve daha sonra önemli bir sebze türü haline gelmiştir [10]. Kabağın rönesans döneminde Avrupa'da bilindiği, botanikçiler tarafından tanımlandığı, bahçıvanlık kitaplarında anlatıldığı, hatta sanata konu olarak Roma'da bulunan Villa Farnesina'nın tavan ve duvarlarına 1515-1518 yılları arasında kabağa ait figürlerin yapıldığı belirlenmiştir [13,14]. Doğu Avrupa ve Akdeniz Bölgesi'nde (özellikle Yunanistan'da) aşçılık alanında, Hindistan ve Asya'nın farklı alanlarında ise tıbbi amaçlarla kullanıldığı anlatılır. Çekirdek kabağı tohumlarının ülkemize Yunanistan'dan geldiği, Trakya Bölgesi'nde üretiminin yaygınlaştığı ve bu yörede çerezlik kabak yetiştiriciliğinin yaklaşık 30-35 sene öncesine dayandığı tahmin edilmektedir [12].

Çerezlik ve sanayide kullanılan kabaklar, kabukluluk durumuna göre kabuklu, zar gibi ince kabuklu ve kabuksuz olarak 3 gruba ayrılmaktadır. *C. pepo L.* türü, normalde sert ve kalın bir tohum yapısı gösterirken, *Cucurbita pepo styriaca* türüne ait kabuksuz kabak çekirdeği tohumları bunun mutant bir formu olup odunlaşmamış yapı gösterir. Bu durum 1880'lerde Avusturya-Macaristan bölgesinde kabuklu kabak çekirdeği türünde oluşan bir mutasyonla meydana gelmiştir [15]. Ülkemizde kabak çekirdeği denilince akla çekirdekleri kabuklu olan kabaklar gelmektedir. Çekirdek kabakları meyve şekli ve renkleri yönünden farklılık göstermektedir. Çerez olarak kullanımı yaygındır [16]. 1977 yılında kabuksuz tohuma sahip kabaklar üzerinde yapılan genetik ve yetiştirme çalışmaları sonucunda çerezlik çekirdek endüstrisini destekleyici bir yüksek tohumlu ürün ırkı geliştirme teşebbüslerine başlanmıştır [17]. Kabuksuz kabak çekirdeği tohumları çerez olarak kullanıldığı gibi, sanayide yağ elde etmede, ekmek ve pasta sanayi ile ilaç endüstrisinde (bağırsak parazitlerine karşı) kullanılmaktadır. Yağı, salatalarda ve sebze yağı olarak tüketilebilmektedir. Yağı koyu yeşil renkte olduğu için, yemeklerde kullanımı yaygın değildir. Tohumları protein, yağ, E vitamini yönünden zengindir. Bu gruba giren kabakların meyveleri turuncu, koyu yeşil, sarı çizgili, çekirdekleri kabuksuz veya zar gibi kabukludur. İç koyu yeşil renklidir. Kabuklu ve kabuksuz tohumların ara formu olan zar gibi ince kabuklu tohumların ise kullanımı yaygın değildir [16]. Ülkemizde daha çok kabuklu tipler çerezlik olarak kullanılmakta ise de, sanayide kabuksuz tipler tercih edilmektedir [5].

2.1.2 Dünya'da ve Türkiye'de kabak üretimi

Dünyada ve ülkemizde değişik amaçlarla üretilen ve çeşitli türleri olan kabakta, 2013 yılı verilerine göre, dünya ekim alanı yaklaşık 1.8 milyon ha, üretim ise yaklaşık 25 milyon tondur [18]. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Birliği'nden alınan bilgilere göre 2007-2013 yılları arasında en fazla üretimin olduğu ülkelere ait kabak üretim miktarları Çizelge 2.1'de verilmiştir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Birliği'nin verilerinde sadece çerezlik kabak üretim değerlerini içeren istatistiksel bir değerlendirme mevcut olmayıp, farklı türde kabakları da içeren üretim değerleri birlikte sunulmaktadır. Buna göre, dünyada kabak üretim değerleri yıl bazında ülkelere göre değişen bir seyir gösterse de toplam üretim değerleri yönüyle artış göstermektedir.

Dünyada kabak üretiminin en çok yapıldığı ülkeler sırasıyla Çin, Hindistan ve Rusya'dır. Çin, yaklaşık 7 milyon tonluk üretimiyle toplam üretimin % 30'una yakınına gerçekleştirir. Türkiye, üretim miktarı bakımından 388.785 ton kabak üretimi ile Çin, Hindistan, Rusya, İran, Amerika Birleşik Devletleri, Ukrayna, Meksika, Mısır, İspanya, İtalya ve Küba'dan sonra 12. sırada yer almaktadır [18].

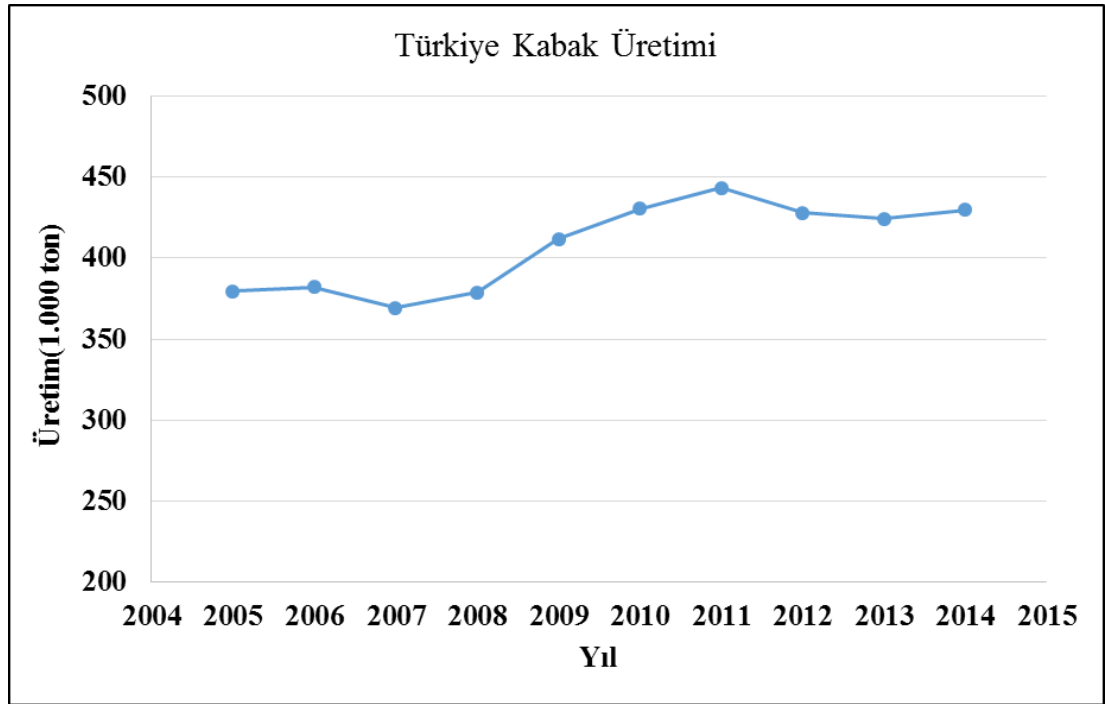
Çizelge 2.1 : Ülkelerin yıllara göre kabak üretim miktarları (1.000 ton) [18].

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Çin	6.250	6.300	6.450	6.665	6.905	7.000	7.100
Hindistan	3.905	4.071	4.023	4.456	4.696	4.900	4.900
Rusya	1.030	954	1.123	989	1.176	1.081	1.128
İran	707	591	675	733	951	965	897
Amerika	804	787	750	793	814	895	797
Ukrayna	525	533	560	517	627	588	611
Meksika	517	486	577	522	525	565	545
Mısır	725	652	625	658	634	560	543
İspanya	374	290	310	367	393	514	533
İtalya	532	519	509	508	539	520	530
Küba	456	422	413	347	340	361	412
Türkiye	338	379	412	430	411	396	389
Bangladeş	275	316	340	352	354	349	375

Ülkemizde kabak çekirdekleri uzun yıllardır çerez olarak kullanılmalarına rağmen, besin değeri ve sağlık açısından öneminin anlaşılmasıyla, tüketimi gün geçtikçe arttığından üretim alanı ve miktarında da son yıllarda önemli artışlar meydana gelmiştir. İstatistiki verilere göre Türkiye'nin toplam sebze üretimi 24 milyon ton civarında olup, bunun 8 milyon ton kadarını kabakgiller (balkabağı, kabak(sakız), kabak(çerezlik), hıyar, kavun, karpuz vs.) oluşturmaktadır [19]. Kabakgiller bu üretim miktarı ile Türkiye sebze üretiminin % 33'ünü oluşturmaktadır. Kabak çekirdeği üretimi ulusal istatistiklerimize 2004 yılından itibaren girmiştir. 2005-2014 yılları arasında sakız, çerezlik ve balkabağı türlerinin üretim miktarları Çizelge 2.2'de verilmiştir. Şekil 2.2'de de görüldüğü üzere toplam üretim, yıllar içinde artış göstererek 2005 yılında 379.500 tondan, 2014 yılında 429.861 tona yükselmiştir. Aynı dönem verilerinde çerezlik kabak üretiminde de benzer şekilde artış görülmektedir.

Çizelge 2.2 : Türkiye'nin yıllara göre bazı tür kabak üretim miktarları [19].

Yıllar	Kabak (Sakız)	Balkabağı	Kabak (Çerezlik)	Toplam
2005	294.000	74.000	11.500	379.500
2006	288.336	76.632	17.286	382.254
2007	267.142	70.740	31.262	369.144
2008	279.451	80.915	18.340	378.706
2009	307.419	82.552	21.971	411.942
2010	314.340	89.368	26.694	430.402
2011	317.705	93.099	32.396	443.200
2012	302.374	93.612	32.144	428.130
2013	293.709	95.076	35.586	424.371
2014	299.858	93.672	36.331	429.861



Şekil 2.2 : Yıllara göre Türkiye kabak üretim değerleri [19].

Bu tür kabakların ülkemizde ekim alanı ve üretim değerleri Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3 : Türkiye’de ekilen bazı kabak türleri, ekili alan ve üretim değerleri [19].

Ürün adı	Ekilen Alan(da)	Üretim(Ton)
Kabak (Sakız)	92.242	299.858
Balkabağı	40.816	93.672
Kabak (Çerezlik)	552.648	36.331
Toplam	685.706	429.861

Buna göre ekili alan içerisinde en büyük pay, çerezlik kabak için ayrılmıştır. Bunun başlıca sebebi, çerezlik kabak yetiştiriciliğinin yemeklik kabak tarımına göre bazı avantajlarının olmasıdır. Bunlar; sulamanın sık yapılmasına gerek olmaması veya tamamen kıraç koşullarda da çerezlik kabak tarımının yapılabilmesi, ekim nöbeti için uygun bir tür olabilmesi, hasat kolaylığı, kültürel işlemlerin büyük oranda makine ile yapılabilmesi, hastalık ve zararlılar açısından fazla sıkıntıya yol açmaması gibi nedenler sayılabilir. Özellikle iç bölgelerimizde yemeklik kabak yetiştiriciliğinin ekonomik olmaması, çerezlik kabakta depolama ve pazarlamada sıkıntıyla karşılaşılması, kıraç koşullarda da çerezlik kabak tarımının yaygınlaşmasının ana nedenleri arasındadır [20].

Türkiye çerezlik kabak yetiştiriciliğine dair bölgelere ait veriler Çizelge 2.4’te verilmiştir. Buna göre üretimin, yaygın olarak Orta Anadolu’da gerçekleştiği, Batı Anadolu ve Doğu Marmara’yı da kapsayacak şekilde ülke coğrafyasına dağıldığı gözlenmektedir.

Çizelge 2.4 : Bölgelere göre çerezlik kabak üretimi [19].

BÖLGE	Ekilen Alan(Dekar)	Üretim(Ton)
Kuzeydoğu Anadolu	260	29
Ortadoğu Anadolu	17	2
Güneydoğu Anadolu	10	-
Batı Marmara	10.917	952
Ege	2.457	295
Doğu Marmara	23.653	2.504
Batı Anadolu	28.682	3.192
Akdeniz	220	40
Orta Anadolu	485.932	29.269
Batı Karadeniz	500	48
	552.648	36.331

Ülkemizde çerezlik kabak yetiştiriciliğinin en çok yapıldığı illerle ekim alanları ve üretim miktarları Çizelge 2.5’te verilmiştir. Buna göre, ülkemizde gerçekleştirilen çerezlik kabak üretiminin büyük bir bölümü 13.761 ton ile Kayseri ve 11.810 ton ile Nevşehir illerinde gerçekleştirilmektedir. Bu illeri 3.216 ton ile Aksaray, 1.642 ton ile Konya ve 1.175 ton ile Eskişehir illeri izlemektedir. Kayseri, yaklaşık 14.000 tonluk üretimiyle toplam üretimin % 38’ine yakınıni gerçekleştirir.

Çizelge 2.5 : Türkiye’de başlıca çerezlik kabak yetiştiren iller, ekili alan ve üretim değerleri [19].

İller	Ekili Alan (da)	Üretim (ton)
Kayseri	246.557	13.761
Nevşehir	160.614	11.810
Aksaray	38.870	3.216
Konya	12.965	1.642
Eskişehir	11.300	1.175

2.2 Kabak Çekirdeği ve Yağı Hakkında Bilgi

2.2.1 Kabak çekirdeğinin karakteristik özellikleri

Kabak çekirdeği tohumları birçok mineral, vitamin ve antioksidanı bünyesinde bulunduran önemli bir besin kaynağıdır. Günümüzde yapılan araştırmalarda kabak

çekirdeğinin doymamış yağ asitleri (% 35-47), protein (% 33-36), karbonhidrat (% 37) yönünden zengin olduğu kadar, mineral maddeler (Ca, K, P, Mg, Fe ve Zn) ve özellikle E vitamini yönünden zengin olduğu ortaya çıkarılmıştır [12,21,22]. Ayrıca B vitaminleri yönünden zengin olup, riboflavin, tiamin ve niacin içermektedir [23]. Kabak çekirdeğinin türüne ve yetiştirildiği coğrafyaya bağlı olarak yağ içeriği %35-50, protein içeriği %25-40, karbonhidrat içeriği %25, kül miktarı %5 ve ham lif miktarı %2 civarındadır [24, 25, 26]. Çizelge 2.6'da kabak çekirdeğinin bileşimi gösterilmiştir. Kül içinde % 0.03 potasyum, % 0.02 kalsiyum, % 0.1 magnezyum, % 0.01 fosfor bulunmaktadır. Yağ oranı meyvede oldukça azdır ve % 0.4 - 1 civarındadır [27].

Çizelge 2.6 : Kabak çekirdeği küspesinin bileşimi.

Bileşim	Ortalama Değer (%)
Su	5,0-6,0
Protein	25,0-40,0
Yağ	35,0-50,0
Karbonhidrat	25,0
Ham lifler	2,0
Kül	5,0

Kabak meyvelerinden tohumu çıkarılınca geriye kalan kabuk yaklaşık %2,7 mineraller, %1 ham yağ, %38 selüloz ve ham lif, %4,3 protein, %53 lignin ve karbonhidrat içermektedir [28]. 100 g yenilebilir kabak çekirdeğinde (610 kkal) enerji, (10 g) karbonhidrat,(30 g) protein, (50 g) yağ içerir [29].

Kabaklarda bol miktarda A, B ve C vitamini bulunur. Nitekim 100 gr kabakta 1000 - 16000 I.Ü. A vitamini, 0.16 - 0.18 mg B1, 0.2- 0.3 mg B2, 2.0 - 5.0 mg Niacin, 28 - 75 mg C vitamini vardır [27].

Çizelge 2.7'de kabak çekirdeğinin mineral madde içerikleri incelendiğinde kabak çekirdeğinin günlük 50-100 g tüketilmesinin vücudun mineral madde ihtiyacını karşılamada etkili olabileceği anlaşılmaktadır.

Çizelge 2.7 : Kabak çekirdeğinin mineral madde bileşimi [21].

Mineral madde	Ortalama Değer (g/100 g)
Fosfor	0,8-1,3
Potasyum	0,5-1
Magnezyum	0,5-0,6
Çinko	0,005-0,009
Demir	0,006-0,01

Kabak çekirdeği, içerdiği besin öğeleri bakımından Mg, Mn ve P için çok iyi; Fe, Cu, protein, tekli doymamış yağ ve çinko açısından ise iyi bir kaynaktır.

2.2.2 Kabak çekirdeği yağının karakteristik özellikleri

Kabak çekirdeklerinden çıkarılan yağın bileşimi incelendiğinde doymamış yağ asitlerinden Oleik ve Linoleik asit açısından zenginken, doymamış yağ asitlerinin (Palmitik ve Sitrik asit) daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Bitkisel veya hayvansal ürünlerden elde edilen yağın kalitesinin iyi olduğundan söz edilebilmesi için Linoleik asit ve E vitaminin (tokoferol) yüksek olması gerekmektedir. 100 g yağ kabak çekirdeğindeki E vitamini miktarı 3,8-4,5 mg civarındadır [21].

Doğal ve sağlıklı olan kabak çekirdeği yağı, kabak tohumlarından üretilir. Yeşilimsi kahverengi renkli, vitaminler ve özellikle E vitamini yönünden zengindir. Tekli ve çoklu doymamış yağ oranı yüksek, doymuş yağ oranı ise düşüktür [30]. Kabak çekirdeği yağı yenilebilir yağlardandır; güçlü karakteristik bir tadı ve kendine özgü kokusu vardır. Zengin yağ asitleri içeriği ve insan organizmasına yararlı çeşitli küçük bileşenlere sahip olmasından dolayı yüksek besin değerli yağ grubuna girer. Uzun raf ömrüne sahip, hızlı yağ bozunmaları olmayan ve yüksek oksidatif stabilitesi bulunan endüstriyel alanda ve insan beslenmesinde etkin biçimde kullanılabilecek bir üründür. Kabak çekirdeği yağının bazı karakteristik özellikleri Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8 : Kabak (*Cucurbita pepo* ve *Cucurbita maxima*) tohumlarından elde edilen ham yağların fizikokimyasal özellikleri [31].

Özellik	Değerler
Renk	Yeşilimsi kahverengi
Oda sıcaklığındaki durumu	Sıvı
Yoğunluk (25°C)	0,9182 ± 0,0018 g/cm ³
Kırılma indeksi (40°C)	1,4660 ± 0,0017
Dinamik viskozite (21°C)	72± 0,58 mPa.s
Asit değeri	0,78 ± 0,02 mg KOH/g
Serbest yağ asidi (Oleik asit)	%0,97 ±0,075
Peroksit değeri	9,20 ± 0,59 meq O ₂ /kg oil
İyot miktarı	107 ± 0,58 g I ₂ /100 g
Sabunlaşma değeri	201 ± 3,72 mg KOH/g
Sabunlaşmayan madde	%1,22 ± 0,12

Kabak tohumlarındaki yağ oranı %40-60 arasında değişmektedir. Bu yağın %98-99'unu yağ asitleri oluşturur. Baskın yağ asitleri; doymamış yağ asitlerinden Linoleik asit ve Oleik asit, doymuş yağ asitlerinden Palmitik asit ve Stearik asittir. Yağ asiti bileşimi bitkinin yetiştiği bölge, varyete, iklim, olgunluk durumu gibi çeşitli faktörlere göre değişmektedir [32]. Kabak çekirdeği yağının değişik bileşenlerde yağ asitleri vardır. Bunlar Çizelge 2.9'da ayrıntılı olarak gösterilmektedir.

Çizelge 2.9 : Kabak çekirdeği yağının yağ asitleri kompozisyonu [31].

Yağ Asidi	Değerler
Miristik asit (C14:0)	%0,09-0,27
Palmitik asit (C16:0)	%12,6-18,4
Palmitoleik asit (C16:1)	%0,12-0,52
Stearik asit (C18:0)	%5,1-8,5
Oleik asit (C18:1)	%17,0-39,5
Linoleik asit (C18:2)	%18,1-62,8
Linolenik asit (C18:3)	%0,34-0,82
Araşidik asit (C20:0)	%0,26-1,12
Gadoleik asit (C20:1)	%0-0,17
Behenik asit (C22:0)	%0,12-0,58

Kabak çekirdeği yağı % 78'e kadar doymamış yağ asitleri içermektedir. Doymamış yağ asitlerinin de % 40-57'si linoleik asitten oluşmaktadır. Yağda bulunan linoleik asitte vitamin E'nin en önemli kaynağıdır [33].

Omega-3 (w-3) ve omega-6 (w-6) yağ asitleri insan vücudu tarafından sentezlenemeyen ve dışardan alınması gereken yağ asitleridir. Esansiyel yağ asitleri denilen bu bileşikler vucut metabolizmasında sağlık açısından çok önemli fonksiyonları vardır. Omega-3 yağ asitlerinin kaynağını alfa-linolenik asit (ALA) oluşturur. Buna karşılık omega-6 yağ asitleri kaynağını linoleik asitten (LA) alır. Omega-3 yağ asitlerinin kaynağını balık, kabak çekirdeği, keten tohumu ve ceviz oluştururken, omega-6 yağ asitlerinin kaynağını mısırözü yağı, ayçiçeği yağı, pamuk ve soya yağı oluşturmaktadır [34].

2.2.3 Kabak çekirdeği ve yağının kullanım alanları ve sağlık üzerine etkileri

Kabuksuz çekirdek kabağı, Balkan, Ortadoğu ve Orta Avrupa ülkelerinde daha çok çerezlik olarak üretilmektedir. Amerika'da yüksek kaliteli bitkisel yağ kaynağı olarak, çerezlik olarak ve sandviç sosu yapımında potansiyel bir besin olarak kullanılmaktadır. Yüksek protein ve enerji kaynağı olmasından dolayı Slovenya, Avusturya ve Macaristan gibi gelişmekte olan ülkelerde konsantre besin kaynağı

olarak tüketimi oldukça yaygındır [17]. Bu ülkelerde ayrıca kabak çekirdeği yağı, nitelikli bir salata yağı olarak yüksek fiyatlarla satılmaktadır. Türkiye’de çekirdek kabağı üretimi fazladır ve yurt dışına çerez ve yağ sanayinde kullanılmak üzere ihracatı yapılır.

Kabak çekirdeği proteininin biyolojik değeri yüksek olduğu için başta ekmek, salam, sosis olmak üzere pek çok gıda ürünlerine katkı maddesi olarak değerlendirilmektedir. Çerezlik kabak çekirdeklerinde kalite unsurları lezzet ile temel beslenme unsurları olan yağ ve protein özellikleri de önemlidir [35].

Kabak çekirdeği bir sanayi hammaddesidir. Yağının yanında çekirdekleri ekmek, pasta sos, şekerleme olarak gıda endüstrisinde, ilaç, kozmetik endüstrisinde, hayvan beslenmesinde kullanılabildiği gibi tohumları süs eşyası olarak da değerlendirilebilmektedir. Ülkemizde kabuksuz ve kabuklu kabak çekirdeklerinden yağ çıkarılmaktadır. Ancak miktarı konusunda veri bulunmamaktadır. Aynı şekilde kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanılan miktarlarla ilgili bir bilgi bulunmamaktadır [16].

Kabak tohumları ayrıca çorba ve türlü başta olmak üzere diğer yemeklerde tat verici çeşni olarak kullanılmaktadır [36, 37]. Kabak tohumu mayonez, Fransız sosu ve margarin yapımında da kullanım alanı bulmaktadır [38].

Öğütülmüş veya kabuksuz kabak tohumları ekmek yapımında [39] ve ayrıca yağı çıkarıldıktan sonra küspe olarak hayvan beslenmesinde kullanım alanı bulmaktadır [40]. Kabak tohumu yağı ise daha çok Avusturya, Macaristan ve Slovenya’da salatalarda kullanılmaktadır [41]. Son zamanlarda kozmetik sanayinde de kullanılan kabak çekirdeği yağı, içerdiği E vitamini ve diğer mineral maddeler ile cilt problemlerine iyi gelmektedir. Kabak çekirdeği yağı ayrıca mum yapımında da kullanım alanı bulmaktadır.

Kabak çekirdeklerinde sadece zeytin ve kılıç balığında bulunan kolesterol düşürücü bir hidrakerbon olan Squalene’in kabak çekirdeklerinde de bulunduğu bildirilmektedir [21].

Kabak tohumlarının sahip olduğu protein kolayca hazmedilebilmekte ve aminoasit dengesinin iyi olmasından dolayı 2-5 yaş arasındaki çocukların beslenmesinde kullanılabilmektedir. Zengin bir yağ kaynağı olması nedeniyle kabak tohumlarından

elde edilen yağ, gıda sanayinin yanında ilaç ve kozmetik sanayinde de kullanılmaktadır [42].

Kabak çekirdeği, kuruyemiş olarak tüketiminin yanı sıra, sahip olduğu yağ, protein, mineral maddeler ve aminoasitler yönünden de zengin olup, insan sağlığı açısından ayrı bir öneme sahiptir. Halk arasında barsak parazitini gidermede etkili olduğu bilinen kabak tohumlarının %35-40 oranında yağ, %37 oranında karbonhidrat, %35-40 oranında protein içerdiği, ayrıca Ca, K, P, Mg, Fe ve Zn yönünden de zengin olduğu bilinmektedir. Kabak tohumları B vitaminleri yönünden zengin olup, ayrıca da riboflavin, tiamin ve niacin içermektedir [23]. Kavrulmuş kabak çekirdekleri, salata, çorba ve çeşitli et yemeklerine lezzet arttırıcı olarak katılmakta ve sos yapımında da kullanılmaktadır.

Kabağın hazminin kolay olduğu ve bu bakımdan mide rahatsızlığı olanlara önerildiği; ayrıca böbrek taşı ve kum düşürmede kullanıldığı, lapa halinde kulak ağrısına iyi geldiği içerdikleri “piperazin” maddesi nedeniyle bağırsak parazitlerine karşı öldürücü özelliği bulunduğu; bağırsaklardaki kıl kurdu ve tenyanın düşürülmesinde, eskiden kabak çekirdekleri kullanıldığı bildirilmektedir [27]. Ayrıca ABD’nde Buffalo Devlet Üniversitesi’nde yapılan bir çalışmada kabaktaki fitosterollerin, prostat kanseri hücrelerinin gelişmesini engellediğinin gözlemlendiği de bildirilmiştir [43]. İdrar yolları ve idrar kesesi şikayetlerine pozitif etkisi kanıtlanan kabuksuz kabak çekirdeğinin kolesterol düşürücü olduğu da tıp literatürüne girmiştir.

Kabak çekirdeği, bünyesinde bol miktarda lif barındırmaktadır. Lifli besinlerin kan şekerinin daha dengeli yükselmesini sağladığı, kabızlık ve bazı kanser türlerinin önlenmesinde yararlı olduğu saptanmıştır. Kabak çekirdeği içerisinde yüksek oranda bulunan K vitamini kanın pıhtılaşması için gerekli olan protrombinin yapımında görevlidir. Ayrıca K vitamini osteoporoz ve damar sertliği (ateroskleroz) tedavisinde kullanılmaktadır [44]. Kabak çekirdeğinde önemli miktarda bulunan potasyum, vücut için hayati olan minerallerden birisidir. Hücre içi ve dışındaki sıvı ve mineral dengesine yardım eder. Kan basıncının düzenlenmesini sağlar. Sinir iletiminin ve uyarılarının iletimine yardım eder, kasların kasılmasında görev alır. Kabak çekirdeğinde bulunan çinkonun osteoporoz hastalığının tedavisinde kullanıldığı, selenyumun ise prostat ve akciğer kanseri riskini düşürdüğü belirtilmektedir [45].

Kabak çekirdeği uzun yıllardan beri Kuzey Amerika ve Meksika'da bağırsak kurtlarını düşürmede, kalp hastalıklarının tedavisinde ve yanıkların giderilmesinde geleneksel olarak kullanılmaktadır [46]. Kabak çekirdeğinin mesane taşıını düşürmede etkili olduğu saptanmıştır [47]. Kabak tohumlarında yüksek oranda bulunan fenolikler kandaki şeker miktarını azaltarak şeker hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [48].

Kabak tohumlarında bulunan E vitamini, kalp krizi riskini yüzde 40 oranında azaltmaktadır. E vitaminin bunun dışında, aspirin gibi kanı sulandırıcı etkisi olup, kanın pıhtılaşmasını önlediği, damar sertliği ve tıkanıklığını giderdiği bilinmektedir. E vitamini güçlü bir antioksidan olarak kanser, katarakt oluşumunu ve bağışıklık sisteminin yaşlanmasını önlemektedir [49]. Ayrıca, serbest radikal yakalayıcı özelliğinden dolayı antioksidan olarak deriyi UV ışığının hasarlarına karşı korumaktadır. Aynı zamanda antienflamatuar etkiye sahip olup, derinin nemini artırmakta, kırışıklıkları azaltarak yaşlanmayı geciktirmektedir [50].

Cucurbitaceae türlerinin tohumlarının besleyici değerini araştırmak üzere Kamerunda değişik iklim özelliklerine sahip alanlarda yapılan çalışmalarda; tohumların besin değerlerinin iklim farklılıklarından etkilenmediği belirlenmiştir. *Cucurbitaceae* tohumlarının % 28-40 arasında protein içerdiği, diğer yağlı tohumlar gibi yüksek oranda lipid seviyesine sahip olduğu bundan dolayı protein ve yağ kaynağı olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir [51].

100 g yenilebilir kabak çekirdeğinde (610 kkal) enerji, (10 g) karbonhidrat, (30 g) protein, (50 g) yağ içerir ve günlük olarak önerilen miktarlarda tüketilmelidir. 8,8 g toplam posada 1,8 g suda çözünür posa ve 7,0 g suda çözünemeyen posa bulundurarak tokluk hissi oluşturur ve diyet ürünlerinin bileşeninde bulunur. Çözünür posa içeriğinden dolayı kan şekerini düzenleyip kolesterol seviyesini düşürür ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu özellik sağlar [29].

2.3 Bitkisel Yağ Eldesi

Endüstride yağlı tohumlardan veya diğer bitkisel tohum/çekirdeklerden yağ elde edilmesinde, ön işlemleri takiben, genellikle soğuk presleme ve/veya çözücü ekstraksiyonu yöntemleri kullanılır. Alternatif ekstraksiyon yöntemleri olarak süperkritik akışkan ile ekstraksiyon ve sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemleri

üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Aşağıdaki bölümlerde bu yöntemler hakkında detaylı bilgi verilmiştir.

2.3.1 Ön işlemler

Hammaddenin Temizlenmesi: Yağlı tohum dışındaki her türlü tohum, sap, taş, toprak ve metal gibi maddeler yabancı maddeler, makinelere zarar verilmemesi için, mutlaka temizlenmelidir. Elekler, triyörler, pnömatik (havalı) ayırıcılar, mıknatıs sistemi, linterleme makinaları (pamuk tohumunu liflerinden ayırmada), fırçalama makinaları yağlı tohumların temizlenmesinde kullanılan başlıca sistemlerdir [52]. Elekler: irilik esasına göre; triyörler: şekil farkına göre; pnömatik ayırıcılar: yoğunluk farkına göre; mıknatıs sistemi: metal parçalarını mıknatıslık özelliğine göre ayırma işlemlerinde kullanılır.

Kurutma: Nemli çekirdekler daha düşük ekstraksiyon verimi vermekle birlikte ekipmana zarar da verebilirler. Nem ayrıca, çekirdekte küf sporları bulunduğu için küflenmeye de zemin hazırlar. Genel bir kural olarak çekirdeklerin tohumlar depolama ve ekstraksiyon işlemleri sırasında ortalama 10% seviyelerinden daha fazla nem içermemelidir [53].

Yağlı tohumların nemlendirilmesi: Yağlı tohumlarda kabuk kırma ve ayırma, pulcuklandırma, kavurma gibi işlemlerin daha kolay uygulanabilmesi için tohumun nem oranının % 16-18 olması gerekmektedir. Bu nedenle yağlı tohumların istenen nem derecesine getirilebilmeleri için aşağıda belirtildiği şekilde nemlendirilmeleri gerekmektedir [54].

* Tohuma verilen su, homojen bir dağılım saplamak için püskürtme şeklinde verilmelidir.

* Tohumun suyla temas süresi mümkün olduğunca uzun tutulmalıdır. Eğer yığında zedelenmiş tohum miktarı yüksek değilse bu süre 3 - 4 gün olabilir.

* Nemlendirmeden sonra tohumun yüzeyinde su kalmamalıdır.

* Nemlendirilmiş tohumlar çabuk bozulacağı için hemen yağa işlenmelidir.

Kabuk Kırma ve Ayırma: Yağlı tohumlardan kabukların uzaklaştırılması kırma ve ayırma olmak üzere iki kademedede yapılan bir işlemdir. Bu işlemin en temel amacı, elde edilecek yağda kalite ve kantite kaybını önlemektir. Kabuklar, özellikle dış yüzeyleri iç dane ile temas ederse, iç taneden kabuğa yağın migrasyonu söz

konusudur. Yaklaşık kabuklarda %1 yağ bulunur. Tonlarca tohumun işlendiği ve çeşide göre tohumlardaki kabuğun %20-40 arasında değiştiği düşünülürse bu yolla yağ kaybı hiç de küçümsenemeyecek miktarlardadır [55].

Yağlı tohumlarda kabuk ayırmayı gerektiren bir başka neden ise, kabukların yağda çözünme niteliği gösteren ve yağın görünüş, renk, tat ve kokusunu bozan maddeler içermesi ve kabukların kırılıp uzaklaştırılmaması halinde bu maddelerin yağa geçerek kalitesini düşürdüğü gibi, ham yağın rafinasyonunu da zorlaştırmasıdır. Bunun dışında kabukların uzaklaştırılması küspe kalitesi için de önemlidir.

Öğütme: Yağlı tohumlarda yağ zerrecikleri hücre sitoplazması içinde olduğundan, bunları dışarı almak için tohum içinin mümkün oldukça küçük parçalara inceltilmesi, ezilmesi gerekmektedir. Bunun için genellikle dişli valsler kullanılır. Eğer yağlı tohumlarda yağ, ekstraksiyon yöntemi ile alınacaksa yağlı tohumlar pulcuklar haline getirilir. Bu mekanik proses ile boyut küçültülmesi de yapılır ve partiküllerin yüzey alanı genişletilmiş olunur. Oluşan yeni şekil ve yüzey alanı yağ çıkışı için kütle transferi için yolun kısalmasını sağlar. Özellikle çözücü ekstraksiyonunda çözücünün içe difüzyonu kolaylaşmakta ve ekstraksiyon hızını arttırmaktadır [55].

Tohumların kavrulması: Yağlı tohum ve meyvelerde hücre içindeki yağ moleküllerini hücre dışına almak ve akıcı bir hale getirebilmek için, ezilmiş veya parçalanmış tohumların kavrulması gerekir. Kavurma işlemi ile hücre duvarında yeralan proteinler denatüre olur ve hücre içindeki yağ moleküllerinin dışarıya çıkması kolaylaşır. Ayrıca sıcaklık etkisiyle yağ molekülleri kümecikler ve zerrecikler haline gelerek(koagüle edilerek) kolayca hücre dışına çıkar. Sıcaklıkla yağın vizkositesi azalır ve akışı kolaylaşır. Yağlı tohumdaki su uzaklaştığından çözücü yağı kolayca çözebilir. Yağlı tohumdaki lipaz enzimi sıcaklıkla etkisini yitirir, yağın parçalanması da önlenir. Bunların dışında fosfatid ve benzeri maddeler sıcaklığın etkisiyle çözücüde çözünmez hale geçer. Küfler ve bakteriler kavurma işlemi ile öldürülür. [56].

Kavurma işlemi ile tohumdaki su oranı % 7-8'den % 4-4,5'e düşürülür. Kavurma işlemi küçük işletmelerde doğrudan ateşle ısıtılan tek katlı tavalarda, büyük ve modern işletmelerde ise 4-5 katlı tavalarda yapılmaktadır. Tavalara alınan tohum önce 15-20 dakika ısıtılır ve üzerine su buharı veya sıcak su püskürtülüp nemi % 16-18'e çıkartılır. Tohum sıcaklığı 80-90 °C' ye çıkartılarak kavurma işlemine geçilir.

20-30 dakika kavrulan tohumun proteinleri koagüle edilmiştir. Daha sonra 110-115 °C sıcaklıkta nem oranı % 4-4,5'e düşürülür, pres veya ekstraktöre sevk edilir [55].

2.3.2 Soğuk/Mekanik presleme

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

Presleme için önce çekirdek içleri ezmek, öğütmek veya silindirler arasından geçirmek suretiyle preslemeye en uygun lapa haline getirilirler ve kurutulurlar. Kurutma işlemi özel kurutucularda buharla ısıtarak yapılır. Nem derecesi nadir hallerde yüzde 20 kadar yüksek bir değerde tutulsa da genellikle yüzde 3-5 arasında bırakılır. Isıl işlemi uygulanıp uygulanmadığına göre sıcak veya soğuk presleme uygulanır. Soğuk presleme yönteminde ezilmiş madde doğrudan doğruya basılır ki bu şekilde en iyi kalitede zeytin yağı ve hint yağı elde edilir. Fakat genellikle uygulanan sıcak presleme yöntemidir. Bunun için ısıtılmış madde prese gönderilir. Presler açık sandık veya kapalı kafes tipindedir. Kapalı kafes tipi sonsuz vida şeklindeki presleme makineleri (ekspeller) bulunmadan önce daha çok sandık pres makineleri kullanılıyordu. Bunlar, düşey makineleri olup bir dizi yatay delikli 1 evhaları içerirler. Isı işlemine bağlı tutulmuş ezilmiş madde kıl torbalar içerisinde olarak önce ılımlı basınçla kalıp haline getirildikten sonra makineye yerleştirilir. 150-300 atmosfer basınç altında yağ torbadan dışarıya sızdırılır. Ham yağ, makinenin yanlarından dipteki tekneye akar ve buradan, süzmeden önce durulma tankında toplanır. Burada yağ uzun zaman bırakılmakla berraklaştırılır, bu sırada türlü eşlik maddeleri çöker, veya basınçlı süzgeçten geçirilir.

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

Ekspeller presi bir kafes basınç makinesidir, kapalı tip veya sürekli tipte olabilir. Çok yerde ekspeller hidrolik preslerin yerini almıştır. Ekspeller temel olarak bir silindirik

gövde içinde, sonsuz bir vida biçiminde dönen eksenden ibarettir, kıyma makinesine benzer. Isıtılmış ve kurutulmuş yağlı madde baş taraftan gövdeye sokularak gittikçe artan basınca tabi tutulur, gövdenin yanından yağ akar, sonundan küspe çıkar. Pres buhar kılıfı ile ısıtılabilir. Küspe ikinci kez öğütülüp yeniden pres edilebilir veya hidrolik preste sıkılabilir. Sürekli presler masrafsızlar da daha bulanık ve hidrolik prese göre düşük verimle yağ çıkarırlar, bununla birlikte tohumlardan yağ çıkarmak için genellikle kullanılan budur [53].

Mekanik presleme işlemi; katı-sıvı faz ayırım yöntemi olarak tanımlanabilir. Genellikle yağ oranı % 20 'den daha yüksek olan yağlı tohumların ham yağa işlenmesinde mekanik presleme yöntemi kullanılabilir. Mekanik presleme işlemi sonucu esas ürün olarak ham yağ, yan ürün olarak yağı alınmış küspe elde edilmektedir. Mekanik presleme işleminde kesikli çalışan hidrolik presler, sürekli vidalı presler ve döner presler kullanılabilir [56].

Bitkisel kaynaklardan yağların hiçbir kimyasal kullanmaksızın geri kazanım süreçlerinden biri soğuk presleme yöntemidir. Bu yöntemde presleme işlemi sonunda geriye kalan katı atık içindeki yağ miktarı yaklaşık olarak kütlece %10–15 civarındadır [57]. Bu miktar ekonomik açıdan değeri ve kıtlığı olan ürünlerde ürünün atık içinden geri kazanımını zorunlu hale getirmektedir. Soğuk presleme yöntemi ile elde edilen yağ yüksek saflıkta olmasına karşın elde edilen ürün verimi düşük olmaktadır.

2.3.3 Süperkritik ekstraksiyon

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

olması nedeni ile yüksektir. Bu yöntem kolaylıkla otomatikleştirilebilmekte ve kromatografik ve spektrofotometrik tekniklerle birleştirilebilmektedir [58].

Bir maddenin, basınç-sıcaklık faz diyagramında gaz-sıvı denge eğrisi ileriye doğru hareket edilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artar. Isıl genleşmeler nedeniyle, sıvının yoğunluğu azalırken; basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlar. Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı arasındaki farklar kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık “akışkan” olarak adlandırılabilir. Böylece, maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının (T_c), basıncı ise kritik basıncının (P_c) üzerine çıkartıldığında katı, sıvı ve gaz fazlarından daha farklı, yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgedeki akışkan “süperkritik akışkan (SC)” olarak tanımlanır. İlk kez 1879’da Royal Society seminerlerinde (Londra) Hannay ve Hogart tarafından, bir katının yüksek basınçtaki gazda çözündüğü, basınç düşürülünce katının çöktüğü açıklanmıştır. Bir kaç yıl sonra Eduard Buchner (1907’de biyokimya alanında Nobel ödülü almıştır), uzun süren bir çalışmanın ardından bir model bileşik olarak naftalinin SC-CO₂ içindeki çözünürlüğü ölçmüştür [59].

Süperkritik akışkan ekstraksiyon sisteminde, sıvı akışkan önce bir pompa ile istenilen basınç değerine ayarlanır. Buradan bir ısıtıcıya gönderilen akışkan istenilen sıcaklık değerine ısıtılır. Böylece süperkritik sıcaklık ve basınç değerlerine getirilmiş olan akışkan sıcaklığı sabit tutulan bir ekstraktöre gönderilir. Ekstraktörde bulunan madde ile temas sonucu, süper kritik akışkanda çözünen karışım bir ayırıcıya alınır ve basıncı düşürülür. Basıncının düşürülmesi sırasında çözme gücünü kaybeden akışkan üründen ayrılır. Ayırıcıdan alınan süper kritik gazının geri kazanımı için bir soğutucuda sıcaklığı düşürülmektedir. Soğutucudan çıkan sıvı akışkan tekrar sisteme beslenmek üzere sıvı CO₂ tüpünden alınan akımla karıştırılır. Elde edilen ürün ya da ürünler ayırıcının altından toplanır [60]. Süper kritik ekstraksiyon sisteminde kullanılan CO₂ nin zehirsiz olup yanıcı olmaması, ucuz temin edilmesi, kimyasallara ve radyoaktif maddelere karşı kararlı olması, polar olmayan ve orta polar organik bileşikler için yüksek çözme gücü göstermesi, ekstrakte olan türlerin kazanımının CO₂ in gazlaştırılmasını içeren basit bir işlemle gerçekleştirilmesi, sistemden kolaylıkla ayrılıp ve geride atık bırakmaması, kritik sıcaklık ve basıncının düşük olması gibi avantajları vardır.

Süperkritik akışkanlarla ayırma işlemlerinin yüksek basınçta (>80 atm) gerçekleşmesinden dolayı yüksek yatırım maliyeti ve yüksek enerji gereksinimi gibi birkaç dezavantajı vardır. Son derece önemli olduğu halde ihmal edilen diğer bir dezavantajı ise, en çok kullanılan CO₂'tir. Saf CO₂ tüplerinin içeriğinde bile varolan %1-2'lik oksijenin, antioksidanlar gibi oksijene hassas bileşikler ile tepkimeye girip az miktarda da olsa bozunmalarına neden olmaktadır [61].

2.3.4 Çözücü ekstraksiyonu

Çözücü ekstraksiyonu endüstride, biyolojik, anorganik ve organik maddelerin üretiminde yaygın olarak kullanılan bir yöntem olup bir katı-sıvı ekstraksiyonu işlemidir. Günlük yaşamda çay ve kahve yapımı verilebilecek en güzel örnek iken, şeker pancarından şeker, yağlı tohumlardan yağ elde edilmesi endüstriyel katı-sıvı ekstraksiyonuna örnektir [62].

Bu yöntem Fransız E. DEISS'in 1855 de Marsilya'da zeytinden karbon sülfür ile yağ ekstraksiyonu ile başlamıştır. Çözücü ile ekstraksiyonda, yağlı doku önce peletler haline getirilir ve çözücü içerisinde ılımlı bir şekilde karıştırılır, çözelti aktarılır, yerine yeni çözücü konur. Çözücü ekstraksiyonu, çok bileşenli bir katıdan istenilen bileşenin bir çözücü ile çözülerek ayrılmasıdır. Katı içinde difüzyon yavaş olduğu için dengeye ulaşması zor olan bir süreçtir. Katı-sıvı ekstraksiyonuna üç ana faktör etki eder: Bunlardan ilki çözücü ile madde temasıdır. Çözünmesi istenen madde katı yüzeyinde ise çözücü ile ekstrakte edilmesi kolaydır, ancak, yağlı tohumlarda olduğu gibi çözünmesi istenen madde katının içinde ise, katının bir ön işleminden geçirilerek parçacık boyutu küçültülür. Böylece katı-çözücü temas yüzeyi artırılarak ekstraksiyon verimi yükseltilir.

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

Ekstraksiyona etki eden diğer parametre ise sıcaklıktır. Yüksek sıcaklıklarda çalışmak difüzyon hızını artırıp işlemi çabuklaştırır, bunun yanında, çok yüksek

sıcaklıkta bazı bileşenlerin yapısında bozulmalar oluşabilir veya istenmeyen bileşikler de çözünebilir [63].

Ekstraksiyon sonrası yağdan ve küspeden çözücünün tamamıyla uzaklaştırılması yapılır. Küspe proteince zengindir, sığırlara yem olarak verilir. Çözücü ekstraksiyonu düşük yağ yüzdeli tohumlardan yağın çıkarılmasında uygulanan tek yöntemdir. % 30 dan daha fazla içeren hammaddelerden ise yağ eldesinde önce madde preslenir, yağ yüzdesi 8-10 düşürüldükten sonra çözücü ile ekstraksiyona tabi tutulur. Yağlı maddelerde ekstraksiyon sonrası küspede kalan yağ % 0,5-2 olmaktadır [64].

Ülkemizde yağ üretiminin büyük bir kısmı geleneksel çözücü ekstraksiyonu ile gerçekleştirilmekte olup, bu işlemlerde genellikle hekzan kullanılan en yaygın çözücüdür. Son yıllarda, hekzanın toksik etki gösterdiği saptanmış, özellikle bazı Avrupa Birliği ülkeleri, Kanada ve ABD’de yasaklanmıştır. Hekzan insan sağlığı ve çevre açısından büyük riskler içerir bunun yanında maliyeti de yüksek bir çözücüdür. Bütün bu olumsuzluklara karşın ülkemizde hekzan ile yağlı tohumlardaki yağın ekstraksiyon yöntemi ile geri kazanımı devam etmektedir. Ayrıca bu yöntemde çözücünün üründen uzaklaştırılması için birçok ayırma ve saflaştırma basamağı kullanıldığından, işletme maliyetleri açısından üretilen yağın maliyetini de arttırmaktadır. Yapılan çok sayıdaki ayırma işlemlerine karşın üründen çözücü tam olarak uzaklaştırılamamaktadır [65].

Çözücü ekstraksiyonunda, çözücü çözünen maddeden kolayca ayrılabilen yapıda olmalıdır, bu nedenle düşük kaynama noktasına sahip çözücülerin kullanılması tercih edilir. Yüksek sıcaklıklarda çalışmak difüzyon hızını artırıp işlemi çabuklaştırır, bunun yanında, çok yüksek sıcaklıkta bazı bileşenlerin Solventle ekstraksiyonda genel olarak belli bir tane büyüklüğüne öğütülmüş tohumlar organik bir çözücü ile temas ettirilir, yağın çözücüye geçmesi sağlanır. Daha sonra misella denilen çözeltiden çözücü uçurulur ve geriye ham yağ kalır. Pres yöntemine göre üstünlüğü küspede en fazla % 1 oranında yağ kalmasıdır. Çoğunlukla kalan yağ miktarı % 0,5 civarında bulunmaktadır. Bu yöntem özellikle yağ miktarı düşük olan ayçiçek, soya ve çığit gibi yağlı tohumlarda kullanılmaktadır. Sistemde birçok organik madde çözücü olarak kullanılabilir ancak Türkiye ve Dünyada en yaygın kullanılan kaynama noktası 64-68°C olan hekzandır [66, 67].

2.3.5 Rafinasyon işlemleri

Rafinasyonun amacı berrak, açık renkli, kokusuz, serbest asit değeri belli bir seviyede olan bir yağ elde etmektir [56]. Ham yağlar ne kadar özenli ve temiz elde edilirse edilsin mutlaka rafine edilmelidir. Çünkü tüketici açık renkli, kokusuz, serbest yağ asidi bulunmayan ve berrak yağ satın almak ister. Rafine edilmeden tüketilen tek bitkisel yağ, iyi kalite zeytinlerden elde edilen zeytinyağıdır. Fakat kötü vasıfta olan zeytinyağları da rafine edilir. Türkiye'nin kırsal kesiminde ayçiçeği, susam, haşhaş vb. gibi hammaddelerden elde edilen yağlar yerel halk tarafından rafine edilmeden tüketilir. Müsilaj giderme, asit giderme, ağartma, koku giderme ve vintemizasyon rafinasyon işleminin aşamalarıdır.

Rafinasyon günümüzde kimyasal ve fiziksel olmak üzere iki şekilde uygulanabilir; ayrıca her işlem basamağını kesikli veya sürekli olarak uygulamak mümkündür. Ülkemizdeki yağ fabrikalarında rafinasyon işleminin temel basamaklarının tümü sürekli, tümü kesikli veya bir kısmı kesikli olarak uygulanabilmektedir [55].

Ham yağlarda bulunan ve kullanımları sırasında sorunlara neden olan istenmeyen maddeler bir dizi işlem sonunda ham yağlardan uzaklaştırılırlar. Rafinasyon olarak isimlendirilen bu işlemler başlıca kimyasal ve fiziksel rafinasyon olarak iki ana başlık altında toplanır [68].

Kimyasal rafinasyon yönteminde ise ham yağa uygulanan işlemler aşağıda sıralanmıştır:

Zamksı maddelerin giderilmesi (degumming) : ham yağ genellikle su ile muamele edilir ve pıhtılaşan fosfatidlerin bir kısmı santrifüjlemeyle ayrılır. Bu işlem soya yağına uygulandığında ayrılan pıhtılar lesitin ismi altında emülgatör olarak kullanılır.

Serbest yağ asitlerinin giderilmesi (nötralizasyon) : Yağda bulunan serbest yağ asitleri bir alkali ile, genellikle sodyum hidroksit çözeltisi ile reaksiyona sokulur ve serbest yağ asitleri sabun oluşturarak yağdan ayrılır. Yağ su ile yıkanarak alkali ve sabun giderilir. Yönteme ismini veren bu kimyasal reaksiyondur.

Renk veren maddelerin giderilmesi (bleaching) : Yağ, ağartma toprağı ismi verilen bir kil minerali ile muamele edilir ve ağartma toprağına adsorplanan pigmentler süzülerek yağdan ayrılır.

Koku veren maddelerin giderilmesi (deodorizasyon) : Yağ en son olarak vakum altında ve yüksek sıcaklıkta distile edilerek kötü koku veren aldehit, keton benzeri oksidasyon ürünü uçucu maddeler giderilir.

Fiziksel rafinasyon yönteminde ise sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanır:

Zamksı maddelerin giderilmesi (degumming) : Yağa, sırasıyla su ve fosforik asit ile ileri derecede bir fosfolipid giderilmesi uygulanır.

Renk veren maddelerin giderilmesi (bleaching) : Ağartma toprağı ile renk veren maddeler giderilir.

Distilasyonla serbest yağ asitleri ve koku veren maddelerin giderilmesi : Tüm prosesin fiziksel rafinasyon olarak isimlendirilmesi, serbest yağ asitlerinin fiziksel bir ayırma yöntemi olan distilasyon ile giderilmesinden kaynaklanır. Bu işlemde yağ asitleri ve koku veren maddeler vakum altında ve yüksek sıcaklıkta su buharı kullanarak distile edilirler.

2.4 Enzimatik Sulu Ekstraksiyon

Yağlı tohumlardan yağ elde edilmesinde bugün en yaygın olarak kullanılan yöntem çözücü ekstraksiyonudur. Tipik çözücü olarak genelde hekzan kullanılmasına ve çözücünün çok büyük miktarının uçurularak geri kazanılmasına rağmen güvenlik ve çevreyle ilgili endişeler hala devam etmektedir. Çevre Koruma Ajansı (EPA) da yağlı çekirdeklerin ekstraksiyonunda çözücü emisyonunu önemli bir ekolojik kirleticisi olarak duyurmuş ve bu konuda bağlayıcı düzenlemeleri devreye koymaya çalışmaktadır [69].

Organik çözücülerin kullanılması güvenlik açısından sorun yarattığından, çözücü olarak su kullanımı denenmiş, ancak ilk denemeler düşük ekstraksiyon verimi nedeniyle başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Buna rağmen bu konu üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Çevresel açıdan daha temiz bir yöntem olduğundan, sulu ekstraksiyona ilgi devam etmiştir. Öte yandan, sulu ekstraksiyonun verimi çözücü ekstraksiyona göre çok düşüktür. Bu önemli soruna çare olarak enzim katkılı ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmektedir.

Seçilen enzimin aktivitesi çalışılacak tohum veya meyveye özgü özellikte olmalıdır. Örneğin yapısında önemli miktarda selüloz ve hemiselüloz barındıran tohumlar

selüloz ve hemiselüloz enzimleri ile muamele edilmelidir. Tohumlara ön işlem olarak hücre duvarını parçalamaya yönelik uygun enzimlerle enzimatik işlem uygulamak, solventle ekstraksiyonu mekanik ve sulu ortam ekstraksiyonlarında ekstraksiyon verimini ve yağın kalitesini arttırmaktadır [70,71]. Enzimler tek başlarına kullanıldıkları gibi karışım halinde de kullanılabilirler. Karışım halindeki enzimlerin kullanımı ile genel olarak yüksek ekstraksiyon verimlerine ulaşılmıştır [70].

Sulu ekstraksiyon (SE), yangın ve patlama riski de içermediğinden soğuk presleme ve çözücü ekstraksiyonu yöntemlerinden daha avantajlıdır. Daha güvenli çalışma olanağı sunması, daha düşük ilk yatırım masrafı gerektirmesi ve farklı tohumlarla çalışılabilmesi açısından daha esnek bir çözümdür. Ilımlı işletme koşulları, rafine edilmeyi gerektirmeyen yağ eldesini ve zehirsiz gıda üretimini olanaklı kılar.

Enzimatik sulu ekstraksiyonu yağın su içinde çözünmezliğine dayanan güvenli bir işlemdir. Bu yöntemde yağ ekstrakte edilebildiği gibi protein de ekstrakte edilebilmektedir. Ekstraksiyon mekanizmasının esası hücre duvarının yıkılması ile protein ve yağın açığa çıkması olduğundan bunların ekstraksiyonu eş zamanlı olarak gerçekleşir. Ekstraksiyonunu etkileyen değişkenler (enzim bileşimi, ortam pH'ı, partikül büyüklüğü, sıcaklık, çalkalama hızı, süre ve katı-sıvı oranı) yağ ve protein ekstraksiyon verimlerini belirlemektedir. Selüloz, hemiselüloz, pektinaz gibi enzimler kotiledon hücre duvarlarını yıkarken, proteaz ise yağlı membran yüzeylerini bozunmaya uğratmaktadır. Proteolitik enzimler yağ bileşenlerinin etrafını saran lifofilik proteinler olan oleozinleri hidrolize etmekte, böylece oleozinlerin yüzey aktiviteleri azalmakta ve yağ ayrımı gerçekleşmektedir [72].

Pekçok bitkinin hücre duvarı temel olarak pektik bileşenler, selüloz, hemiselüloz ve ligninden meydana gelmektedir ve kofullar içerisinde yağ barındırırlar [73]. Yağın ekstraksiyon verimi hücre duvarına etkileyen karbohidrazların ve proteazların hidrolitik müdahalesi ile artırılabilir [72]. Enzim destekli sulu ekstraksiyon veya enzimatik sulu ekstraksiyon ifadesi de buradan gelir, özetle, öğütülmüş tohumlar enzimler ile işleme tabi tutulur, hücre duvarlarının ve bazı lifli maddelerin parçalanması sağlanır. Yağların etrafını çevreleyen lipofilik proteinlerin de etkinliği kırılır ve yağ serbest hale gelir. Bu sayede yağın su ile ekstraksiyon işlemi kolaylaşır. Proteolitik enzimlerin kullanımı Hindistancevizi yağı, kolza yağı ve zeytinyağı eldesinde pilot ölçekte başarılı sonuçlar alınmıştır. Bunların yanı sıra, kavun çekirdeği, ayçiçeği çekirdeği, kanola, pamuk tohumu, buğday, soya, yerfıstığı, üzüm

çekirdeği ve kabak çekirdeği gibi yağ içeren tohumlarda enzimatik ekstraksiyon çalışmaları yapılmıştır [70,71,74].

Ekstraksiyon sonrası yağı ayırabilmek için, birçok çalışmada santrifüj kullanılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Genellikle ekstraksiyon sonrası karışımlar 1519 ile 16,000 g arasında santrifüj edildiğinde dört faza ayrılır: yağ, krema, sulu ve katı faz tabakaları. Yağın ayrılması için ekstraksiyon karışımına sıcak su ilave edilerek sıcak suda yağı yüzdürme de yapılabilir. Bu yöntemde emülsiyon tabakası üst yüzeye çıkar, oradan alınır ve hafifçe kaynatılarak emülsiyon kırılır. Ve son olarak yağ tabakası dekante edilir. De-emülsifikasyon ve ürün eldesi aşamaları, esas itibariyle sulu ve enzimatik ekstraksiyonun gerçekleştirilebilirliğini belirler. Emülsiyondaki yağ kürecikleri birleşerek daha büyük damlacıklar oluştururlarsa santrifüjde yağın ayrılması daha kolay olur [70].

Bu fazlara dağılmış yağların ayrı miktarlarının tespiti neredeyse imkansızdır. Bu nedenlerden dolayı sonuç olarak yağ ekstraksiyonu veriminde sıvı faza geçen toplam yağ miktarı üzerinden hesaplamalar yapılır [75].

Proses çoğu yağlı tohumdan aynı anda yağ ve protein eldesine ve iyi kalitede yağ üretimine olanak sağlar. Enzimatik sulu ekstraksiyon ve hekzan ekstraksiyonu ile elde edilen yağların serbest yağ asidi, peroksit ve diğer oksidasyon değerleri açısından fark olmadığı da gözlemlenmiştir Bunun yanısıra enzimatik olarak elde edilen yağın renginin daha açık ve sarımsı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca enzimatik ekstraksiyon ile yağdaki fosfolipidler ve suda çözülen gamlar yağdan uzaklaşmaktadır [76]. Özellikle yağın tokoferol miktarı daha yüksek bulunmaktadır. Fenolik bileşiklerin oranı daha yüksek olduğu için yağlar daha yüksek antioksidan aktivite göstermektedir [77]. Enzimatik ekstraksiyonda, düşük fosfatid içeriğine rağmen oldukça kararlı ve ayrıca daha düşük seviyede renkli madde içermektedir. Bu nedenle saflaştırma için daha az ağartma toprağına ihtiyaç duyulmaktadır. Enzimatik ekstraksiyon prosesiyle elde edilen zeytinyağının depolama stabilitesinin geleneksel sıkma yöntemine göre oldukça iyi olduğunu belirtmiştir [70].

Enzimlerin gıda sanayinde kullanılması, yüksek verimlilikte ürün üretimi, istenmeyen yan ürünlerin azaltılması ve pek çok üretim maliyetini arttıran işlem basamağını ortadan kaldırmak gibi avantajlar sunmaktadır. Enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemi özellikle yüksek spesifikite gösterdiği ve düşük sıcaklık

koşullarında uygulandığı için gıda sanayi için daha da önemli bir hal almaktadır. Prosesin çevre dostu olması ve ortama havayı kirlecek uçucu organik bileşikler vermemesi önemli avantajlarından biridir.

Sulu enzimatik ekstraksiyon yönteminin başlıca dezavantajları düşük ekstraksiyon verimi, yüksek sermaye gerektirmesi, uzun inkübasyon zamanına gereksinim duyulması ve önemli miktarda atıksu üretmesidir. Piyasa değeri yüksek bir yağ söz konusu ise, enzimatik ekstraksiyon prosesi geleneksel olan yöntemle kolaylıkla rekabet edebilir. Organizmadan elde edilen enzimler karışımlar halinde elde edilip kullanılırsa ve immobilize (yeniden kullanılabilir) formdaki enzimler tercih edilirse, enzimin geri dönüştürülmesi maliyeti oldukça düşürülebilir [77]. Atıksu ve enerji tüketimini azaltmak için, ekstraksiyonda kullanılan su geri kazanılabilir ve tekrar kullanılabilir. Dahası, suyun sirkülasyonu ile enzimin geri kazanılması enzimin maliyetini azaltabilir [70,78].

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

2.4.1 Enzimler hakkında genel bilgi

Canlıları oluşturan biyomoleküller, kinetik yönden oldukça kararlı olduklarından reaksiyon vermeleri zordur. Biyolojik katalizörler olarak tanımlanan enzimler, canlı organizmalarda kimyasal reaksiyonları hızlandırarak hiçbir yan ürün olmasına fırsat vermeden %100 lük bir ürün verimi sağlarlar. Protein yapısında olan bu enzimler, proteinlerin en büyük ve en özelleşmiş grubu olarak nitelendirilirler. Enzimlerin katalizör özelliklerinin yanı sıra hücrelerin DNA'larından bilgi aktarılmasında rol alma gibi önemli görevleri de vardır [79].

Birbirinden farklı işlevleri olan enzimler, uluslararası enzim komisyonu tarafından, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve reaksiyon mekanizmalarına göre 6 ana grupta sınıflandırılmıştır. Bunlar oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar ve ligazlardır. Kabak çekirdeği tohumundan enzimatik yağ ekstraksiyonu deneylerinde hidrolaz sınıfı enzimler kullanılmıştır [80].

Enzimlerin reaksiyonları hızlandırma etkisi, reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli aktivasyon enerjisini düşürmelerinden ileri gelir. Reaktanlarla daha düşük enerjili bir

geçiş kompleksi oluşturan katalizörler, reaksiyon sonunda bir değişikliğe uğramadan eski formlarına geri dönerler [81].

Katalizörlerin aktivitesine substrat konsantrasyonu, enzim miktarı, pH, sıcaklık, iyonik şiddet, kofaktör konsantrasyonu, inhibitör ve aktivatör konsantrasyonları gibi faktörler etki eder. Enzimler, bu faktörlerin farklı değerlerinde en yüksek verimle çalışabilirler, diğer bir deyişle, her biri için optimum değerler farklıdır [80].

Proteaz enzimi: Proteaz enzimi, doğal hayatta bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların dekompozisyonunda önemli rol oynayarak besin döngüsünü sağlamakta ve bitkilerin besinleri alabilmelerini sağlamaktadır. Proteazlar, endüstriyel pazarda oldukça büyük bir yere sahiptirler. Özellikle son dönemde deterjan sektöründe, proteaz enzimi sayesinde önemli gelişmeler olmaktadır. Bunun yanında proteaz enzimleri, deri, et, süt, ilaç, bira, fotoğraf, organik sentezlerde ve atıkların muamelesinde de kullanılmaktadır [82]. Bu enzim üzerine yapılan çalışmalar, proteaz enziminin aktif olarak pH 4 ile 9 aralığında, sıcaklık olarak ise 10 – 70° C arasında çalıştığını göstermiştir [83].

2.5 Deneysel Tasarım ve Optimizasyon

Optimizasyon, prosesin belirlenen hedefler (yanıtlar) doğrultusunda, bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin hedefe (yanıta) olan etkilerinin bir arada uygulanması işlemidir. Proseslerin optimizasyonunda genellikle sistemin performansını veya ürünün kalite kriterlerini belirleyen çok sayıda yanıtla eş zamanlı olarak çalışılır. Bu yanıtların bazılarının maksimum seviyede tutulması, bazılarının minimum seviyede tutulması, bazılarının da kabul edilebilir değerler veya hedef değer alması istenir. Herhangi bir optimizasyon prosedürü, genellikle hedef fonksiyonu adı verilen önceden tanımlanmış kriterleri maksimize veya minimize etmek için karar (bağımsız) değişkenleri belirlenen koşullarda değiştirilmesini içerir [84]. Optimizasyon proses tasarımlarını verimli hale getirmek (üretimi ve kaliteyi iyileştirmek ve maliyeti minimize etmek) için kullanılmaktadır [85].

Bağımsız değişken sayısının fazla olduğu prosesler için bir bağımsız değişkeni değiştirip diğerlerini sabit tutmak çok sayıda deney yapılmasına neden olmaktadır. Ayrıca, bu tür bir çalışmada bağımsız değişkenlerin etkileşim etkilerini incelemek mümkün değildir. Bu açıdan bakıldığında, istatistiksel deney ya da proses tasarımları daha az deney sayısı ile daha doğru sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca,

verilerin ekstrapolasyonu ve grafiklenebilmesi sayesinde deney tasarımı ile ürün ve prosesin optimizasyonu mümkündür [86].

2.5.1 Yanıt yüzey deney tasarımları

Yanıt yüzey yöntemi (*Response Surface Methodology*), “Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması” ismi ile 1951 yılında Box and Wilson tarafından geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. İlk olarak kimya endüstrisine uygulanmıştır. Bu yöntem, Myers ve Montgomery tarafından “proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem” olarak tanımlanmıştır [87].

Yanıt yüzey yönteminde, yanıt ve bağımsız değişken arasındaki fonksiyonun matematiksel formu genellikle bilinmediğinden tahminlenmesi gerekmektedir. Bu yöntem, yanıt değişkeni optimize etmek istatistik ve matematiğe dayalı teknikler kullanır. Bu teknikler tekli regresyon, çoklu regresyon ve varyans analizini içermektedir. Sistemin yanıtı, bağımsız değişkenin bir lineer fonksiyonu olarak iyi bir uyum veriyorsa, birinci dereceden polinomiyal denklem, model olarak kullanılabilir. Eğer sistemin yanıt yüzeyinde bir eğrilik varsa, ikinci dereceden polinomiyal denklemler gibi daha yüksek dereceli polinomiyal denklemler kullanılmalıdır. Birinci dereceden polinomiyal modeller gerçek yanıt yüzeyindeki eğriliği tahminlemede yetersiz kalmaktadır. İkinci dereceden polinomiyal modeller, katsayı değerlerini karmaşık hesaplamalar olmadan en küçük kareler yöntemi kullanılarak tahminlemesi ve optimum noktayı matematiksel olarak kolayca belirlemesi nedeniyle yanıt yüzey yönteminde yaygın olarak kullanılmaktadır [88, 89].

Yanıt yüzey yöntemi, proses değişkenlerinin deneysel uzayını araştırmak için deneysel stratejileri, sistemin yanıtı ve üzerinde etkili olan bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan empirik modelleme tekniklerini ve proses değişkenlerinin sistemin yanıtında arzu edilen etkiyi gösterdiği seviyelerinin bulunması için kullanılan optimizasyon tekniklerini içermektedir. Genel olarak yanıt yüzey yöntemi eleme denemeleri, bölge araştırması ve işlemin veya ürünün optimizasyonu adımlarından oluşmaktadır. Eleme denemeleri, daha az sayıda ve daha verimli deneme yapılmasına olanak sağlamaktadır. İkinci aşama olan bölge araştırmasında amaç, eleme denemeleri ile belirlenen bağımsız değişkenlerin

sistemin yanıtında oluşturdıkları değerlerin, optimum noktaya yakın sonuçlar verip vermediğini belirlemektir. Yanıt yüzey yönteminin üçüncü aşaması, işlem optimum noktaya yaklaşıldığında başlar. Gerçek yanıt fonksiyonu optimum nokta etrafında önemli bir eğrilik göstermektedir. Bu eğriliğin tahminlenmesinde lineer olmayan modeller, genellikle ikinci dereceden polinomiyal modeller, üssel modeller veya eksponensiyel modeller kullanılır. Uygun bir model elde edildikten sonra, bu model optimum noktanın araştırılmasında kullanılır [90].

2.5.1.1 Varyans analizi (ANOVA)

Varyans analizi özellikle çok parametrelili ve çok seviyeli modellerde kullanılan bir analizdir ve deney sonuçlarının tamamının toplu olarak yorumlanmasını sağlar. Kısaca ANOVA olarak da bilinen varyans analizi, istatistiksel tekniklerin genel toplamıdır; nicel ölçümleri kapsayan deneysel verilerin analizi ve elde edilen model hakkında karar vermek için geliştirilmiş bir tekniktir [91].

Varyans analizlerinden elde edilen önem seviyesi (anlamlılık düzeyi), testler sonucunda verilen kararın doğruluğunun ne kadar olasılıkla güvenli olduğunu belirler. Genellikle α ile gösterilen bu ihtimal, çoğu zaman örneklerin alınmasından önce tayin edilir. Böylece, elde edilen sonuçların yapılan seçimden etkilenmemesi sağlanmış olur. Uygulamada daha çok 0,05 ve 0,01 önem seviyeleri kullanılır [92].

Bir hipotez testinde örneğin 0,05 (veya %5) önem seviyesi esas alındığında, hipotezin kabul edilebileceği halde reddedilme olasılığı yüzde 5 civarındadır. Yani test sonunda verilen kararın doğruluğu % 95 güvenli bulunabilir. Bu halde hipotezi %5 önem seviyesinde reddedildiğinden bahsedilir. Bunun anlamı, hata yapma olasılığının %5 olduğudur [93].

2.5.1.2 Lineer regresyon analizi

Çok yaygın olarak kullanılan lineer regresyon analizi, bağımlı değişken (yanıt) ile bir veya daha fazla bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi fonksiyonel olarak inceleyen istatistiksel bir tekniktir. Model parametrelerinin tahmin edilmesinde kullanılır. Polinomiyal modeller gibi lineer olan herhangi bir model, oluşturduğu yanıt yüzeyin şekli ne olursa olsun lineer regresyon modelidir. Çoklu lineer regresyon modelinde, regresyon katsayıları en küçük kareler yöntemi kullanılarak tahmin edilir. En küçük

kareler yönteminin uygulandığı, yanıt yüzeyin belirlenmesinde kullanılan ikinci dereceden polinomiyal denklem Eşitlik 2.1’de gösterilmiştir.

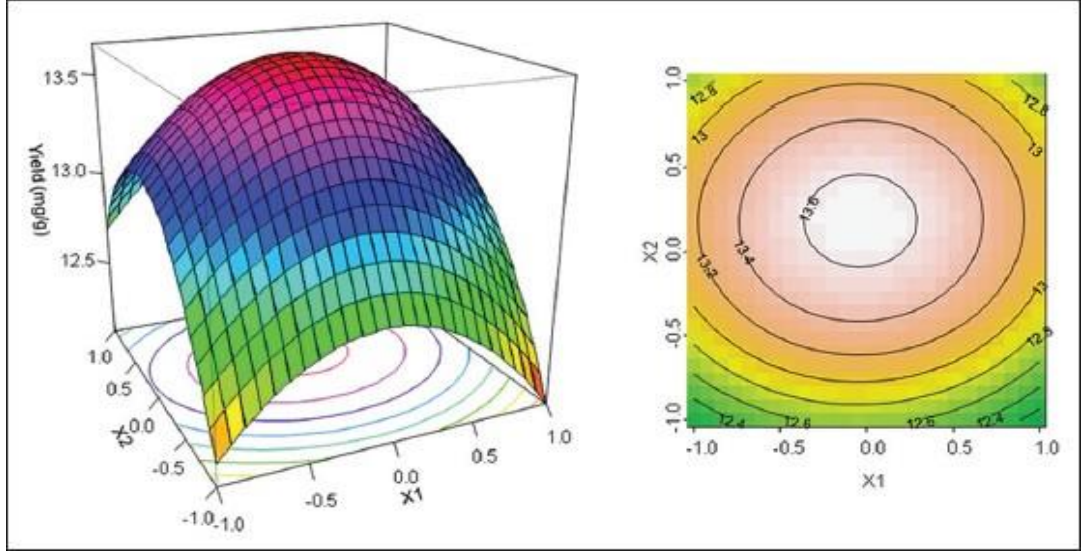
$$y_i = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (2.1)$$

Bu denklemde Y tepki, β_0 ortalama etki, β_i , β_{ij} , β_{ii} ise sırasıyla değişkenlerin lineer, ikili ve kuadratik etkileşimleri için belirlenen katsayılarıdır. X_i ve X_j de bağımsız değişkenlerdir [87, 94].

Yapılan deneylerle elde edilen veriler, regresyon analizi sonucunda matematiksel bir formül şeklinde ifade edilir. Tahminlenecek model katsayıları(β), tekli, ikili, üçlü ya da daha fazla sayıdaki etkileşimler hakkında bilgi verir. Bu denklemin ilişkiyi ne derece açıkladığının ve bu denklemi kullanarak yapılacak tahminlerin ne derece hassas olacağının araştırılması gerekmektedir. Yapılan varsayımlardan biri olan, seçilen modelin matematiksel formunun uygun olduğu, dolayısıyla gerçek ortalama yanıtı temsil edebildiği de test edilmelidir. Bu amaçla, varyasyon katsayısının (C.V) hesaplanması, regresyon katsayısının (R^2) ve düzeltilmiş regresyon katsayısının hesaplanması (R^2_{adj}), model uygunsuzluğunun test edilmesi (lack of fit testi) ve kalıntı analizi gibi farklı test yöntemleri uygulanabilir [90].

Literatürde, deney sayısının azaltılması ve daha kullanışlı veri elde edilmesini sağlayabilecek çok sayıda deney tasarımı tanımlanmıştır. Bir deney tasarımında amaç eğer çok sayıda değişkeni “etkili” ve “etkisiz” şeklinde sınıflandırmak ise Plackett-Burman gibi birinci dereceden tasarımlar tercih edilebilir. Ancak amaç, bir cevap değişkeninin matematiksel olarak etki düzeyini belirlemek veya bir prosesi optimize etmek için Merkezi Bileşik veya Box-Behnken tasarımı gibi ikinci dereceden modellerin tercih edilmesi gereklidir [95, 96].

İkinci dereceden terimler içeren bu modeller, bağımsız değişkenler ile çıktı değeri arasında doğrusal yaklaşımın ötesinde bir bağlantı ifade etmektedirler. Elde edilen sonuçlar yanıt yüzey ve izdüşüm (contour) grafikleri ile gösterilerek yorumlanabilmektedir (Şekil 2.3). Tüm bu tasarımlar ile optimizasyon için gerçekleştirilmesi gereken deneylerin koşulları ve deney sayıları belirlenmiş olur [87].



Şekil 2.3: İki parametrenin yanıt yüzey ve izdüşüm grafiği [97].

2.5.2 Plackett-Burman deney tasarımı

Plackett-Burman deney tasarımı bağımsız değişkenlerin anlamlılık derecelerine göre elenmesini sağlayan etkili ve sık kullanılan bir deney tasarımıdır. Bu tasarımda toplam deney sayısı dördün katı olmakla birlikte ikinin kuvveti olmayan bir sayıdır (ör; 12, 20, 28, ...) ve incelenen maksimum faktör sayısı toplam deney sayısından bir azdır (11, 19, 27, ...). Faktörlerin iki seviyede incelendiği bu tasarımda, pozitif değerler faktörlerin yüksek düzeyini, negatif değerler ise faktörlerin düşük düzeylerini göstermektedir. Sadece faktörlerin ana etkileri değerlendirildiğinde Plackett-Burman deney tasarımı son derece etkin bir yaklaşımdır. Ancak ana etkenler ile iki faktör etkileşmelerinin etkisi üst üste geçtiğinden iki faktör etkileşmelerinin ihmal edilmesi gerekmektedir. Dolayısıyla bu tasarım genellikle faktörlerin etkili/etkisiz şeklinde sınıflandırıldığı başlangıç aşamalarındaki çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu çalışmayı takiben belirlenen kritik faktörler daha ileri deney tasarımlarına dâhil edilir. Plackett-Burman tasarımı “doygun” bir tasarım olarak nitelendirilir çünkü tüm serbestlik dereceleri ana etkiler tarafından kullanılmaktadır [96].

İki düzeyli tam faktöriyel tasarımlarda çok sayıda faktör söz konusu olduğunda deney sayısı son derece fazladır (2^k ; k faktör sayısıdır). Dolayısıyla, k sayıda faktörün $k + 1$ sayıda deney ile incelenebildiği Plackett-Burman gibi iki düzeyli kısmi faktöriyel tasarımlar kullanışlı olabilmektedir [98]. Bu tasarımda denenen düzeylerden elde edilen veriler ışığında her bir faktör için deney tasarımında

denenmeyen farklı düzeyler de önerilebilmekte ayrıca sonuca katkısı olan kritik faktör ve düzeyler de belirlenebilmektedir. Deney tasarımının en büyük avantajı, deneysel zaman kaybını, malzeme tüketimini ve endüstriyel çapta iş gücünü azaltarak zaman kaybını önemli ölçüde minimize etmesidir. Yapılan doğrulama deneyleri kabul edilebilir güven aralıkları ile sistemin kendi içindeki tutarlılığını ve güvenilirliğini de test etmektedir [96]. Üç bağımsız değişkenin (X_1 , X_2 , X_3) önerilen düzeyde doğrulama deneyleriyle (e1-e4) birlikte yer aldığı örnek bir tasarım matrisi Çizelge 2.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.10 : Üç faktörlü ve sekiz deneyli bir Plackett-Burman tasarım matrisi.

Deney No	X_1	X_2	X_3	e1	e2	e3	e4
1	-1	1	1	1	-1	1	-1
2	1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	-1	1	1	1	-1	1
4	-1	1	-1	-1	1	1	1
5	1	1	-1	1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	-1	-1
7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
8	1	-1	1	-1	-1	1	1

Plackett-Burman deney tasarımı, Hadamard matrisleri temel alınarak düzenlenmiştir ve veriler birinci dereceden polinomiyal model ile açıklanır (Eştilik 2.2) [96]:

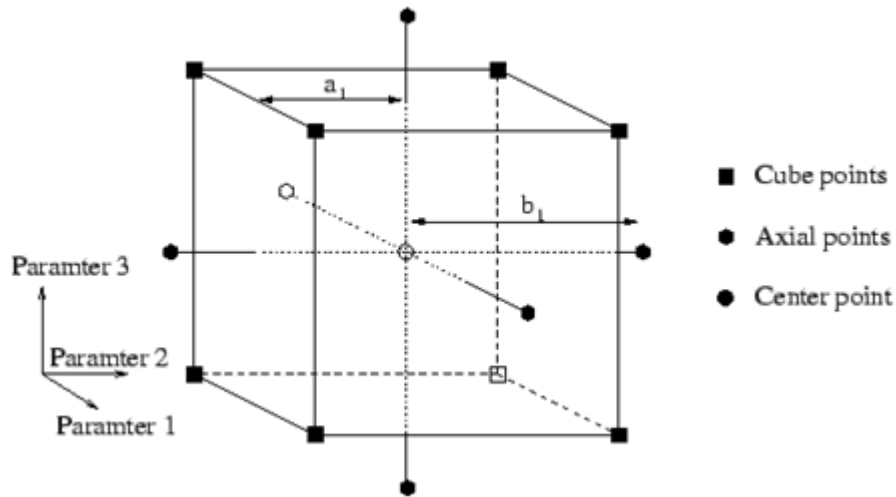
$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (2.2)$$

Burada, Y cevap değişkenini, X_i faktörleri, β_0 sabiti ve β_i faktörlerin katsayılarını göstermektedir [99].

İki düzeyli deney tasarımlarında bağımsız değişkenlerin düzeylerini belirlemek çok önemli bir noktadır. Eğer düşük ve yüksek düzey arasındaki aralık çok dar ise aslında anlamlı bir faktör anlamsız olarak değerlendirilebilir veya tam tersi bir durumda, iki düzey arasındaki aralık çok geniş ise normal şartlar altında anlamsız bir faktör anlamlı olarak değerlendirilebilir ve diğer faktörlerin etkilerini maskeleyebilir [100].

2.5.3 Merkezi bileşik deney tasarımı

Üç faktörlü merkezi bileşik deney tasarımlarında yanıt yüzeyin alacağı şekil, küp içerisinde farklı noktalarda deney yapılarak belirlenmeye çalışılır. Sözü geçen tasarım noktaları, üç boyutlu uzayda bir küpün köşelerinde veya eksenleri üzerinde bulunur (Şekil 2.4).

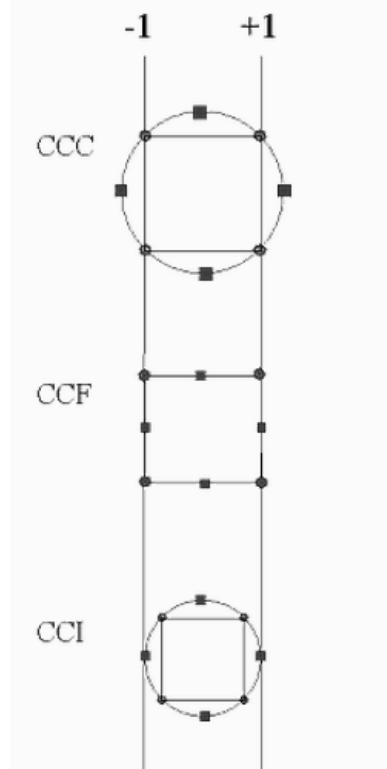


Şekil 2.4 : Merkezi bileşik deney tasarımında üç değişkenli bir sistem için deney noktaları [101].

Bu yöntem uygulanırken çeşitli deneysel noktalar kullanılmaktadır. Bu deneysel noktalar, küp noktalar (cube points), yıldız noktalar (star points-axial) ve merkez noktaları (center points) olmak üzere üç çeşittir. Küp noktaları(köşeler) için kodlanan bağımsız değişken değerleri ± 1 'dir. Yıldız noktalar(küpün dışı) için kodlanan bağımsız değişken değerleri $\pm \alpha$ 'dır. Burada, "k" bağımsız değişken sayısı olmak üzere, $\alpha = 2^{k/4}$ olarak tanımlıdır. Diğer nokta grubu ise koordinatları her zaman (0, 0, 0) olan ve küp merkezinde yeralan merkez noktalarıdır. Merkezi bileşik deney tasarımında, deneyin faktöriyel kısmı 2^k tasarım noktası, yıldız kısmı $2k$ tasarım noktası ve merkezde tekrarlanan merkez noktaların toplamı merkezi bileşik tasarım için tasarım noktalarını vermektedir [102].

Merkezi bileşik deney tasarımları, yıldız noktaların konumuna göre sınırlandırılmış, dışından çemberlenmiş ve yüzey merkezli olmak üzere üç türe ayrılırlar. (Şekil 2.5). Üç faktörlü bir tasarımda yıldız noktalar, küpün yan yüzeylerinin merkezlerinde ise ($|\alpha| = 1$) bu tasarım yüzey merkezli tasarım (CCF), küpün merkezinden $|\alpha| > 1$ mesafe uzaklıkta ise dışından çemberlenmiş merkezi tasarım (CCC), $|\alpha| = 1$ ancak küp köşe

noktaları 1'den küçükse sınırlandırılmış merkezi tasarım (CCI) olarak adlandırılır [103].



Şekil 2.5 : Merkezi bileşik deney tasarım örnekleri [103].

Tasarımda kullanılan deneme noktaları kendine özel öneme sahiptir. Faktöriyel noktalar ile etkileşimli terimlerin tahmine katkısı belirlenirken, yıldız noktalar ikinci dereceli terimlerin tahmini için bilgi sağlar. Merkez noktaları hatanın tanımlanması için gerekli olup, deneysel hataların bağımsızlığını sağlayacağı için oldukça önemlidir. [102].

Merkezi bileşik deney tasarımında üç faktörlü bir sistem için ($k=3$); 2^k faktöriyel noktalar olmak üzere $2^3=8$ tasarım noktası, yıldız noktalar $2k$ olmak üzere $2 \times 3=6$ tasarım noktası içermektedir. $\pm\alpha$ olarak kodlanan yıldız noktalar ise $\alpha = 2^{k/4}$ olmak üzere 1.68'dir Merkez noktada yapılan deneyler ise en az iki defa deney yapılması suretiyle istenilen sayıda yapılabilir.

Çizelge 2'de bu tez çalışmasında kullanılan üç faktörlü (X_1 , X_2 ve X_3) beş seviyeli (-1,68, -1, 0, +1, +1,68) sistem için dışından çemberlenmiş merkezi bileşik deney tasarımı noktalarının matrisi verilmektedir.

Çizelge 2.11 : Üç faktörlü bir sistem için Dışından Çemberlenmiş Merkezi Bileşik Deney Tasarım Noktaları.

Deney No	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	1
2	1	-1	-1
3	1	1	1
4	-1	1	1
5	-1	1	-1
6	-1	-1	-1
7	1	-1	1
8	1	1	-1
9	-1,68	0	0
10	0	-1,68	0
11	0	0	-1,68
12	0	0	1,68
13	0	1,68	0
14	1,68	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Bu çalışmada ilk aşamada, Plackett-Burman deneysel tasarım yoluyla eleme denemeleri ve bölge araştırması yapılarak bağımsız değişkenlerin (faktör) düzeyleri belirlenmiştir. Daha sonra bu değerler, daha ileri seviye deney tasarım yöntemi olan dıştan çemberlenmiş merkezi bileşik deney tasarımında kullanılarak, kabak çekirdeği tohumlarından yağ eldesinde etkili olduğu düşünülen parametrelerin (sıcaklık, süre, enzim miktarı) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.6 Literatürde Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Literatürde enzimatik sulu ekstraksiyon ile enzim ya da enzim karışımları kullanılarak çeşitli bitki ve yağlı tohumlardan yağ eldesi üzerine birçok çalışma bulunmaktadır. Dominguez ve diğ. (1993), soya yağının enzimatik ekstraksiyonunda inkübasyon zamanının ekstraksiyon veriminde önemli etkisi olduğunu ve en uygun

sürenin 6 saat olduğunu belirlemiştir. Ayrıca enzim-yagli tohum oranının ve nem oranının da ekstraksiyon veriminde önemli etkilerinin olduğunu vurgulamıştır. Tanecik boyutunun küçük ($<1\text{mm}$) olmasını, enzimin hücre duvarına daha kolay erişebilmesi açısından ekstraksiyon verimini arttırıcı bir etken olduğunu belirtmiştir. İşlem sırasında %50-70 nem oranı (soya-su oranı 1:1-1:2) maksimum ekstraksiyon verimini sağlamıştır. Selüloz ve hemiselüloz karışımı kullanılması verimi %44'lere kadar çıkarmıştır [77].

Tano-Debrah ve diğ. (1994), Shea çekirdeklerini proteaz, selüloz ve hemiselülozdan oluşmuş enzim karışımı ile işleme tabi tutmuştur. Enzimsiz ekstraksiyonda ekstraksiyon verimi %48 iken enzimli ekstraksiyonda verim %72'ye kadar çıkmıştır. Prosesin optimum koşulları, %1 enzim konsantrasyonu, 1:2 tohum-su oranı, 4 saat ve 30°C inkübasyon sıcaklığı olarak belirlenmiştir [104].

Rosenthal ve diğ. (2001), soya tohumlarından yağ ve protein eldesinde, proteaz (Alkalaz) enziminin yağ ve protein ekstraksiyon verimini nasıl etkilediğini araştırmıştır. Alkalaz enzimiyle protein verimi %66,2, yağ verimi de %58,7 olarak belirlenmiştir. Selüloz, hemiselüloz ve pektinazla karşılaştırıldığında, proteaz ile daha yüksek ekstraksiyon verimlerine ulaşılabileceği saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, soyadan sulu ortamda enzimatik ekstraksiyon işleminde elde edilen yağ miktarı üzerine etkisi olan parametreler ve enzim aktivitesinin rolü incelenmiştir. Optimizasyonu içeren istatistiksel bir yöntem olan tepki yüzey yöntemi (RSM) kullanılmıştır. Bu yöntemle kullanılan proteaz ve selüloz gibi iki farklı enzim ile beraber enzim konsantrasyonu, hidroliz süresi, partikül büyüklüğü ve katı-sıvı oranının ekstraksiyon verimi üzerine etkileri incelenmiştir. Proses parametreleri ile ekstraksiyon verimi arasında iyi bir korelasyon olduğunu, ekstraksiyon veriminin genel olarak önceden ısıtılmış büyük partikül boyutlarındaki fraksiyonlarda artış gösterdiği tespit edilmiştir [105].

Caetano ve diğ.(2002) ayçiçek yağının ekstraksiyonunda, tohumlara ekstrüzyon ve enzimatik sulu ekstraksiyon işlemlerinin birlikte uygulanması ile verimin önemli derecede arttığını saptamışlardır. Ekstrüzyon ve enzim inkübasyon parametreleri ticari enzimler (Vizkoenzim ve Alkalaz) kullanan yüzey yöntemine karşılık oluşturulmuştur. Proses koşulları 70°C , 4 saat, ekstrüzyon dönüş hızı 180 rpm, seyreltme oranı 1:5 ve enzim miktarı %0,3 (hac/ağ) şeklinde belirlenmiştir. Ekstrüzyon, proses verimini yaklaşık %54 arttırmıştır, ve yağın sulu

ekstraksiyonunda laboratuvar enzimleri ticari enzimlere göre daha etkili olmuştur. Enzimatik sulu ekstraksiyonda maksimum ekstraksiyon verimi E122 - V2000 ve ticari enzimlerle sırasıyla, % 82 ve % 70'dir [106].

Sharma ve diğ. (2002), *Jatropha curcas* L. tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ve ultrasonikasyon uygulamasını birlikte kullanarak yağ ekstrakte etmiştir. Ultrasonikasyonun ekstraksiyondan önce ön işlem olarak yapılması yararlı bulunmuştur. 10 dakikalık ve pH 9'da yapılan ultrasonikasyonla sulu ekstraksiyon verimi %67 olarak tespit edilmiştir. pH 9'da 5 dakika ultrasonikasyon sonrasında alkali proteaz (Protezyme) enzimi ile muamele edildiğinde ekstraksiyon verimi %74'e çıkmıştır. Ayrıca ultrasonikasyon işleminin proses zamanını 18 saatten 6 saate düşürdüğü de tespit edilmiştir [70].

Hanmoungjai ve diğ.(2001) pirinç kepeğinden sulu enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile yağ eldesinde, tepki yüzey yöntemi ile reaksiyon parametrelerini optimize etmiştir. . Ticari proteaz (alkalaz) enzimi kullanarak elde edilen ekstraksiyon veriminin diğer enzimlere oranla daha yüksek çıktığı görülmüştür. Optimum koşullar: % 1 enzim konsantrasyonu, pH 9, 50 °C inkübasyon sıcaklığı ve süre 1 saat olarak belirlenmiştir. En yüksek %79 verim değerine ulaşılmıştır. Ekstraksiyon verimi üzerine enzim miktarı etkisinin yüksek, inkübasyon süresinin ve sıcaklığının pek bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen ham pirinç kepeğinin serbest yağ asidi değerinin çözücü ekstraksiyonuyla elde edilen ham yağa göre oldukça düşük bulunmuştur. Bu nedenle rafinasyonda asit giderilmesi safhasında yağ kaybı daha az olacağı öngörülmüştür. Karşılaştırılması yapılan yağların yağ asitleri bileşimlerinde fark bulunmadığı da saptanmıştır [107, 108].

Moreau ve diğ.(2004) mısır özünden mısır yağını eldesi amacıyla mısır özünü çeşitli enzimlerle 4 saat 50 °C ve 16 saat 65 °C da reaksiyona tabi tutmuşlardır. Mısır özü örneklerinden 3 farklı ticari selüloz kullanarak yaklaşık %80 ekstraksiyon verimleri ile yağ elde edilmiştir. Dört katı madde kullanıldığında ise verim %90'a yükselmiştir. Enzim kullanılmadan sadece sulu ekstraksiyon yöntemiyle ise verimin %37 olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, hekzanla ekstrakte edilmiş mısır özü yağıyla enzimatik sulu ekstraksiyon kullanılarak elde edilmiş yağın aynı özelliklerde olduğu sonucuna varılmıştır [109].

Latif ve diğ.(2008) kanola tohumlarından kanola yağı ve proteinin sulu ekstraksiyonunda Protex 7L, Multifect Pectinex FE, Multifect CX 13L ve Natuzim enzimlerini kullanmış ve etkilerini incelemiştir. Enzim kullanılmadan %16,48 yağ elde edilirken enzim katkısı ile verim % 22,2 - % 26,0 değerlerine ulaşmıştır. Geleneksel çözücü ekstrasyonu ve enzimatik sulu ekstrasyon ile elde edilen kanola yağlarının fizikokimyasal özellikleri karşılaştırılmıştır. Enzimatik yöntemle elde edilen yağın serbest yağ asidi içeriği, peroksit değeri, renk ve tokoferol (alfa, gama ve delta) konsantrasyonlarında farklılıklar gözlemlenmiştir. Ancak, iyod değeri, kırılma indisi, yoğunluk, saponifikasyon değeri ve yağ asidi bileşimlerinde önemli bir değişiklik görülmemiştir [110].

Jiang ve diğ.(2009) Alcalase 2,4L enzimi kullanarak yer fıstığının yağ ve protein ekstraksiyonunu üzerinde inceleme yapmışlardır. Optimum proses koşulları: 60 °C, pH 9,5, tohum-su oranı 1:5 (ağ/hac), enzim miktarı % 1,5 (ağ/ağ) ve inkübasyon süresi 5 saat olarak tespit edilmiştir. Bu koşullar altında, yağ ve protein hidrolizatları ekstraksiyon verimleri sırasıyla, % 79,32 ve % 71,38 olmuştur [111].

Nyam ve diğ.(2009), yağlı tohum olarak Afrika, Arabistan, güneybatı Asya ve Avustralya'da yetiştirilen kalahari kavununun kullanıldığı bir çalışmada, kavun çekirdeklerinden petrol eteri ve sulu enzimatik yöntemi ile yağ elde etmişlerdir. Bu çalışmada iki farklı enzim Flavourizm 1000 L ve Nötraz 0.8 L kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda görülmüştür ki bu yağların serbest yağ asidi, peroksit, iyot ve sabunlaşma değerleri birbirine çok yakın değerlerdedir. Yağların erime noktaları arasında yine önemli bir fark görülmemektedir. Enzimle ekstrakte edilen yağ daha açık sarı renkte, çözücü kullanılarak elde edilen yağ daha koyu renkli olmuştur [74].

Literatürde kabak çekirdeğinden yağ eldesinde enzimatik sulu ekstraksiyonun denendiği bir çalışma bulunmaktadır. Jiao ve diğ.(2014) tarafından yapılan bu çalışmada balkabağı tohumlarından mikrodalga destekli sulu enzimatik yağ ekstraksiyonu denenmiş; yağın fizikokimyasal özellikleri, yağ asidi bileşenleri ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Selülaz, pektinaz ve proteaz enzimlerinden oluşan enzim karışımının ekstraksiyon veriminde en yüksek değerlere ulaştığı gözlemlenmiştir. %1,4 enzim (ağ/ağ) konsantrasyonu, 44°C sıcaklık, 66 dakika süre ve 419 W radyasyon miktarında en yüksek ekstraksiyon verimine ulaşılmıştır (%64,17). Geleneksel Soxhlet ekstraksiyonuyla elde edilen yağ ile enzimatik sulu ekstraksiyonla elde edilen yağın arasında fizikokimyasal özellikler

açısından fark görülmemiş olup, enzimatik yöntemle elde edilen yağın oksidasyon stabilitesi daha yüksek çıkmıştır. Yine bu yağın linoleik asit içeriği (%57,33), Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen yağdan (%53,72) daha yüksektir. Ayrıca antioksidan aktivitesinin de daha güçlü olduğu gösterilmiştir [112].

Bu çalışmada, Nevşehir bölgesinde yetiştirilen mutant bir form olan kabuksuz kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesi ve ekstraksiyon parametrelerinin yüzey yanıt yöntemi ile optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Hammaddeler

Bu çalışmada kullanılan kabuksuz kabak çekirdeği tohumları (*Cucurbita pepo L. var. Styriaca*) Nevşehir ilinde yetiştirilmiş, Eylül 2014 tarihinde İstanbul Mısır Çarşısı'ndan temin edilmiştir. Tohumlar buzdolabında +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik ekstraksiyon ile yağ eldesi deneylerinde proteaz olarak, market adı Alcalase 2.5L FG olan ticari enzimi kullanılmıştır. Bu enzimler sıvı olarak Novozymes A/S (Bagsvaerd, Denmark) firmasından temin edilmiştir.

Alcalase 2,5L Type-DX enzimi; *Bacillus licheniformis* mikroorganizmalarından elde edilen özgül olmayan serin tipi bir proteazdır. Proteolitik aktivitesi 2,5 AU/gr (Anson Units/gram) olan yüksek aktiviteye sahip bir enzimdir. Enzimin aktif olduğu optimum koşullar; sıcaklık 55-70°C ve substrat tipine bağlı olarak pH 4-8 aralığıdır.

Stok çözeltileri, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) ve disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) kimyasalları ile 1/15 mol/L olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır. Bu stok çözeltileri belirli oranlarda karıştırılarak farklı pH'larda fosfat tampon çözeltileri oluşturulmuştur.

Çalışmalar sırasında enzimler ve elenmiş tohumlar buzdolabında saklanmıştır. Enzim aktivitelerinin bozulmaması için enzimler tüplere inkübasyondan hemen önce eklenmiştir. Kullanılan kimyasallar Merck Chemical Co. tarafından temin edilen yüksek saflık değerinde ve analitik kullanım amaçlı reaktiflerdendir. Ayrıca tüm deneylerde distile su kullanılmıştır.

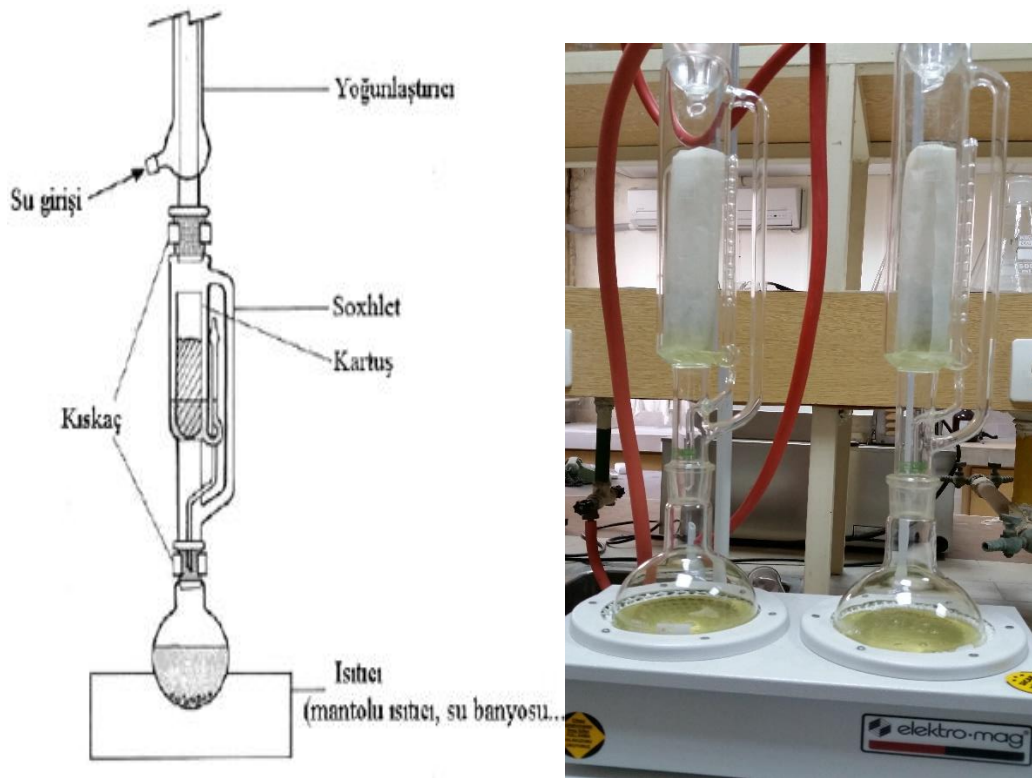
3.2 Yöntemler

3.2.1 Kabak çekirdeği tohumlarının öğütülmesi ve karakterizasyonu

Tohumlara homojenizasyon, ultrasonikasyon, ekstrüzyon, rendeleme, sıcak su banyosunda inkübasyon (hidrotermal ön işlem) ve 105°C’de fırında kurutma gibi ön işlemler uygulanmamıştır.

Tohumlar kahve değirmeninde öğütüldükten sonra eleklerden geçirilmiş ve tane boyutu 0,6-1,0 mm olan fraksiyonlar deneylerde kullanılmıştır. Kabak çekirdeği tohumlarının yağ içerikleri AOCS standartlarına göre belirlenmiştir [113].

Tohum fraksiyonlarının yağ içeriklerinin saptanmasında kullanılan Soxhlet düzeneği Şekil 3.1’deki gibidir.



Şekil 3.1 : Soxhlet düzeneği [114].

Tane boyutu 0,6-1,0 mm olan fraksiyonlarda Soxhlet düzeneği ile yağ içeriğine bakılmış ve deneylerde bu boyutlardaki tohumlarla çalışılmıştır. Yapılan tüm deneyler paralel olarak yürütülmüş olup en az iki kez tekrarlanmıştır. Bulunan ekstraksiyon verim değerleri iki sonucun ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Değerleri yakın çıkmayan paralel deneyler bir daha tekrarlanmıştır. Deneylerde ölçü birimleri, ölçülen her bir maddenin bulunduğu fiziksel hale göre belirlenmiştir.

Konsantrasyonu % olarak belirtilen madde eğer katı haldeyse ağırlıkça ‘gram’, sıvı haldeyse hacimce ‘ml’ cinsinden ölçülmüştür.

Tohumun yağ içeriğinin belirlenmesi için 13 gr öğütülmüş tohum Soxhlet cihazının ekstraktör bölümüne kartuş içinde yerleştirilmiş ve ilk sifon zamanından sonra 6 saat boyunca hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon bittikten sonra içinde yağ bulunan hekzan çözeltisi darası belli balona alınmış ve hekzan döner buharlaştırıcıda (Laborata 4000-efficient Heidolph, USA) 95°C’de uçurulmuştur. İşlem sonucunda balon tekrar tartılmış ve aradaki ölçüm farkından, elde edilen yağ miktarı üzerinden tohumun yağ içeriği hesaplanmıştır.

3.2.2 Kabak çekirdeği yağının yağ asitleri bileşimlerinin belirlenmesi

Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen kabak çekirdeği yağının yağ asidi bileşimlerini saptayabilmek için yağ asitleri öncelikle BF₃ ile metanollü ortamda ısıtılıp işlem ile metil esterleri haline dönüştürülmüştür. Daha sonra bu metil esterlerinin yağ asidi bileşimi Hewlett-Packard 5890 II (Hewlett-Packard, Waldron/Almanya) gaz kromatografisi cihazı ile belirlenmiştir. Kromatografik analiz koşulları Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

0,8 µL hacmindeki numune enjektör iğnesiyle dağıtma oranı 1:88 olan ayırma modunda enjekte edilmiştir. Kromatogramlarda yer alan piklerin tanımlanmasında, standart yağ asitlerinin metil esterlerinin aynı cihaz ve koşullarda yapılan analizlerinden elde edilmiş kromatogramlar kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 : Gaz kromatografisi analiz koşulları.

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

⁽¹⁾ Alev iyonizasyon dedektörü

⁽²⁾ 30 m x 0,32 mm, 0,5µm film kalınlığında polietilen glikol (PEG)

3.2.3 Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesi ve ekstraksiyon veriminin hesaplanması

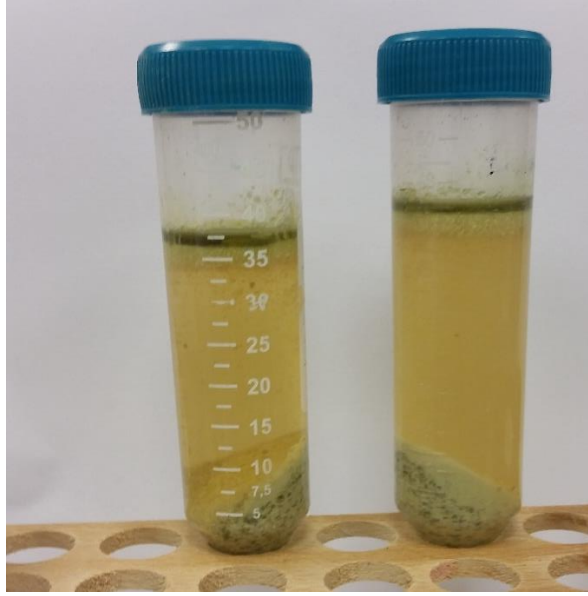
Bu araştırmada, yüksek miktarda linoleik ve oleik asit içeren kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemi ile yağ eldesinde enzim miktarı, süre ve sıcaklığın ekstraksiyon verimine etkisi incelenmiştir. Ekstraksiyon deneylerinde kullanılan çalışma prosedürü Moreu ve arkadaşlarının uyguladıkları yöntemin modifiye edilmiş halidir [109].

Deneylerde 4 gr kabak çekirdeği tohumu, 250 mL’lik dibi düz balonlara konulmuştur. Balonlara tohum:tampon çözelti oranı 1:7 (ağ/hac) olacak şekilde (yaklaşık 30 mL) pH=5 değerindeki fosfat tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Her bir balona daha sonra belli miktarda proteaz enzimi eklenmiş ve balonlar çalkalayıcılı su banyosuna yerleştirilmiştir. Balonların 200 rpm hızında, belirlenen süre boyunca belirlenen sıcaklıklarda su banyosunda inkübasyonu sağlanmıştır.

Çalkalama işlemi bittikten sonra balonlar 90°C’de sıcak su banyosunda 15 dakika işleme tabi tutularak enzimler inaktivasyonu sağlanmıştır. Daha sonra balondaki karışım santrifüj edilmek üzere 50 ml’lik polikarbonat falkon tüplerine konulmuştur.

Tüpler santrifüj cihazına (Universal 32, Hettich Zentrifugen, Germany) dengeli şekilde yerleştirilmiş ve 4000 rpm’de 1 saat boyunca santrifüj edilmiştir.

Santrifüjlenen karışımlarda 4 faz gözlenmiştir. Fazlar yukarıdan aşağı sıralandığında; en üstte serbest yağ fazı, altında kremamsı yağ-su emülsiyon fazı, ardından berrak olmayan sulu faz ve en dipte ise küspe olarak isimlendirilen katı faz bulunmaktadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 : Enzimatik ekstraksiyon sonrası fazlar.

Enzimatik sulu ekstraksiyon denemelerinde karşılaşılan en büyük zorluk; enzimatik reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan hidroliz ürünleri (protein, selüloz, hemiselüloz, pektin gibi moleküllerin hidroliz ürünleri) ile sulu ortama geçen yağ molekülleri arasında emülsiyon oluşmasıdır. Dolayısıyla yağın tamamının serbest halde yüzeyde toplanması güçleşmektedir. Oluşan emülsiyon yağ kaybına neden olmaktadır ve kırılması kolay değildir. Bu nedenle bu çalışmada ekstraksiyon verimi aşağıda açıklanan yöntemle göre belirlenmiştir.

Çözücü vasıtasıyla sıvı fazlardan geri kazanılan yağ üzerinden yağ veriminin (Vs) hesaplanması: Bu metotta çözücü kullanımı sadece tayin amaçlıdır ve yağ kaybı ile verimin düşmemesi içindir. Santrifüj tüpünde en altta yer alan katı kısım hariç diğer 3 faz, içerisinde çözücü (50 mL hekzan) bulunan 1. ayırma hunisine aktarılır. Tüpte yağ kalmasını önlemek amacıyla 10 mL hekzan ile tüpte yıkama yapılır ve yıkama çözeltisi de 1. ayırma hunisine eklenir. Bir miktar çalkalandıktan sonra fazların ayrılması beklenir. Oluşan fazlar altta sulu faz ve üstte hekzan fazıdır.

Sulu faz 1. ayırma hunisinden beher aracılığıyla alınarak içerisinde 50 mL hekzan bulunan 2. ayırma hunisine aktarılır. Karışım iyice çalkalanır, fazların ayrılması beklenir. Alttaki sıvı faz behere alınır, üstteki hekzan fazı tekrar 1. ayırma hunisine aktarılır. 2. ayırma hunisine tekrar hekzan (50 mL) ekleyerek sulu fazın hekzan ile ekstraksiyonu aynı şekilde 2-3 defa daha tekrarlanır. 1. ayırma hunisinde toplanan hekzan fazları yaklaşık 100 mL distile su ile yıkanır. Alta inen su fazı ayırma hunisinden ayrı bir behere alındıktan sonra kalan hekzan fazına sodyum sülfat tuzu (Na_2SO_4) eklenerek sabunsu yapılar katılaştırılır. Daha sonra bu hekzan fazı darası belli balona alınır. Balon döner buharlaştırıcıya yerleştirilir. Hekzanın buharlaştırılma işlemi atmosfere açık olarak 90-95°C’de yapılır. Balon içerisinde kalan az miktarda hekzanı uçurmak için sistem atmosfere kapatılarak vakum uygulanır. İşlemler sonunda balonda kalan yağ miktarı tartılarak aşağıdaki formülle V_s verimi hesaplanır.

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

Y_s = Sıvı fazlardan çözücü ile geri kazanılan yağ miktarı, gram;

Y_b = Kullanılan tohumların içerdiği başlangıç yağ miktarı, gram.

3.2.4 Deneysel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi

Enzimatik olarak yağlı tohumlardan yağ eldesinde, reaksiyon parametrelerinin (değişkenlerin) ürün bileşimi üzerine olan etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla deneysel tasarımdan yararlanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak Plakett- Burman deneysel tasarım yöntemi kullanılmış, etkilerin iki seviyeli (-1, +1) ön çalışması yapılmıştır. Daha sonra bölüm 2.5.3’te açıklandığı gibi 3 değişkenli ve 5 seviyeli dıştan çemberlenmiş merkezi bileşik küp tasarımına uygun olarak ekstraksiyon deneylerinin tasarımı yapılmıştır.

Literatür verilerine göre, enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde, pH, enzim miktarı, inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığı önemli değişkenlerdir [104-112]. Optimizasyon için parametrelerin ve parametre etki aralıklarının seçimi önemli olup, sadece ekstraksiyon sistemine göre değil ekonomiklik ve uygulanabilirlik faktörleri de dikkate alınarak seçim yapılmalıdır. Genellikle uzun ekstraksiyon sürelerinde ve yüksek enzim miktarlarında yüksek ekstraksiyon verimi elde edilir, ancak ekonomiklik ve uygulanabilirlik açısından kısa zamanda ve daha az

miktarda enzimle çalışmak tercih sebebidir. Yüksek sıcaklıkta çalışmak ekstraksiyon hızını arttırsa da sıcaklığın yükseltilmesi enzimlerin yarılanma süresini kısalttığı için optimum değerin tespiti gereklidir. Benzer şekilde, yüksek substrat konsantrasyonlarında ürünlerin denge verimlerinde artışlar sağlanabilir, buna karşılık bu yüksek konsantrasyonlar enzimleri inhibe edebilir.

Bu çalışmada değişkenler olarak enzim miktarı, inkübasyon süresi ve sıcaklığı seçilmiştir. Kullanılan enzim için pH taraması da yapılmış olup uygun değerin 5 olduğuna karar verilmiş ve değişken bir parametre olarak incelenmemiştir.

Plakett-Burman deneysel tasarımından önce, yapılan ön çalışmalar doğrultusunda, bağımsız değişken olarak seçilen parametrelerden biri olan enzim miktarının seviye değerleri, 0,5-1 mL/g tohum aralığında seçilmiştir. Tasarımda kullanılan bir diğer parametre, sürenin seviye değerleri ise 18-30 saat aralığında seçilmiştir. Üçüncü parametre olan sıcaklığın seviye değerleri ise 45-55°C aralığında seçilmiştir. Optimizasyon çalışmalarında incelenen parametrelerin seviyelerinin belirlenmesinde bu değerler dikkate alınmıştır.

3.2.5 Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu

Reaksiyon koşullarının ön optimizasyonu Plackett-Burman'a göre yapılmıştır. Ön optimizasyon deneyleri ile 3 değişkenli ve 2 seviyeli tasarıma uygun olarak, paralel deneyleri de içerecek şekilde 16 adet enzimatik sulu ekstraksiyon deneyi yürütülmüştür. Sonuçların istatistiksel analizi "R 3.1.2" programı kullanılarak yapılmıştır. Deneysel sonuçlara regresyon analizi, istatistiksel olarak önem derecesi analizi uygulanmış, daha ileri aşamadaki deneysel tasarımda küpün merkez (0) noktası belirlenmeye çalışılmıştır.

Daha ileri deneysel tasarımda, reaksiyon koşullarının optimizasyonu Yanıt Yüzey Yöntemi'ne göre yapılmıştır. Bu amaçla, 3 değişkenli ve 5 seviyeli dıştan çemberlenmiş merkezi bileşik küp tasarımına uygun olarak, paraleller deneyleri de içerecek şekilde 34 adet enzimatik sulu ekstraksiyon deneyi yürütülmüştür. Deneysel sonuçlara yine regresyon analizi, istatistiksel olarak önem derecesi analizi uygulanmış, yanıt yüzey (Response surface) ve izdüşüm (Contour plot) grafiklerinin çizimi aynı program vasıtasıyla yapılmıştır.

Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerinin tahminleri ve katsayıları programdan elde edilmiştir. Seçilen bu modelin uygunluğu varyans analizi sonuçları ile değerlendirilmiştir.

Optimum reaksiyon koşulları (Kritik değerler), “enzim miktarı”, “inkübasyon süresi” ve “inkübasyon sıcaklığı” terimleri kullanılarak, Yanıt Yüzey Yöntemi’nden tahminlenen bu eşitlik ile elde edilmiştir. Programın verdiği optimum koşullarda enzimatik sulu ekstraksiyon deneyi gerçekleştirilip programın öngördüğü ekstraksiyon verimi bulunmuştur.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Literatür araştırması bölümünde açıklandığı üzere kabak çekirdeği yağının insan sağlığına yararlı birçok özelliği bulunmaktadır. Bu çalışmanın amacı kabak çekirdeği tohumlarından yüksek verimle yağ elde etmektir. Bu amaçla kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla yağ eldesine yönelik deneyler yapılmış; enzim miktarı, inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığının ekstraksiyona etkileri incelenmiş ve maksimum yağ eldesini sağlayacak aralıkların tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar “R 3.1.2” programına girilerek Placett-Burman ve Merkezi Bileşik deney tasarımlarıyla optimum reaksiyon koşulları belirlenmiştir. Daha sonra optimum koşulda enzimatik sulu ekstraksiyon deneyi yapılmıştır. Aşağıdaki bölümlerde bu çalışmalar ve çalışmalara ait sonuçlar verilmiştir.

4.1 Kabak Çekirdeği Tohumlarının ve Yağının Karakterizasyonu

0,6-1,0 mm tane büyüklüğündeki öğütülmüş kabuksuz kabak çekirdeği tohumlarının yağ içeriği, Soxhlet ekstraktörü kullanılarak standart çalışma yöntemine göre %46,43 olarak belirlenmiştir. Bu değer literatürde kabak çekirdeği tohumlarıyla yapılan çalışmalarda verilen değerler ile uyum göstermektedir. Tohumların içerdiği yağ miktarı ve diğer özellikler kabak çekirdeği türü, iklim koşulları, çekirdeklerin hasat zamanı ve ekstraksiyon koşulları gibi etkenlere bağlı olarak farklılıklar gösterebilir.

4.2 Kabak Çekirdeği Tohumu Yağının Yağ Asitleri Bileşimi

Deneylerde kullanılan kabak çekirdeği tohumlarının yağ asidi bileşimleri Bölüm 3.2’de anlatılan yöntemle göre gaz kromatografi cihazı kullanımıyla bulunmuştur. Çizelge 4.1’de kabak çekirdeğinden elde edilen yağın yağ asidi bileşenleri gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde, kullanılan kabak çekirdeği yağı doymamış yağ asitlerinden olan linoleik asitçe zengindir ve bileşimin %46’sını oluşturur. Yüksek miktarda bulunan diğer yağ asidi ise yaklaşık %34 içerikle oleik asittir. Bu iki doymamış yağ asidi, yağ asitleri bileşenlerinin %80’ini oluşturmaktadırlar. Ayrıca

doymuş yağ asitlerinden palmitik asit ve stearik asit de kabak çekirdeği yağında bulunan diğer önemli yağ asitlerindendir.

Çizelge 4.1 : Kabak çekirdeği tohumu yağının yağ asitleri bileşimi.

Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (%)
Miristik asit (C14:0)	%0,12
Palmitik asit (C16:0)	%12,9
Palmitoleik asit (C16:1)	%0,32
Stearik asit (C18:0)	%5,1
Oleik asit (C18:1)	%33,8
Linoleik asit (C18:2)	%46,03
Linolenik asit (C18:3)	%0,54
Araşidik asit (C20:0)	%0,78
Gadoleik asit (C20:1)	%0,06
Behenik asit (C22:0)	%0,35

4.3 Kabak Çekirdeği Tohumlarından Enzimatik Sulu Ekstraksiyon ile Yağ Eldesinde Ekstraksiyon Verimine Ekstraksiyon Parametrelerinin Etkisi

Bu çalışmanın ilk bölümünde, proteaz enzimi katkılı sulu ekstraksiyon yöntemi ile kabak çekirdeği tohumlarından yağ eldesi üzerine çalışılmıştır. Yağ ekstraksiyon verimine pH, enzim miktarı, inkübasyon süresi ve inkübasyon sıcaklığı değişkenlerinin etkileri incelenmiş ve deneysel tasarım aşamasında kullanılacak olan ve yüksek değerleri sağlayan aralıkların tespiti yapılmıştır.

Literatürde benzer çalışmalarda birçok ticari enzim için 1:7 tohum:tampon çözeltisi oranının ekstraksiyon deneyleri için uygun bir çalışma koşulu olduğunu bildirmişlerdir [109]. Bu nedenle, Ekstraksiyon deneyleri, (1:7) tohum(ağ):tampon çözelti(hac) oranında gerçekleştirilmiştir. Enzimatik ekstraksiyon çalışmaları, proteaz enzimi için optimum koşulları belirlemek amacıyla 40-70°C inkübasyon

sıcaklığı, 4-36 saat inkübasyon süresi, pH 4-8 tampon çözeltisi ve 0,25-1,50 mL enzim/g tohum miktar aralıklarında yürütülmüştür.

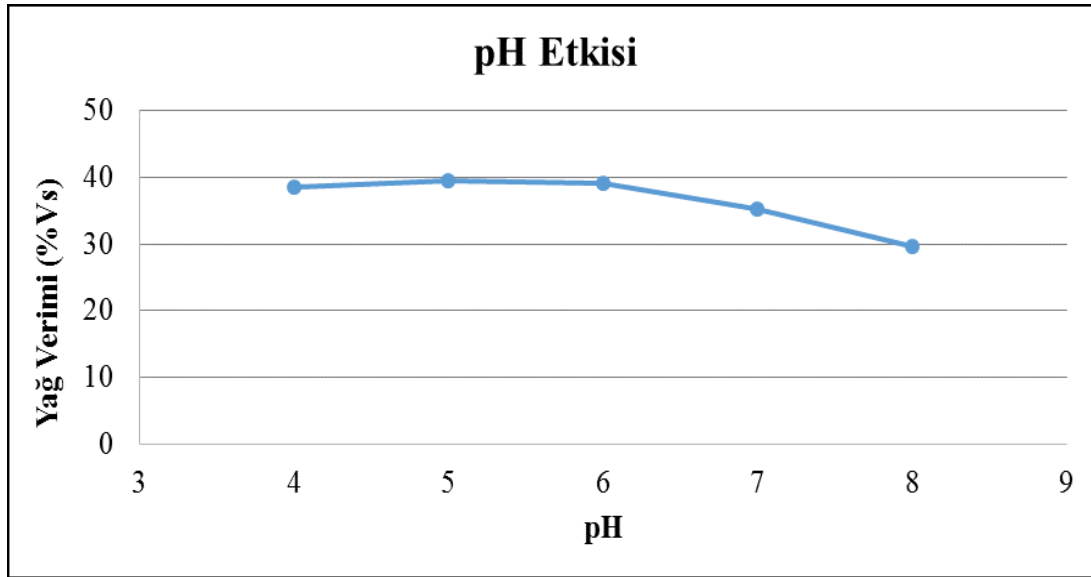
4.3.1 Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde pH aralığının ekstraksiyon verimine etkisi

Deneylerde ilk olarak proteaz enziminin yüksek ekstraksiyon verimi sağlayan pH aralığını belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla pH 4-8 değerlerinde, 0,5 mL/g tohum enzim miktarında, 50°C inkübasyon sıcaklığında 6 saat süreli ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.2’de ekstraksiyon verim değerlerinin pH ile değişimi gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 : Kabak çekirdeği tohumlarının proteaz enzimi ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine pH etkisi (50°C, 6 saat inkübasyon süresi, 0,50 mL enzim/g tohum).

Tampon çözeltisi pH değeri	Ekstraksiyon verimi (% Vs)
4	38,56
5	39,50
6	39,09
7	35,24
8	29,69

Çizelge 4.2’deki verilere göre, pH 4-8 aralığında ekstraksiyon verimi %29,69-39,50 arasında değişmektedir. Farklı pH aralıklarının ekstraksiyon verimine etkileri arasında birtakım farklılıklar görülmektedir. Şekil 4.1’de proteaz enzimi ile 6 saat süren ekstraksiyon süresinde meydana gelen ekstraksiyon verimlerinin pH ile değişimi grafiksel olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.1 : Kabak çekirdeği tohumlarının proteaz ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine pH etkisi (50°C, 6 saat, 0,50 mL enzim/g tohum).

Şekilde görüldüğü üzere, pH 4, pH 5 ve pH 6'daki verim değerleri birbirine çok yakındır. pH 4'te verim %38,56 iken pH 6'da %39,09'dur. Ancak pH 5'te bu iki değerden daha yüksek olarak verim % 39,50 değerine ulaşılmıştır. Ekstraksiyon veriminde, pH 6'dan itibaren hızlı bir düşüş gözlenmiştir. Buna göre pH değerinin, optimizasyon için değişken bir parametre olarak seçilmemesine karar verilmiştir. Sonraki aşamalarda, diğer parametrelerin ekstraksiyon verimine olan etkisi incelenirken tampon çözelti değerinin pH 5'te olmasına karar verilmiştir.

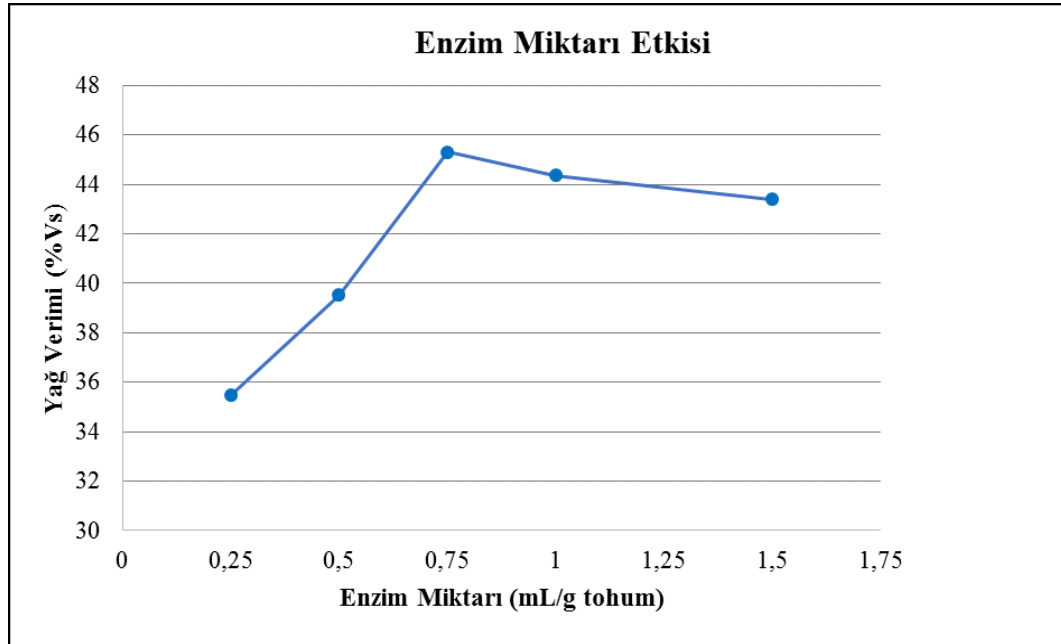
4.3.2 Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde enzim miktarının ekstraksiyon verimine etkisi

Çalışmanın bu kısmında proteaz enziminin yüksek aktivite gösterdiği enzim miktarının aralığını belirlemek hedeflenmiştir. Bir önceki çalışmadan elde edilen sonuca göre, ekstraksiyon verimlerinin enzim miktarı ile değişimi pH 5 değeri için incelenmiş, 50°C inkübasyon sıcaklığında 6 saat süreli ekstraksiyon deneyleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Şekil 4.2'de ise pH ekstraksiyon veriminin enzim miktarı ile değişim grafiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.3 : Kabak çekirdeği tohumlarının proteaz enzimi ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine enzim miktarının etkisi (pH 5, 50°C, 6 saat inkübasyon süresi).

Enzim miktarı (mL/g tohum)	Ekstraksiyon Verimi (%Vs)
0,25	35,46
0,50	39,51
0,75	45,31
1,00	44,36
1,50	43,38

Şekil 4.2'ye bakıldığında, gram tohum başına enzim miktarı 0,25 mL değerinden 0,50 mL değerine yükseldiğinde pH ortamında verim değerinin arttığı, 0,75 mL değerine kadar da artmaya devam ettiği görülmüştür. 0,75 mL'den 1,0 mL'ye yükseldiğinde ise az miktar düşüş görülse de 0,50 mL ve 0,75 mL değerlerine göre oldukça yüksektir. 1,0 mL'den 1,50 mL'ye yükseldiğinde ise ekstraksiyon verimindeki düşüş devam etmektedir. Ayrıca sonuçlara göre, 0,25 mL -0,75 mL aralığındaki artışın 0,75 mL-1,50 mL aralığındaki düşüşten daha hızlı olduğu söylenebilir.



Şekil 4.2 : Kabak çekirdeği tohumunun proteaz ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine enzim miktarının etkisi (pH 5, 50°C, 6 saat).

Bu sonuçlara göre, pH 5'te en yüksek verim 0,75 mL/g tohum enzim miktarında %45,31 olarak ölçülmüştür. Sonraki aşamada süre artışıyla enzim aktivitesini daha uzun süre sağlayıp, yağ salınımını artırarak daha yüksek verimde sonuçların alınabileceği düşünülmüştür.

4.3.3 Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde ekstraksiyon süresinin ekstraksiyon verimine etkisi

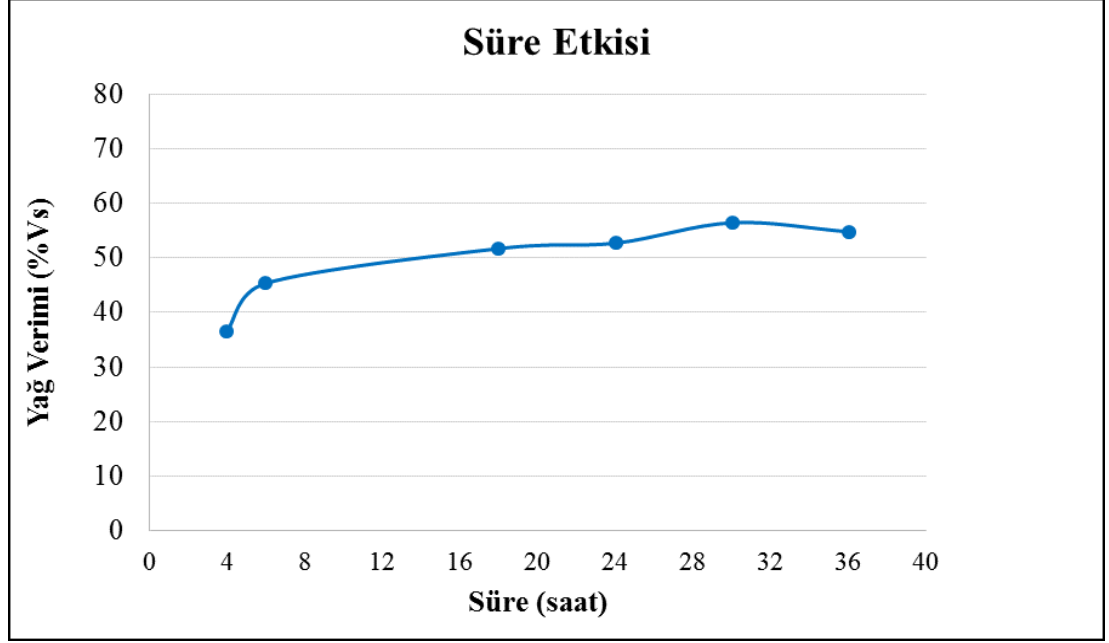
Çalışmanın bu aşamasında, proteaz enziminin aktivite gösterdiği optimum sürenin aralığını belirlemek hedeflenmiştir. Bu amaçla, proteaz enzimi ile ekstraksiyon deneyleri pH 5'te, 0,75 mL/g tohum enzim miktarında, 4, 6, 18, 24, 30, 36 saatlik sürelerde, 50 °C sıcaklıkta yürütülmüştür. Ekstraksiyon veriminde süre faktörü ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4 : Kabak çekirdeği tohumlarının proteaz enzimi ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine sürenin etkisi (pH 5, 50°C, 0,75 mL enzim/g tohum).

Süre (saat)	Ekstraksiyon Verimi (%Vs)
4	36,56
6	45,31
18	51,67
24	52,67
30	56,41
36	54,76

pH 5 ortamında çalışıldığında, ilk 6 saatlik çalışmalara kıyasla süre arttıkça ekstraksiyon veriminin arttığı, süre azaldığında ise verimin de azaldığı gözlemlenmiştir. Ekstraksiyon süresinin 4 saat'e düşürülmesiyle verim de %36,56 değerine düşmüştür. 0,75 mL/g tohum enzim miktarında 18 saat sonunda %51,67 verim elde edilirken, sürenin 24 saate uzatılması ile verimde çok az miktar artış olup %52,67 değerine ulaşmıştır. Sürenin 30 saate çıkarılması, 18-24 saat aralığındaki artışa kıyasla çok daha fazla olup %56,41 verim değerini sağlamıştır. Çalışmada, yüksek ekstraksiyon verimini sağlayan süre aralığının tayini amaçlandığı için ileri sürelerde de çalışma yapılmasının gerekliliğine karar verilmiştir. Bu amaçla, 36

saat'lik çalışma yapılmış ve %54,76 değeriyle ekstraksiyon veriminde 30 saat'e göre düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlar grafiksel olarak Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 : Kabak çekirdeği tohumunun proteaz ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine sürenin etkisi (50°C, pH 5, 0,75 mL/g tohum enzim miktarı).

Buna göre, 18-24 saat aralığında ekstraksiyon veriminin neredeyse sabit olduğu gözlenmiştir. Proteaz enzimi ile pH 5'te, 0,75 mL/g tohum enzim miktarı ile yapılan çalışmaya göre, en yüksek değer 30 saatlik çalışma sonucunda %56,41 olarak elde edilmiştir.

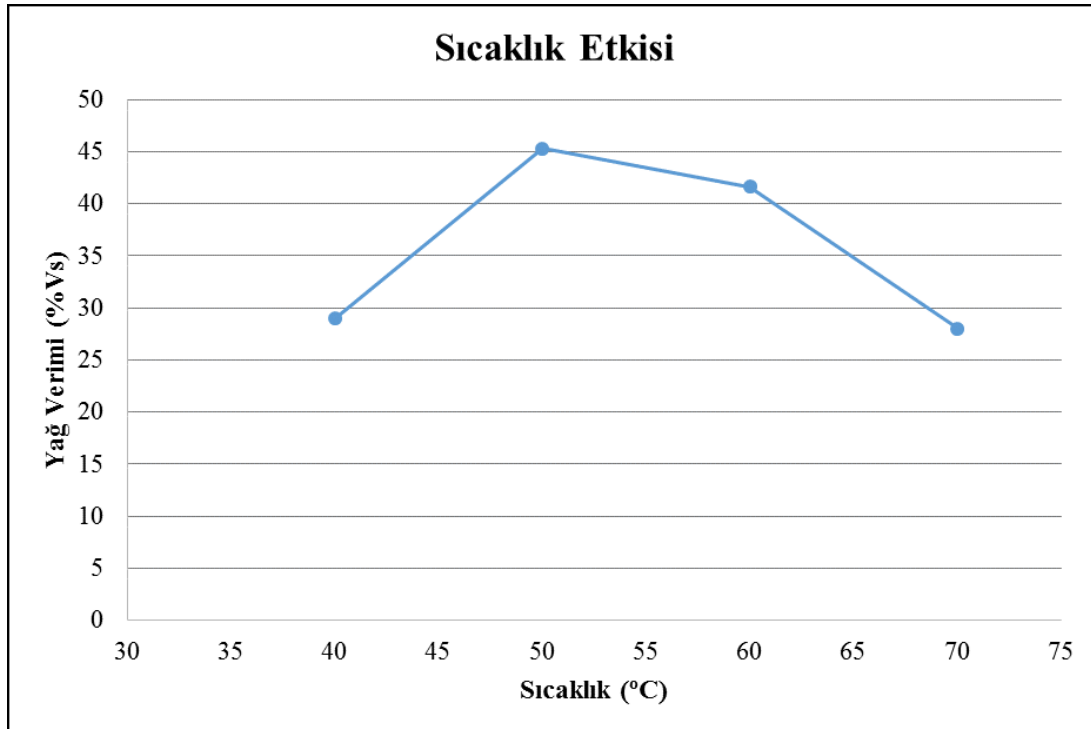
4.3.4 Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde inkübasyon sıcaklığının ekstraksiyon verimine etkisi

Deneysel çalışmanın bu kısmında, proteaz enziminin yüksek ekstraksiyon verimi sağlayan sıcaklık aralığını belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla pH 5 değerinde, 0,75 mL/g tohum enzim miktarında, 6 saat inkübasyon süresinde değişen inkübasyon sıcaklıklarında ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.5'te bu koşullarda, ekstraksiyon verim değerlerinin sıcaklık ile değişimi gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 : Kabak çekirdeği tohumlarının proteaz enzimi ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine sıcaklığın etkisi (pH 5, 0,75 mL enzim/g tohum, 6 saat inkübasyon süresi).

İnkübasyon Sıcaklığı (°C)	Ekstraksiyon Verimi (%Vs)
40	29,00
50	45,31
60	41,64
70	28,00

Elde edilen sonuçlara göre, pH 5, 0,75 mL enzim/g tohum, 6 saat inkübasyon süresinde 50°C'den daha düşük ve yüksek sıcaklıklarda verimin azaldığı görülmektedir. En yüksek verim %45,31 ile 50°C'de elde edilmiş olup, bu değer 40°C'de %29, 60°C'de ise %41,64 olarak bulunmuştur. Proteaz enzimi ile 6 saat süren ekstraksiyon süresinde meydana gelen ekstraksiyon verimlerinin sıcaklık ile değişimi grafiksel olarak Şekil 4.4'te daha net olarak görülmektedir.



Şekil 4.4 : Kabak çekirdeği tohumunun proteaz ile enzimatik sulu ekstraksiyonunda, ekstraksiyon verimine sıcaklık etkisi (pH 5, 0,75 mL enzim /g tohum,6 saat).

Bu koşullardaki ekstraksiyon işleminde sıcaklık, 40-50°C aralığında verimi artırıcı 50-70°C aralığında ise azaltıcı etkiye sahip olmuştur. Ancak Şekil 4.4'ten de görüldüğü üzere, 40-50°C aralığında artışın, 50-60°C aralığında azalmaya göre verim üzerindeki yüzde olarak etkisi daha büyüktür.

4.4 Plackett- Burman Deneysel Tasarım Yoluyla Ekstraksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Ekstraksiyon parametrelerinin (bağımsız değişkenlerin) kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyonuna etkileri ön optimizasyon çalışması olarak Plackett-Burman ile incelenmiştir. Bu çalışmada, R programının 3 değişkenli, 2 seviyeli, 2 tekrarlı deneysel tasarım için tanımladığı 16 özel tasarım noktasını içeren deney matrisi kullanılmıştır. Seviyelerin seçimi, Bölüm 4.3'te yapılmış deneylerin sonuçları dikkate alınarak yapılmıştır. Ön optimizasyon için deneylerin tasarımında seçilen değişkenler ve onların belirlenen seviye değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir. 3 değişkenli ve 2 seviyeli deney tasarımının noktaları (tekrar noktaları hariç), kodları ve değerleri ile Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 : 3 değişkenli, 2 seviyeli Plackett-Burman deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviyeler.

Değişkenler	Birim	Kod	Düşük Seviye	Yüksek Seviye
			(-1)	(+1)
Enzim Miktarı	mL/g tohum	X ₁	0,5	1
Süre	saat	X ₂	18	30
Sıcaklık	°C	X ₃	45	55

Çizelge 4.7 : Plackett-Burman deney tasarımındaki tasarım noktaları.

Deney No	Enzim miktarı (mL/g tohum)		İnkübasyon süresi (saat)		İnkübasyon sıcaklığı (°C)	
	Kod	Değer	Kod	Değer	Kod	Değer
1	-1	0,5	1	30	1	55
2	-1	0,5	-1	18	1	55
3	-1	0,5	1	30	-1	45
4	-1	0,5	-1	18	-1	45
5	1	1	-1	18	-1	45
6	1	1	1	30	-1	45
7	1	1	1	30	1	55
8	1	1	-1	18	1	55

Çizelge 4.7’de belirlenen koşullarda 3 değişkenli, 2 seviyeli, 2 tekrarlı olarak yürütülen 16 enzimatik sulu ekstraksiyon deneyinin sonunda elde edilen ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9’da gruplar halinde verilmiştir. Deney sonuçları, tekrarlı deneylerin ortalaması şeklinde ifade edilmiştir. Deneyler Bölüm 3.2.3’te belirtilen yöntemle pH 5 değerinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.8 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Enzim Miktarı: 0,5 mL/g tohum) (Deney No:1-4 Sonuçları).

		Ekstraksiyon Verimi (% Vs)
Sıcaklık, 45°C	18 saat, Deney 4	45,10
	30 saat, Deney 3	49,56
Sıcaklık, 55°C	18 saat, Deney 2	48,53
	30 saat, Deney 1	51,62

Çizelge 4.9 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Enzim Miktarı: 1 mL/g tohum) (Deney No: 5-8 Sonuçları).

		Ekstraksiyon Verimi (% Vs)
Sıcaklık, 45°C	18 saat, Deney 5	48,06
	30 saat, Deney 6	52,21
Sıcaklık, 55°C	18 saat, Deney 8	48,69
	30 saat, Deney 7	51,58

4.4.1 Plackett- Burman deneysel tasarım yoluyla ekstraksiyon parametrelerinin etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi

Çizelge 4.7’de belirtilen bağımsız değişken değerlerine karşılık elde edilen yanıt değerleri “R 3.1.2” programına girilerek istatistiksel analizi yapılmıştır. 3 değişken ve 2 seviye değerli elde edilen yanıtların değerlendirilmesinde Bölüm 2.5.2’de anlatılan ve 1. dereceden lineer yaklaşım modeli olan 2.2 no’lu eşitlikten yararlanılmıştır. Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer modellerle etkilerinin tahminleri ve katsayıları programdan elde edilmiştir. Bu değerler Çizelge 4.10’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10 : Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişken arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer modellerle etkilerin tahminleri ve katsayıları.

	Etki	Standart Hata	t değeri	p değeri
Ortalama/Kesişim	49,4788	0,2480	199,548	0,0000
Lineer				
X ₁	0,6537	0,2480	2,637	0,0217
X ₂	1,7625	0,2480	7,108	0,0000
X ₃	0,6238	0,2480	2,516	0,0271

Analiz sonuçları incelendiğinde seçilen parametrelerin ekstraksiyon veriminde etkili olduğu görülmektedir. p değerlerinin 0,01’den düşük olması katsayıların %99 güven aralığında anlamlı olduğunu göstermektedir. Bu durum oluşturulan model

denkleminin katsayılarının istatistiki olarak %99 doğru olduğunu gösterir. Süre parametresinin sıcaklık ve enzim miktarına göre lineer yaklaşımda daha etkin olduğu söylenebilir. Ancak kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik ekstraksiyon yoluyla yağ eldesi için oluşturulan model denklemin korelasyon katsayısı (R^2) 0,8417 olarak bulunmuştur. Bu değerin 1'den uzak olması bu parametreler için lineer yaklaşımdan ziyade 2.dereceden polinomial modelin daha doğru sonuç vereceğini göstermektedir. Bölüm 2.5'te de belirtildiği gibi, bu çalışmada Plackett- Burman ön optimizasyonu ile seçilen parametrelerin seviye değerlerinin ileri deneysel tasarımıda seçilecek merkez noktanın(0) belirlenmesi amacıyla kullanılması uygun bulunmuştur. Bağımsız değişkenlerin etki değerlerinin(katsayılarının) pozitif ya da negatif olma durumu bu seçimi belirlemiştir. Çizelge 4.10'daki sonuçlara göre tüm etkilerin katsayıları pozitif olup +1 seviye değerlerinin merkezi bileşik deney tasarımıda merkez(0) noktası olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

4.5 Yanıt Yüzey Yöntemi ile Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Ekstraksiyon parametrelerinin (bağımsız değişkenlerin) kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyonuna etkileri optimizasyon çalışması olarak Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) ile incelenmiştir. Dıştan çemberlenmiş merkezi bileşik deney tasarımı esas alan bu kısımda, R programının 3 değişkenli, 5 seviyeli, 2 tekrarlı deneysel tasarım için tanımladığı 17 özel tasarım noktasını içeren deney matrisi kullanılmıştır. Merkez noktanın seçimi, Bölüm 4.4'te yapılmış Plackett Burman deneylerinin sonuçları dikkate alınarak yapılmıştır. Optimizasyon için deneylerin tasarımıda seçilen değişkenler ve seviye değerleri Çizelge 4.11'de verilmiştir. 3 değişkenli ve 5 seviyeli deney tasarımıda noktaları (tekrar noktaları hariç), kodları ve değerleri ile Çizelge 4.12'de gösterilmiştir. Merkez noktada 3 tekrar deney yapılmıştır.

Çizelge 4.11 : 3 değişkenli, 5 seviyeli merkezi bileşik deney tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviyeler.

Değişkenler	Birim	Kod	Yıldız Nokta (-1,68)	Düşük Seviye (-1)	Orta Seviye (0)	Yüksek Seviye (+1)	Yıldız Nokta (+1,68)
Enzim Miktarı	mL/g tohum	X ₁	0,58	0,75	1	1,25	1,42
Süre	saat	X ₂	19,92	24	30	36	40,08
Sıcaklık	°C	X ₃	46,6	50	55	60	63,4

Çizelge 4.12 : Dıştan çemberlenmiş merkezi bileşik deney tasarımındaki tasarım noktaları.

Deney No	Enzim miktarı (mL/g tohum)		İnkübasyon süresi (saat)		İnkübasyon sıcaklığı (°C)	
	Kod	Değer	Kod	Değer	Kod	Değer
1	-1	0,75	-1	24	1	60
2	-1	0,75	1	36	1	60
3	-1	0,75	1	36	1	50
4	-1	0,75	-1	24	-1	50
5	1	1,25	-1	24	-1	50
6	1	1,25	1	36	1	60
7	1	1,25	-1	24	1	60
8	1	1,25	1	36	-1	50
9	-1,68	0,58	0	30	0	55
10	+1,68	1,42	0	30	0	55
11	0	1	-1,68	19,92	0	55
12	0	1	+1,68	40,08	0	55
13	0	1	0	30	-1,68	46,6
14	0	1	0	30	+1,68	63,4
15	0	1	0	30	0	55
16	0	1	0	30	0	55
17	0	1	0	30	0	55

Çizelge 4.12’de belirlenen koşullarda 3 değişkenli, 5 seviyeli, 2 tekrarlı olarak yürütülen 34 enzimatik sulu ekstraksiyon deneyinin sonunda elde edilen ekstraksiyon verimleri Çizelge 4.13-16’da gruplar halinde verilmiştir. Deney sonuçları, tekrarlı deneylerin ortalaması şeklinde ifade edilmiştir. Deneyler Bölüm 3.2.3’te belirtilen yöntemle pH 5 değerinde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.13 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Enzim Miktarı: 0,75 mL/g tohum) (Deney No:1-4 Sonuçları).

		Ekstraksiyon Verimi (% Vs)
Sıcaklık, 50°C	24 saat, Deney 4	52,67
	36 saat, Deney 3	54,76
Sıcaklık, 60°C	24 saat, Deney 1	45,84
	36 saat, Deney 2	47,89

Çizelge 4.14 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Enzim Miktarı: 1,25 mL/g tohum) (Deney No: 5-8 Sonuçları).

		Ekstraksiyon Verimi (% Vs)
Sıcaklık, 50°C	24 saat, Deney 5	49,74
	36 saat, Deney 8	52,22
Sıcaklık, 60°C	24 saat, Deney 7	42,96
	36 saat, Deney 6	43,77

Çizelge 4.15 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Sıcaklık 55 °C) (Deney No: 9-12 Sonuçları).

		Ekstraksiyon Verimi (%Vs)
Enzim Miktarı, 1 mL/g	19,92 saat, Deney 11	48,77
tohum	40,08 saat, Deney 12	52,10
Enzim Miktarı, 0,58 mL/g	30 saat, Deney 9	51,68
tohum		
Enzim Miktarı, 1,42 mL/g	30 saat, Deney 10	50,86
tohum		

Çizelge 4.16 : Kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yoluyla elde edilen ekstraksiyon verimleri (Enzim Miktarı: 1,0 mL/g tohum, Süre: 30 saat) (Deney No: 13-17 Sonuçları).

		Ekstraksiyon Verimi (%Vs)
Sıcaklık, 46,6 °C	Deney 13	50,89
Sıcaklık, 63,4 °C	Deney 14	47,10
Sıcaklık, 55°C	Deney 15	50,99
	Deney 16	52,17
	Deney 17	51,58

Çizelge 4.17’de tüm deneylerden elde edilen sonuçlar ve programın önerdiği model denklemden tahmin edilen değerler birlikte gösterilmiştir.

Çizelge 4.17 : Dıştan çemberlenmiş merkezi bileşik deney tasarımına göre yürütülmüş deneylerden elde edilen yanıtlar.

Deney No	Enzim miktarı (mL/g tohum)	İnkübasyon süresi (saat)	İnkübasyon sıcaklığı (°C)	Yanıt (% Verim)	
				Gözlenen	Tahmin Edilen
1	0,75	24	60	45,84	47,17
2	0,75	36	60	47,89	49,08
3	0,75	36	50	54,76	54,25
4	0,75	24	50	52,67	52,34
5	1,25	24	50	49,74	50,31
6	1,25	36	60	43,77	47,05
7	1,25	24	60	42,69	45,14
8	1,25	36	50	52,22	52,22
9	0,58	30	55	51,68	53,31
10	1,42	30	55	50,86	49,91
11	1	19,92	55	48,77	48,03
12	1	40,08	55	52,10	51,23
13	1	30	46,6	50,89	52,53
14	1	30	63,4	47,10	43,84
15	1	30	55	50,99	51,61
16	1	30	55	52,17	51,61
17	1	30	55	51,58	51,61

4.5.1 Merkezi Bileşik deneysel tasarım yoluyla ekstraksiyon parametrelerinin etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi

Bağımsız değişken değerlerine karşılık elde edilen yanıt değerleri “R 3.1.2” programına girilerek istatistiksel analizi yapılmıştır. 3 değişken ve 5 seviye değerli elde edilen yanıtların değerlendirilmesinde Bölüm 2.5.1’de anlatılan ve 2. dereceden çoklu lineer yaklaşım modelini içeren 2.1 no’lu eşitlikten yararlanılmıştır. Bu eşitlikte y yanıt değerlerini oluştururken, β_0 ortalama etki, β_i lineer, β_{ij} ikili etkileşim ve β_{ii} ise kuadratik etkileşim katsayılarını göstermektedir. Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer, kuadratik ve ikili etkileşimli

modellerde etkilerin katsayıları programdan elde edilmiştir. Bu değerler Çizelge 4.18’de, varyans analizi sonuçları ise Çizelge 4.19’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.18 : Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer, kuadratik ve ikili etkileşimli modellerde etkilerin katsayıları.

	Katsayı	Standart Hata	t değeri	p değeri
Ortalama/Kesişim	51,616	0,38135	135,3487	0,0000
Lineer				
X₁	-1,014	0,2922	-3,4703	0,0014
X₂	0,955	0,2922	3,2684	0,0024
X₃	-2,586	0,2922	-8,8520	0,0000
Kuadratik				
X₁₁	-0,407	0,2747	-1,4830	0,1472
X₂₂	-0,702	0,2747	-2,5567	0,0152
X₃₃	-1,212	0,2747	-4,4107	0,0000
Etkileşim				
X₁₂	-0,106	0,3817	-0,2784	0,7824
X₁₃	-0,191	0,3817	-0,5011	0,6195
X₂₃	-0,215	0,3817	-0,5633	0,5769
R²	0,94			

X₁= Enzim Miktarı (mL/g tohum)

X₂= Süre (saat)

X₃= Sıcaklık (°C)

X₁₁= Enzim Miktarı*Enzim Miktarı

X₂₂= Süre*Süre

X₃₃= Sıcaklık*Sıcaklık

X₁₂= Enzim Miktarı*Süre

X₁₃= Enzim Miktarı*Sıcaklık

X₂₃= Süre*Sıcaklık

Çizelge 4.18’deki sonuçlar incelendiğinde p değerine göre yapılan kıyaslamada; ekstraksiyon veriminde süre, enzim miktarı ve sıcaklığın lineer etkileri ile süre ve sıcaklığın kuadratik etkilerinin %99 güven aralığında anlamlıdır. Bu durum, bu katsayılarla oluşturulan model denkleminin katsayılarının istatistiki olarak %99 doğru olduğunu gösterir. Elde edilen katsayılara göre; ekstraksiyon veriminde sırasıyla sıcaklık (lineer), sıcaklık (kuadratik), enzim miktarı (lineer), süre (lineer) ve süre (kuadratik) etkili parametreler olarak bulunmuştur. İkili etkileşimlerin yağ eldesi işelminde p<0,01 düzeyinde etkisi olmadığı görülmüştür.. Bağımsız değişkenlerin kodlanan değerlerine göre elde edilen 2.dereceden model denklem Eşitlik 4.1’de,

gerçek değerlerin (orjinal birimlerle) yerine konulmasıyla elde edilen model denklem Eşitlik 4.2’de gösterilmiştir.

$$\% \text{ Verim} = 51,616 - 1,014 \cdot X_1' + 0,955 \cdot X_2' - 2,587 \cdot X_3' - 0,702 \cdot (X_2')^2 - 1,212 \cdot (X_3')^2 \quad (4.1)$$

$$\% \text{ Verim} = -84,848 - 4,056 \cdot X_1 + 1,331 \cdot X_2 + 4,815 \cdot X_3 - 0,019 \cdot (X_2)^2 - 0,0485 \cdot (X_3)^2 \quad (4.2)$$

Çizelge 4.19 : Varyans analizi sonuçları.

	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	p değeri
Lineer	235,581	3	78,527	33,6946	0,0000
Kuadratik	62,802	3	20,934	8,9824	0,0001
Etkileşim	1,505	3	0,502	0,2153	0,8850
Hata	79,239	34	2,331		

Kabak çekirdeğinden enzimatik sulu ekstraksiyon için oluşturulmuş model denklemin korelasyon katsayısı 0,94 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısının 1’e yakın olması model denklemin uygunluğunu göstermektedir. Varyans analizi sonuçlarında deneysel değerler ve tahmin edilen değerler arasındaki kalanlar toplamı 2,331 olarak bulunmuştur. Kalanların toplamı, bu değerlerin arasındaki farkların toplamını oluşturmakta ve seçilen modelin doğru bir model olduğunun göstergesidir. Bu toplamın sıfır ya da sıfıra yakın bir değer olması gerekmektedir.

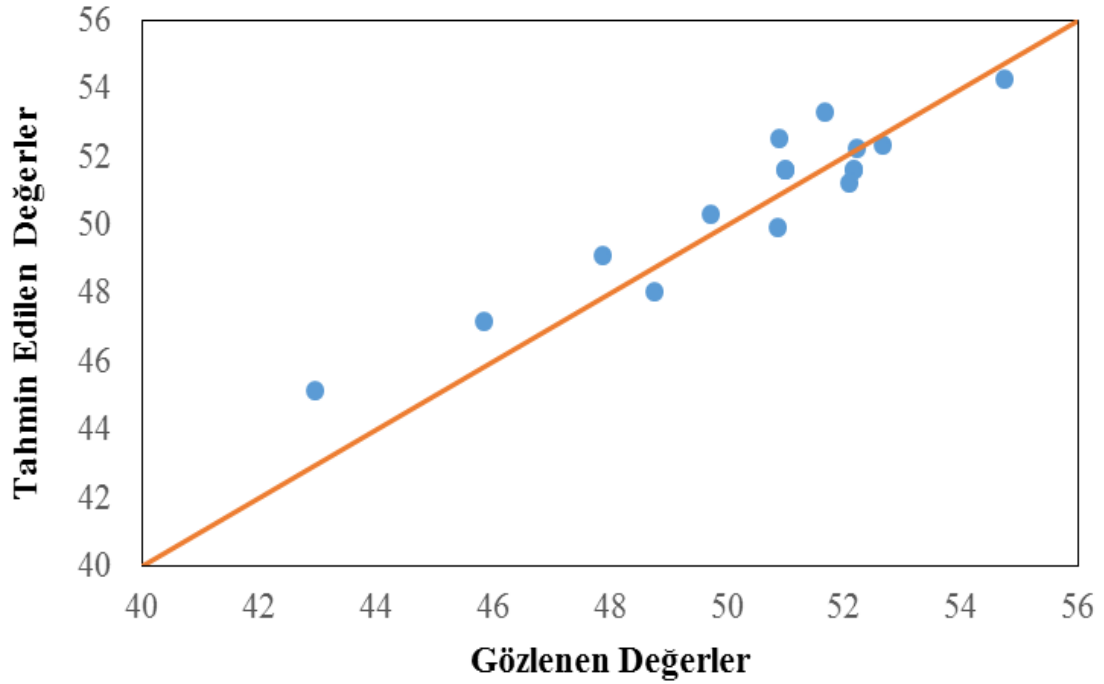
Oluşturulan yanıt yüzey modelinde enzim miktarı, süre ve sıcaklık olmak üzere 3 farklı bağımsız değişken için gözlenen minimum ve maksimum değerler ile kritik değerler Çizelge 4.20’de gösterilmektedir. Sırasıyla kod değerler olarak (-1,12 0,927 -1,061) noktasına karşılık gelen nokta optimum nokta olarak bulunmuştur. Bu noktaların gerçek birimleri ile karşılığı enzim miktarı için 0,72 mL/g tohum, süre için 35,56 saat ve sıcaklık için 49,7 °C noktasıdır.

Çizelge 4.20 : Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri.

Değişkenler	Birim	Gözlenen minimum değer	Kritik değer	Gözlenen maksimum değer
Enzim Miktarı	mL/g tohum	0,58	0,72	1,42
Süre	saat	19,92	35,56	40,08
Sıcaklık	°C	46,6	49,7	63,4

Yanıt yüzey yöntemine göre elde edilen optimum noktanın yanıt değeri %54,41 olarak bulunmuştur. Optimum noktada gerçekleştirilen deney sonucu %54,56 olarak bulunmuş olup model değerine yakındır.

Deneylerde gözlenen ve model denklemden yararlanılarak elde edilen (tahmini) yanıt değerler arasındaki ilişki Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Deneylerde elde edilen sonuçların modelden elde edilen sonuçlara oldukça yakın olduğu görülmektedir.



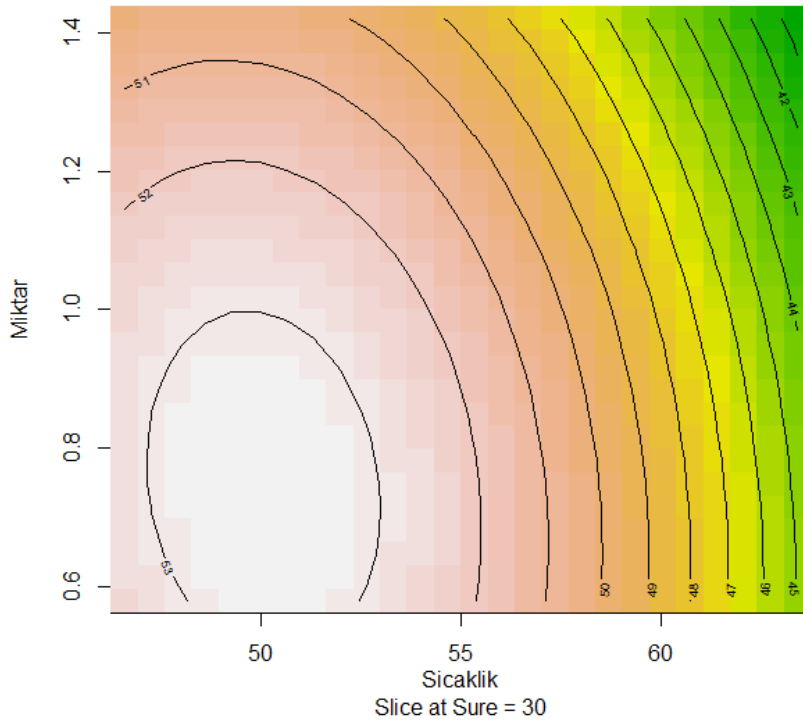
Şekil 4.5 : Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki.

4.5.2 Yanıt Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması

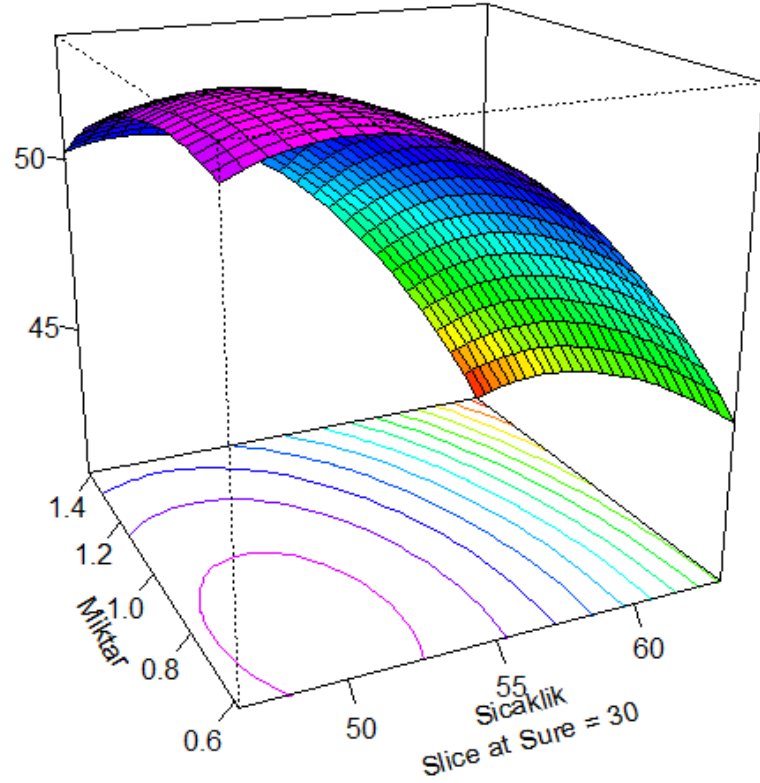
Kabak çekirdeğinden enzimatik sulu ekstraksiyon veriminin, enzim miktarı, süre ve sıcaklığa göre değişimini gösteren izdüşüm grafikleri (Contour Plot) ve yanıt yüzey grafikleri (Response Surface) Şekil 4.6.a – Şekil 4.8.a ve Şekil 4.6.b – Şekil 4.8.b’de görülmektedir. Ekstraksiyon veriminin, enzim miktarı, süre ve sıcaklığa göre değişimini

açıklayan grafiklerden, literatürde maksimum tepki olarak tanımlanan izdüşüm grafikleri elde edilmiştir. Üç değişkenin olduğu grafiklerde merkez noktanın değeri sabit tutulup diğer iki parametrenin ekstraksiyon verimi üzerine etkisi üç boyutlu olarak görülmektedir. İzdüşüm grafiklerinde görüldüğü gibi elde edilen yanıt değerlerine ait eğriler bir düzlem üzerinde gösterilir. Bağımsız değişkenlerin seviyeleri, bu düzleme ait koordinatlarda gösterilmektedir. Her bir izdüşüm eğrisi, bağımsız değişkenlere ait seviyelerin bir birleşimi olarak ifade edilen bir düzlemle yüzey arasındaki yüksekliği temsil eden özel bir değere sahiptir.

Kabak çekirdeğinden enzimatik sulu ekstraksiyon veriminin, enzim miktarı ve sıcaklığa göre değişimini gösteren izdüşüm grafiği Şekil 4.6.a'da, yanıt yüzey grafiği Şekil 4.6.b'de görülmektedir. Şekil 4.6.a incelendiğinde ekstraksiyon veriminin en yüksek olacağı enzim miktarı aralığının 0,6-0,9 mL/g tohum ve sıcaklık aralığının da 48-52 °C olduğu görülmektedir. Ayrıca, sıcaklığın artan değerlerinin enzim miktarının değişimine kıyasla ekstraksiyon veriminde daha büyük düşüşlere yol açtığı, dolayısıyla sıcaklık parametresinin daha etkili bir parametre olduğu söylenebilir.

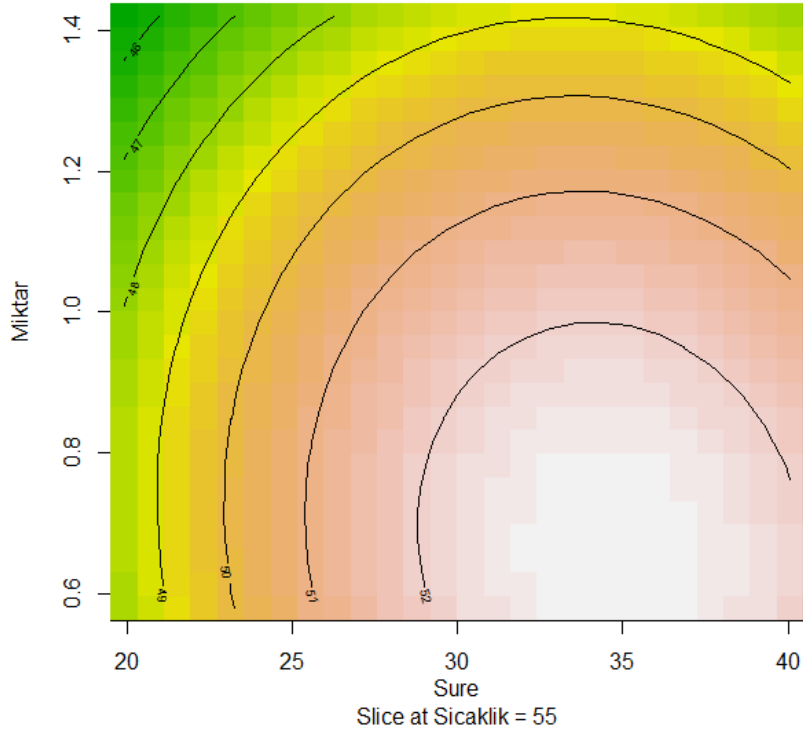


Şekil 4.6.a : Ekstraksiyon veriminin, sıcaklık ve enzim miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.

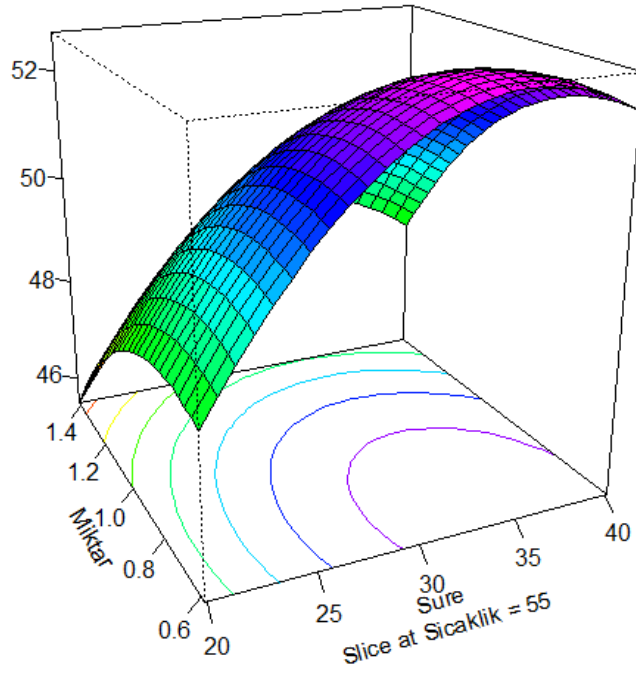


Şekil 4.6.b: Ekstraksiyon veriminin, sıcaklık ve enzim miktarı ile değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği.

Kabak çekirdeğinden enzimatik sulu ekstraksiyon veriminin, enzim miktarı ve süreye göre değişimini gösteren izdüşüm ve yanıt yüzey grafiği Şekil 4.7.a ve Şekil 4.7.b’de görülmektedir. Şekiller incelendiğinde, ekstraksiyon veriminin en yüksek olacağı enzim miktarı aralığının 0,6-0,8 mL/g tohum ve süre aralığının da 32-36 saat olduğu görülmektedir. İkili etkiler düşünüldüğünde, enzim miktarının değişiminin süreye kıyasla ekstraksiyon veriminde daha etkin bir parametre olduğu söylenebilir.

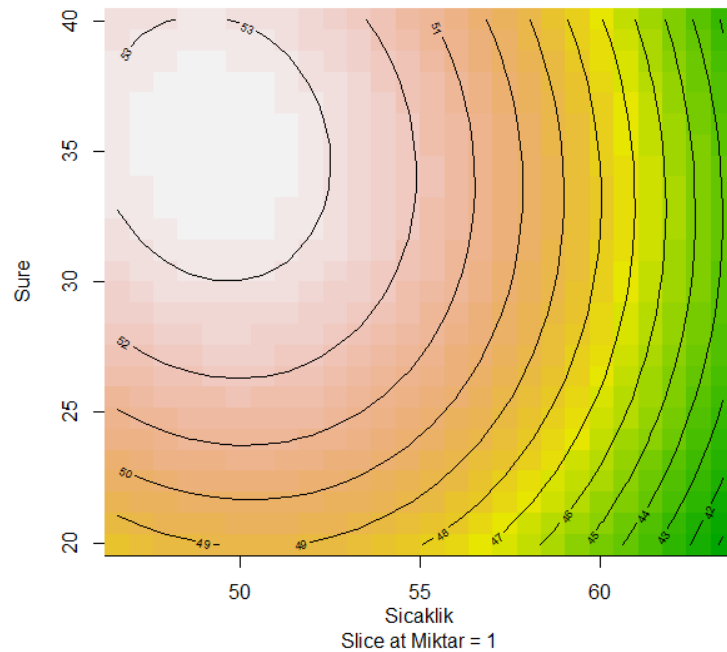


Şekil 4.7.a : Ekstraksiyon veriminin, süre ve enzim miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.



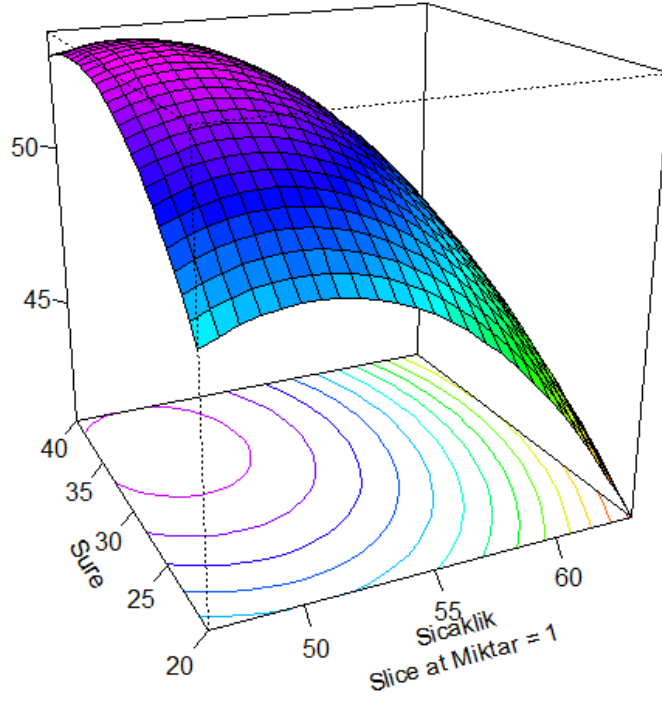
Şekil 4.7.b: Ekstraksiyon veriminin, süre ve enzim miktarı ile değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği.

Kabak çekirdeğinden enzimatik sulu ekstraksiyon veriminin, süre ve sıcaklığa göre değişimini gösteren izdüşüm grafiği Şekil 4.8.a’da, yanıt yüzey grafiği Şekil 4.8.b’de görülmektedir. Sıcaklığın ve sürenin etkisi beraber değerlendirildiğinde sıcaklığın 55°C’den yüksek değerleri için ekstraksiyon veriminde düşüşler gözlenmektedir.



Şekil 4.8.a : Ekstraksiyon veriminin, sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.

Ayrıca, Çizelge 4.18’de gösterilen lineer etki katsayılarıyla uyumlu olarak, ekstraksiyon veriminde sıcaklığın süreye göre daha etkin bir parametre olduğu anlaşılmaktadır. Buna göre, sıcaklığın 48-50°C, sürenin ise 33-36 saat aralığındaki değerleri için ekstraksiyon veriminin maksimum yanıt verdiği görülmektedir.



Şekil 4.8.b: Ekstraksiyon veriminin, sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren yanıt yüzey grafiği.

5. VARGILAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, yüksek yağ ve faydalı yağ asiti içeriğiyle insan beslenmesinde önemli bir yer tutan kabak çekirdeği tohumlarından çevre dostu, ekonomik, insan sağlığına zarar vermeyen bir yöntem kullanarak yenebilir kalitede ve yüksek verimde yağ ekstraksiyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla, enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemiyle yağ eldesinde ekstraksiyona etki eden parametrelerin iki deneysel tasarım yöntemi (Plackett-Burman tasarım, Merkezi Bileşik tasarım) kullanılarak istatistiksel olarak optimizasyonu yapılmıştır. Ülke coğrafyasında çerezlik ve yağlık kullanım amaçlı yaygın olarak tarımı yapılan bu tohumlar, Nevşehir bölgesinden temin edilmiştir.

Çalışmanın ilk kısmında, tohumların yağ içeriği, AOCS standartlarına göre Soxhlet aparatında 6 saat boyunca hegzanla paralel olarak yürütülen ekstraksiyon deneyi sonunda %46,43 olarak bulunmuştur. Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen kabak çekirdeği yağının yağ asidi bileşimi gaz kromatografi cihazı ile belirlenmiş ve yüksek oranda (~%80) oleik ve linoleik asit içerdiği görülmüştür.

Bu çalışmanın ikinci kısmında ise, kabak çekirdeği tohumlarından enzimatik sulu ekstraksiyon yöntemi ile yağ eldesi üzerinde çalışılmış ve deneysel tasarım öncesi parametrelerin ön çalışması yapılmıştır. Proteaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilen sulu ekstraksiyon deneylerinde, yağ ekstraksiyon verimine pH, enzim miktarı, süre ve sıcaklık parametrelerinin etkileri incelenmiş, en yüksek verimle yağ eldesi sağlayan aralıklar belirlenmiştir. Dört parametre ile yapılan deneylerde, pH hariç diğer üç parametrenin seçilen aralıklarda yağ eldesi üzerine etkisi olduğuna ve pH parametresinin deneysel tasarımda bağımsız değişken olarak seçilmemesine karar verilmiştir. pH çalışmalarında pH 4, pH 5 ve pH 6'da elde edilen sonuçların birbirine çok yakın çıktığı, en yüksek verimin %39,50 ile pH 5 değerinde elde edildiği görülmüştür. Buna göre, kabak çekirdeği tohumları ile Alcalase 2.5L kullanılarak yapılan önceki çalışmalar da göz önünde bulundurularak optimum pH değeri 5 olarak belirlenmiştir. Diğer üç parametre (enzim miktarı, süre, sıcaklık) için maksimum ekstraksiyon verimi sağlayan aralıklar sırasıyla; enzim miktarı için 0,5-1,0 mL/g tohum, süre için 18-30 saat ve sıcaklık için 45-55°C olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın üçüncü kısmında, Plackett-Burman deneysel tasarım yöntemi ile enzim miktarı, süre, sıcaklık gibi faktörlerin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkileri incelenmiş ve ileri deneysel tasarımda merkez noktanın daha hassas bir şekilde tespiti amaçlanmıştır. Deney matrisinin oluşturulması ve sonuçların istatistiksel analizi “R 3.1.2” programı kullanılarak yapılmıştır. Programın önerdiği, üç değişkenli (enzim miktarı, süre, sıcaklık), iki seviyeli (-1, +1) ve iki tekrarlı deneysel tasarım matrisine göre 16 adet deney yapılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümündeki deney sonuçlarına göre düşük ve yüksek seviyeler (-1, +1) sırasıyla; enzim miktarı için 0,5-1,0 mL/g tohum, süre için 18-30 saat ve sıcaklık için 45-55°C olarak seçilmiştir. Yapılan seri deneylerin sonuçlarının programa girilmesiyle 1.dereceden lineer denklem modelinin katsayıları sırasıyla; 0,6537, 1,7625 ve 0,6238 olarak bulunmuştur. p değerinin 0.05’ten düşük olması söz konusu değişkenlerin deneyde anlamlı(etkili) olduğunu ve süre parametresinin lineer yaklaşımda diğer parametrelere kıyasla en fazla etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Elde edilen katsayıların pozitif olması, enzim miktarı, süre ve sıcaklık parametrelerinin yüksek seviyeli değerlerinin, ileri aşamadaki merkezi bileşik deneysel tasarımında merkez nokta (0) olarak seçilmesinin daha uygun olacağını göstermiştir.

Bu çalışmanın dördüncü, deneysel tasarımın ise ikinci kısmında, dıştan çemberlenmiş merkezi bileşik kübik tasarıma göre deney matrisi oluşturulmuş ve Yanıt Yüzey Yöntemi uygulanarak elde edilen sonuçların istatistiksel ve grafiksel değerlendirmesi yapılmıştır. Bu amaçla, program tarafından önerilen, üç değişkenli (enzim miktarı, süre, sıcaklık), beş seviyeli (-1,68, -1, 0, +1, +1,68) ve iki tekrarlı deneysel tasarım matrisine göre 34 adet deney yapılmıştır. Merkez noktanın seçimi çalışmanın bir önceki kısmında Plackett-Burman tasarımıyla belirlenmiştir. Buna göre tüm seviyelerin değerleri sırasıyla; enzim miktarı için 0,58 mL/g tohum, 0,75 mL/g tohum, 1 mL/g tohum, 1,25 mL/g tohum, 1,42 mL/g tohum; süre için 19,92 saat, 24 saat, 30 saat, 36 saat, 40,08 saat ve sıcaklık için 46,6°C, 50°C, 55°C, 60°C ve 63,4°C olarak seçilmiştir. Bu aşamada, program tarafından önerilen 34 deneyin tamamlanmasıyla tüm sonuçlar programa girilmiş ve bu parametrelerin ekstraksiyona etkilerinin istatistiki ve grafiksel incelemesi yapılmıştır. Elde edilen istatistiki sonuçlara göre; her üç faktörün de ekstraksiyon veriminde etkin oldukları görülmektedir. Sonuç katsayılarına göre ekstraksiyon veriminde sırasıyla, sıcaklık (lineer), sıcaklık (kuadratik), enzim miktarı (lineer), süre (lineer) ve süre (kuadratik)

etkili parametreler olarak bulunmuştur. Parametreler arası etkileşimler incelendiğinde herhangi bir etkileşim gözlenmemiştir. Yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde temel(lineer) etkilerin yanıtta etkileri daha belirgin biçimde görülmüştür. Genel olarak inceleme sonucunda enzim miktarı ya da sıcaklık arttığında ekstraksiyon veriminin düştüğü, süre arttığında ise ekstraksiyon veriminin arttığı söylenebilir. Varyans analizinden yararlanılarak, parameterelerin etki katsayılarını içeren ikinci dereceden model denklem oluşturulmuş ve gözlenen ve tahmin edilen değerler arasındaki farka göre korelasyon katsayısı 0,94, kalanlar toplamı 2,331 olarak bulunmuştur. Bu değerler etkin bir tasarımın yapıldığını göstermektedir.

“R 3.1.2” programı kullanılarak kontrol edilebilir faktörlerin optimal değerleri enzim miktarı 0,72 mL/g tohum, süre 35,56 h ve sıcaklık 49,7°C olarak bulunmuştur. Optimum noktada yapılan deney sonucu %54,56 olarak bulunmuş olup modelden tahminlenen değere (%54,41) oldukça yakındır.

Ayrıca kabak çekirdeğinden enzimatik sulu ekstraksiyon ile yağ eldesinde, parameterelerin iki aşamalı deneysel tasarımının optimum noktayı belirlemede tek aşamalı Plackett-Burman sonuçlarına göre daha doğru sonuç verdiği ve sistemin 1.dereceden bir modelden ziyade 2.dereceden polinomiyal modelle açıklanabildiği görülmüştür. Bu durum, Baş ve Boyacı (2007)’nın ikinci dereceden polinomiyal modellerin gerçek yanıt yüzeyindeki eğriliği tahminlemede daha etkili olduğu sonucuyla uyusmaktadır.

Sonuç olarak, deneylerin uzun, zahmetli ve maliyetli olduğu ortamlarda deneysel tasarım ile optimum sayıda deney ile sistem analizi gerçekleştirilebilmiş ve minimum maliyet ile gereksiz deneylerden sistem arındırılarak analizler tamamlanmıştır.

Bu çalışmanın ileriye yönelik uygulamaları için, hücre duvarını ve lipofilik protein yapılarını yıkabilecek farklı tür enzim ya da enzim kokteylleri kullanılabilir. Ayrıca yağ salınımını artıracak presleme, ısıtma ya da ultrasonik ön işlemlerin sonrasında enzimatik sulu ekstraksiyon uygulamasının etkinliği araştırılmalıdır. Hidrolitik enzimatik işlem sırasında oluşan emülsiyonun ısıtma, dondurma gibi farklı yöntemlerle giderilip giderilemeyeceği incelenmelidir. Ek olarak enzimsiz ve tohum miktarı artırılarak yapılacak çalışmaların sonuçları da değerlendirilebilir.

Bu prosesi ticari açıdan daha cazip bir hale getirebilmek için enerji ve enzim maliyetlerini düşürmek için atıksu geri kazanımı ve enzim immobilizasyonu üzerine çalışmalar yapılmalıdır. Yağın yanında protein eldesini sağlandığı ve atıklarının yem ya da gübre sanayiinde değerlendirildiği bir prosesin optimizasyonu yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] **İnan, N.** (2008). *Çekirdek Kabaklarında Morfolojik Ve Moleküler Karakterizasyon*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [2] **Jeffery, C.** (1990). Systematics of the *Cucurbitaceae*: Systematics of Cucurbitaceae: an overview. Bates, D.M. ve diğ. (ed.), *Biology and utilization of the Cucurbitaceae*, (s.3-9), Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.
- [3] **Robinson, R.W. ve Decker-Walters, D.S.** (1997). Cucurbits. Crop Production Department of Horticultural Science. Cornell Univ. and D.S. Decker-Walters, The Cucurbit Network U.S.A.
- [4] **Stuart, A.** (2006). Pumpkin Seeds. Alındığı tarih: 21.03.2015, adres: <http://www.herbalsafety.utep.edu/herbs-pdfs/pumpkin.pdf>
- [5] **Yanmaz, R. ve Düzeltilir, B.** (2003). Çekirdek Kabağı Yetiştiriciliği. Türk-Koop Ekin, Tarım Kredi Kooperatifi Merkez Bilgi Yayınları, **26**, 22-24.
- [6] **Ferriol, M.** (2000). Alındığı tarih: 22.03.2015, adres <http://www.comav.upv.es/index.php/databases/eccudb>
- [7] **Vural, H., Eşiyok, D. ve Duman, İ.** (2000). Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme), Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, *Ege Üniversitesi Yayınları*, İzmir.
- [8] **Smith, B. D.** (1997). The initial domestication of *Cucurbita pepo* in the Americas 10,000 years ago. *Science*, **276**, 932-934.
- [9] **Bisognin, D.A.** (2002). Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciencia Rural*. **32**(5), 715-723.
- [10] **Paris, H.S., Daunay, M.C., Pitrat, M. ve Janick, J.** (2006). First known image *Cucurbita* in Europe, 1505-1508. *Annals of Botany*, **98**, 41-47.
- [11] **Robinson, R.W.** (2005). Squash and pumpkin. Horticultural Sciences Department New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, New York.
- [12] **Düzeltilir, B. ve Yanmaz, R.** (2004). Kabak çekirdeğinin (*Cucurbita pepo* L.) besin değeri ve sanayide kullanım olanakları, *Popüler Bilim Dergisi*, **11**(125), 19-24.
- [13] **Paris, H.** (2001). History of the cultivar-groups of *Cucurbita pepo*. Horticultural Reviews, **25**, 71-90.
- [14] **Janick, J. and Paris, H.S.** (2006). The cucurbit images (1515-1518) of the Villa Farnesina, Rome. *Annals of Botany*, **97**, 165-176.

- [15] **Zraidi, A., Pachner, M. ve Lelley, T.** (2003). On the genetics and histology of the hull-less character of Styrian oil-pumpkin (*Cucurbita pepo* L.), *Cucurbit Genetics Cooperative Report*, **26**, 57-61.
- [16] **Yanmaz, R.** (2014). “Türkiye’nin Çekirdek Kabağı Potansiyeli” [Bildiri], Yanmaz ve diğ. (Ed.), *Kayseri Valiliği Çerezlik Kabak Çalıştayı Bildirileri, 26-27 Kasım 2014*, (ss.1-12), Kayseri: İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü.
- [17] **Loy, J.B.** (1990). Hull-less seeded pumpkins: a new edible snackseed crop. J. Janick ve J.S., Simon (Ed.), *Advances in New Crops* (s. 403-407), Timber Pres, Portland, OR.
- [18] **FAO.** (2014). Kabak Üretim İstatistikleri. Alındığı tarih: 15.04.2015, adres: <http://faostat3.fao.org>
- [19] **TÜİK.** (2014). Sebze Üretim İstatistikleri. Alındığı Tarih: 15.04.2015, adres: www.tuik.gov.tr
- [20] **Yeşil, S.** (2014). “Çerezlik Kabak Üretiminde Sorun Olan Virüsler”, Yanmaz ve diğ. (Ed.), *Kayseri Valiliği Çerezlik Kabak Çalıştayı Bildirileri, 26-27 Kasım 2014*, (ss.99-108), Kayseri: İl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü.
- [21] **Ermış, S.** (2010). Ekolojinin kabuklu ve kabuksuz çekirdek kabak (*Cucurbita pepo* L.) hatlarında tohum verimi ve çerezlik kalitesine etkisi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara*, 153 s. (Basılmamış Doktora Tezi)
- [22] **Yanmaz, R., Tuncer, B. ve Yazarlı, F.** (2010). Çekirdek kabağı (*Cucurbita pepo* L.) melezlerinin çerezlik performanslarının belirlenmesi. 8. *Sebze Tarımı Sempozyumu, 23-26 Haziran*, (ss. 235-240), Van.
- [23] **Düzeltir, B.** (2004). Çekirdek kabağı (*Cucurbita pepo* L.) hatlarında morfolojik özelliklere göre tanımlama ve seleksiyon çalışmaları. *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [24] **Abak, K., Sarı, N. ve Çetiner, B.** (1997). Changes of protein, fat content and fatty acid composition in naked pumpkin seeds influenced by sowing time, *Acta Hort. (ISHS)*, **492**, 187-192.
- [25] **Jacks, T.J., Hensarling, T.P. ve Yatsu, L.Y.** (1972). Cucurbit seeds: I. Characterizations and uses of oil and proteins. A review. *Econ. Bot.*, **26**, 135-141.
- [26] **Alfawaz, M.A.** (2004). Chemical Composition and Oil Characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima*) Seed Kernels, *Food Sci. & Agric. Res. Center, King Saud Univ. Press*, **129**, 5-18.
- [27] **Günay, A.** (2005). Sebze yetiştiriliciliği. ISBN 975-00725-2-9:187
- [28] **Teotia, M.S., Ramakrishna, P., Berry, S.K., Kaur, S.** (1989). Some engineering properties of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds, *Journal of Food Engineering*, 153-162.
- [29] **Ayaz, A.** (2008). Yağlı tohumların beslenmemizdeki yeri, *Sağlık Bakanlığı Yayınları*, Ankara, Yayın No: 727.

- [30] **Seeds, pumpkin and squash seed kernel, dried, National Nutrient Database for Standard Reference, Basic Report: 12014.** (2009). Agricultural Research Service United States Department of Agriculture.
- [31] **Tsaknis, J., Lalas, S., ve Lazos, E.S.,** (1997). Characterization of crude and purified pumpkin seed oil. *Investigación*, **48**, 267-272.
- [32] **Murković, M., Hillebrand, A., Winkler, J., Leitner, E., ve Pfannhauser, W.** (1996). Variability of fatty acid content in pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.), *Eur. Food Res. Technol.*, **203**, 216–219.
- [33] **Kreft, S., Strukelj, B., Gaberscik, A. ve Kreft, I.** (2002). Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method, *Journal of Experimental Botany*, **53**(375), 1801-1804.
- [34] **Aydın, A.** (2004). Sağlığımız ve omega-3 yağ asitler, *Sağlıkta ve Hastalıkta Beslenme Sempozyumu Dizisi*, **41**, 181-189.
- [35] **Mansour, E.H., Dworschak, E., Lugasi, A., Barna, E., Gergely, A.** (1993). Nutritive value of pumpkin (*Cucurbita pepo* Kakai 35) seed products, *J. Sci. Food Agric.*, **61**, 73–78.
- [36] **Onyeike, E. N. ve Acheru, G. N.** (2002). Chemical composition of selected Nigerian oil seeds and physicochemical properties of the oil extracts. *Food Chemistry*, **77**, 431-437.
- [37] **El-Adawy, T. A. ve Taha, K. M.** (2001). Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*, **74**, 47-54.
- [38] **Follet, J.** (2002). Naked oil seed pumpkin. *Crop and Food Research*, no: 70.
- [39] **El-Soukkary, F. A. H.** (2001). Evaluation of pumpkin seed products for bread fortification. *Plant Foods for Human Nutrition*, **56**, 365-384.
- [40] **Zdunczyk, Z., Minakowski, D., Frejnagel, S. ve Flis, M.** (1999). Comparative study of the chemical composition and nutritional value of pumpkin seed cake, soybean meal and casein. *Nahrung*, **43**, 392-395.
- [41] **Sabudak, T.** (2007). Fatty acid composition of melon seed and leaf oils of pumpkin, walnut, almond, maize, sunflower and melon. *Chemistry of Natural Compounds*, **43**(4), 465-467.,
- [42] **Düzeltir, B. ve Yanmaz R.** (2004). Çekirdek kabağında (*Cucurbita pepo* L.) seleksiyon yoluyla ıslah. (Selection breeding in pumpkin for seed). V. *Sebze Tarımı Sempozyumu, 21-24 Eylül 2004*, (s.63-68), Çanakkale.
- [43] **Saraçoğlu, M.** (2006). Kabak. Alındığı tarih: 12.04.2015, adres: <http://fesif.com/haber106.html>
- [44] **Damon, M., Zhang, Z. N., Haytowitz, B. D. ve Booth, S.L.** (2005). Phylloquinone (vitamin K1) content of vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 751.
- [45] **Finley, J. W.** (2007). Selenium and glucosinolates in cruciferous vegetables: Metabolic interactions and implications for cancer chemoprevention in humans. *Acta Hort.*, **744**, 171-179.

- [46] **Winkler, C., Wirleitner, B., Schroecksnadel, K., Schennach, H. ve Fuchs, D.** (2005). Extracts of pumpkin (*Cucurbita pepo* L) seeds suppress stimulated peripheral blood mononuclear cells in vitro. *American Journal of Immunology*, **1**(1), 6-11.
- [47] **Suphakarn, V. S.** (1987). The effect of pumpkin seeds on oxalocrystalluria and urinary compositions of children in hyperendemic area. *Am. J. Nutr.*, **45**, 115-121.
- [48] **Kwon, Y. I., Apostolidis, E., Kim, Y. C. ve Shetty, K.** (2007). Health benefits of traditional corn, beans and pumpkin: In vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. *Journal of Medicinal Food*, **10**(2), 266-275.
- [49] **Fruhworth, G. O. ve Hermetter, A.** (2007). Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **109**, 1128- 1140.
- [50] **Tanış, S. ve Hekimoğlu, S.** (1999). Vitamin E'nin deri üzerindeki etkileri ve tropik kullanımı. *Kozmetoloji Dergisi*, **2**(1), 27-36.
- [51] **Achu, M.B., Fokou, E., Tchiégang, C., Fotso, M., Tchouanguep, F.M.** (2005). Nutritive value of some Cucurbitaceae oilseeds from different regions in Cameroon, *African Journal of Biotechnology*, **4** (11), 1329-1334.
- [52] **Nas, S., Gökalp, H.Y., Ünsal, M.,** (2001). Bitkisel Yağ Teknolojisi. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları, Yayın No:005, Denizli..
- [53] **Kurki, A., Bachmann, J. ve Hill, H.,** (2008). NCAT Oilseed Processing for Small Scale Producers, *Attra*.
- [54] **Kayahan, M.,** (2004). Yağlı Tohumlardan Ham Yağ Üretim Teknolojisi, TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Kitaplar Serisi No:7, Ankara.
- [55] **Kayahan, M.,** (2005). Yemeklik Yağ Rafinasyon Teknolojisi, TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Kitaplar Serisi No:10, Ankara.
- [56] **Gümüşkesen, A.S.,** (1999). Bitkisel yağ teknolojisi. Bitkisel Yağ Sanayicileri Derneği, yayın no. 5, (s.59), İzmir.
- [57] **Temelli, F.** (2009). Perspectives on Supercritical Fluid Processing of Fats and Oils, *The Journal of Supercritical Fluids*, **47**, 583–590.
- [58] **Iso, S., Uno, S., Meguro, Y., Sasaki, T. ve Yoshida, S.,** (2000): Pressure dependence of extraction behavior of plutonium(IV) and Uranium(VI) from nitric acid solution to supercritical carbon dioxide containing tributylphosphate, *Nuclear Energy*,. 1.
- [59] **Froning, G.W., Wehling, R.L., Cuppett, S.L., Pierce, M.M., Niemann, L. ve Siekman, D.K.,** (1990). Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using SC-CO₂, pp 10.
- [60] **Yen, G.C., Chen, H.W. ve Duh, P.D.,** (1998). Extraction and identification of antioxidative components from Jue Ming Zi (*Cassia tora* L.). *J. Agric. Food Chem.*, s.10.

- [61] Yamaguchi, K., Murakami, M., Nakano, H., Konosu, S., Kokura, T., Yamamoto, H., Kosaka, M. ve Hata, K., (1986). Supercritical carbon dioxide extraction of oils from Antarctic Krill. *J. Agric. Food Chem.*, pp 10.
- [62] Gülbaran, E., (1981). Kimya Mühendisliği Ünit Operasyonları Cilt-III Kütle İletimi ve Uygulamaları, *İTÜ Mühendislik Mimarlık Fakültesi Yayınları*, 137, İstanbul.
- [63] McCabe, W.L., Smith, J.C., Harriott, P. (2001). Unit Operations of Chemical Engineering (6th Edition), McGraw-Hill, Singapore.
- [64] Yemeklik Yağ Teknolojisi. (t.y.). Alındığı tarih, 28.04.2015, adres: <http://www.gidacilar.net/sivi-ve-kati-yaglarin-uretim-asamalari-f132.html>
- [65] Güçlü-Üstündağ, Ö., Temelli, F. (2004). Correlating the Solubility Behavior of Minor Lipid Components in Supercritical Carbon Dioxide, *Journal of Supercritical Fluids*, 31, 235–253.
- [66] Seader, J.D., Henley, E.J. (1998). Separation Process Principles. John Wiley and Sons, USA.
- [67] Mattil, K.F., Norris, F.A., Swern, D. (1964). Extraction of fats and oils. Bailey's industrial oil and fat products (s.637-717), 3rd edn. Wiley, London.
- [68] Subramanian, R., Bhosle, B. M. (2005). New approaches in deacidification of edible oils- a review, *J. Food Eng.*, 69, 481-494.
- [69] Environmental Protection Agency, (2001). *National emissions standards for hazardous air pollutants: solvent extraction for vegetable oil production, final rule.* 66,19005–19026.
- [70] Sharma, A., Khare, S.K., ve Gupta, M.N. (2002). Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Peanut Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 79, 215-218.
- [71] Dunford, N.T., Dunford, H.B. (2004). *Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing*, Ch. 5, AOCS Publishing.
- [72] Moura, J. M., Campbell, K., Mahfuz, A., Jung, S., Glatz, C. E. ve diğ. (2008). Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybeans and Cream De-emulsification, *J Am Oil Chem Soc.*, 85, 985–995.
- [73] Ramadan, M. F., Moersel, J., Moersel T. (2009). Oil extractability from enzymatically treated goldenberry (*Physalis peruviana L.*) pomace: range of operational variables. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 435-444.
- [74] Nyam, K.L., Tan, C.P., Lai, O.M. (2009). Physicochemical properties of Kalahari melon seed oil following extractions using solvent and aqueous enzymatic methods, *Int.l J. Food Sci.*, 44, 694-701.
- [75] Rosenthal, A., Pyle, D.L. ve Niranjan, K. (1996). Aqueous and enzymatic process for edible oil extraction. *Enzyme Microb Technology*, 19, 402–420.

- [76] **Latif, S., Anwar, F.** (2009). Effect of aqueous enzymatic processes on sunflower oil quality. *J Am Oil Chem Soc*, **86**, 393-400.
- [77] **Dominguez, H., Nunez, M.J., ve Lema, J.M.** (1993). Oil Extractability from Enzymatically Treated Soybean and Sunflower: Range of Operational Variables, *Food Chem.*, **46**, 277-284 .
- [78] **Solomon, E., Berg, L., Martin, D.** (2002). Biology Active Learner, 6th edition, Thomson Learning. Alındığı tarih: 28.03.2015, adres: http://www.dwm.ks.edu.tw/bio/activelearner/06/ch6_c1.html
- [79] **Keha, E., Küfrevioğlu, G.** (2004). Biyokimya (s.93-115). 3. Baskı, Aktif Yayınevi.
- [80] **An Introduction to Enzymes** (t.y.). Alındığı tarih: 25.03.2015, adres: http://www.biosci.ohiou.edu/introbioslab/Bios170/170_2/enzymes.htm
- [81] **Parlak, B., Güngör, A., A., Demir, Y., Demir, N.** (2008). Anadolu Orkidesi (*Orchis Anatolica*) Çiçeklerinden Proteaz Enziminin Saflaştırılması ve Peynir Üretimindeki Kullanılabilirliğinin Araştırılması. *Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs 2008, Erzurum*.
- [82] **Aslan, M., Körlü, A.** (2009). Selüloz Enziminin Denim Yıkamada Kullanımı. *Electronic Journal of Textile Technologies*, **3**(1), 11-23.
- [83] **Kaymak, B. Ü., Aksöz, N.** (2005). *Aspergillus niger* 'den pektinaz eldesi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **3**(6), 8.
- [84] **Banga, J.R., Balsa-Canto, E., Moles, C.G., Alonso, A.A.** (2003). Improving food processing using modern optimization methods. *Trends Food Sci & Tech*, **14**, 131-144.
- [85] **Saguy, I., Mishkin, M.A., Karel, M.** (1984). Optimization methods and available software, part1. *CRC Critical RevFood Sci and Nutr*, **20** (4): 275-299.
- [86] **Fisher, J. W. ve Mayne, J. W.** (1960). Some views on the statistical design of experiments. *Medical Services Journal, Canada*, **16**, 397-414.
- [87] **Myers, R.H., Montgomery, D.C.** (1995). *Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, NY.
- [88] **Thompson, D.** (1982). Response Surface Experimentation. *J Food Process Preservation*, **6**, 155-188.
- [89] **Baş, D. ve Boyacı, İ.H.**, (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J Food Eng*, **78**, 836-845.
- [90] **Koç, B. ve Ertekin, F.K.**, (2009). Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir.
- [91] **Kuehl, R.O.**, (2000). *Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and analysis*, 2nd Edition, Duxbury, New York.
- [92] **Ryan, T.P.**, (2000). *Statistical methods for quality improvement*, Second edition, John Wiley & Sons Inc. , New York

- [93] **Collins, C. A., Seeney, F. M.** (1999). *Statistical experiment design and interpretation: an introduction with agricultural examples*, Wiley, Chichester.
- [94] **Castillo, E.D.** (2007). *Process Optimization, a Statistical Approach*. Springer Science + Business Media, LLC, New York, NY.
- [95] **Box, G. E. P. ve Behnken, D. W.** (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2 (4), 455-475.
- [96] **Plackett, R. L. ve Burman, J. P.** (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325.
- [97] **Kim, J.H., Shin, H.K. ve Seo, C.S.** (2014). Optimization of the extraction process for the seven bioactive compounds in Yukmijihwang-tang, an herbal formula, using response surface methodology. *Phcog Mag*, (10), 606-613.
- [98] **Vanaja, K. ve Shobha Rani, R. H.** (2007). Design of experiments: concept and applications of Plackett-Burman design. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 24 (1), 1-23.
- [99] **Khan, M. A., Sastry, S. V., Vaithiyalingam, S. R., Agarwal, V., Nazzal, S. ve Reddy, I. K.** (2000). Captopril gastrointestinal therapeutic system coated with cellulose acetate pseudolatex: evaluation of main effects of several formulation variables. *International Journal of Pharmaceutics*, 193 (2), 147-156 .
- [100] **Ahuja, S. K., Ferreira, G. M. ve Moreira, A. R.** (2004). Application of Plackett- Burman design and response surface methodology to achieve exponential growth for aggregated shipworm bacterium. *Biotechnology and Bioengineering*, 85 (6), 666- 675.
- [101] **Plasun, R.** (1999). *Dissertation: Optimization of VLSI Semiconductor Devices*, adres: <http://www.iue.tuwien.ac.at/phd/plasun/diss.html>
- [102] **Türksen, Ö.** (2011). *Çoklu Yanıt Problemlerinin Çözümüne Bulanık ve Sezgisel Yaklaşım*. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara.
- [103] **NIST.** (t.y.). Sematech- e-Handbook of Statistical Methods, Alındığı tarih: 30.04.2015, adres: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm>
- [104] **Tano-Debrah, K., ve Ohta, K.** (1994). Enzyme-Assisted Aqueous Extraction of Fat from Kernels of the Shea Tree *Butyrospermum parkii*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71, 979-982.
- [105] **Rosenthal, A., Pyle, D.L., Niranjana, K., Gilmour, S., ve Trinca, L.** (2001). Combined Effect of Operational Variables and Enzyme Activity on Aqueous Enzymatic Extraction of Oil and Protein from Soybean, a *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 499–509.
- [106] **Caetano, M. F., Couri, S., Freitas, S. P.** (2002). Enzymatic aqueous extraction of sunflower oil from extruded kernels, *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 79, 165-169.

- [107] **Hanmoungjai, P., Pyle, D.L., ve Niranjan, K.** (2001). Enzymatic Process for Extracting Oil and Protein from Rice Bran, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **78**, 817–821.
- [108] **Hanmoungjai, P., Pyle, D.L., ve Niranjan, K.** (2002). Enzyme-Assisted Water-Extraction of Oil and Protein from Rice Bran, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **77**, 771–776.
- [109] **Moreau, R.A., Johnston, D.B., Powell, M.J., ve Hicks, K.B.** (2004). A Comparison of Commerical Enzymes for the Aqueous Enzymatic Extraction of Corn Oil from Corn Germ, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **81**(11), 1071-1075.
- [110] **Latif, S., Diosady, L.L. ve Anwar, F.,** (2008). Enzyme-assisted aqueous extraction of oil and protein from canola (*Brassica napus* L.) seeds, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **110**, 887-892.
- [111] **Jiang, L., Hua, D., Wang, Z., ve Xu, S.** (2009). Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates, *Food Sci. Technol.*, **14**, 533-540.
- [112] **Jiao, J., Li, Z., Gai, Q., Li, X., Wei, F., Fu, Y., ve Ma, W.** (2014). Microwave-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from pumpkin seeds and evaluation of its physicochemical properties, fatty acid compositions and antioxidant activities, *Food Chemistry*, **147**, 17-24.
- [113] **American Oil Chemists' Society (AOCS)** (1997). Official and recommended practices of the American Oil Chemists Society, 5th edn., AOCS Press, Champaign.
- [114] **Url-1** <<http://www.campbell.edu/faculty/jung/>>, alındığı tarih: 30.04.2015.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad : Gülizar BALCIOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul, 1989

E-posta : balcioglug@itu.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

- **Lisans** : 2012, İstanbul Teknik Üniversitesi,
Kimya-Metalurji Fakültesi,
Kimya Mühendisliği Bölümü