

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİNYAĞINDAN KONJUGE LİNOLEİK ASİT İLE
YAPILANDIRILMIŞ YAĞ ÜRETİMİ VE
OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Demet ŞELEÇİ**

Anabilim Dalı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : KİMYA MÜHENDİSLİĞİ

HAZİRAN 2007

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİNYAĞINDAN KONJUGE LİNOLEİK ASİT İLE
YAPILANDIRILMIŞ YAĞ ÜRETİMİ VE
OPTİMİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kim. Müh. Demet ŞELEÇİ
(506051006)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 7 Mayıs 2007
Tezin Savunulduğu Tarih : 13 Haziran 2007**

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Güldem ÜSTÜN
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Artemis KARAALİ
Prof.Dr. Melek TÜTER**

HAZİRAN 2007

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince, çok değerli katkılarıyla beni yönlendiren, bana her konuda yardımcı olan, her türlü desteği ve emeği esirgemeyen değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Güldem Üstün'e, Sayın Prof. Dr. Ayşe Aksoy'a ve Sayın Prof. Dr. Melek Tüter'e, çalışmam sırasında büyük yardım ve desteğini gördüğüm Yar. Doç. Dr. Sevil Yücel'e ve Dr. Oğuz Karvan'a teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans tez aşamasında yaşadığım zorlukları paylaşarak bana destek olan laboratuvar arkadaşım, Tarık Öztürk'e ve ismini sayamadığım tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca her zaman olduğu gibi bu çalışmam sırasında da yanımda olan ve bana destek olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2007

Demet ŞELEÇİ

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖZET	x
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Zeytin Meyvesi ve Özellikleri	3
2.2 Zeytinyağı	5
2.2.1 Zeytinyağı çeşitleri	5
2.2.1.1 Naturel Zeytinyağı	
2.2.1.2 Rafine Zeytinyağı	6
2.2.1.3 Riviera zeytinyağı	6
2.2.2 Zeytinyağı bileşenleri	6
2.2.3 Zeytinyağı üretimi	8
2.2.3.1 Zeytine uygulanan ön işlemler	9
2.2.3.2 Yağ ve karasuyun katı fazdan ekstraksiyonu	10
2.2.3.3 Yağ ve karasu karışımının ayrılması	11
2.2.4 Türkiye ve Dünya’da zeytincilik ve zeytinyağı sektörü	11
2.2.5 Zeytinyağının fonksiyonel özellikleri ve insan sağlığı üzerindeki etkileri	13
2.3 Konjuge Linoleik Asit	14
2.3.1 Konjuge linoleik asit oluşumu	15
2.3.2 Konjuge linoleik asit kaynakları	15
2.3.3 Gıdaların KLA içeriğini etkileyen etkenler	16
2.3.4 Gıdalarda KLA analizi	17
2.3.5 KLA’nın sağlık üzerine etkileri	18
2.3.5.1 Anti-kanserojen etkisi	18
2.3.5.2 Bağışıklık sistemine etkisi	19
2.3.5.3 Kalp ve damar hastalıkları üzerindeki etkisi	19
2.3.5.4 Anti-diyabetik etkisi	20
2.3.5.5 Vücut kompozisyonuna etkisi	20
2.4 Yapılandırılmış Yağlar	20
2.4.1 Yapılandırılmış yağ sentezlenmesinin nedenleri	21
2.4.2 Yapılandırılmış yağ sentezinde kullanılan yağ asitleri	22
2.4.2.1 Kısa zincirli yağ asitleri	23
2.4.2.2 Orta zincirli yağ asitleri	23
2.4.2.3 Uzun zincirli yağ asitleri	23
2.4.3 Yapılandırılmış yağların sentezi	24

2.4.3.1 Esterifikasyon	25
2.4.3.2 İnteresterifikasyon	26
2.4.3.3 Transesterifikasyon	27
2.4.3.4 Alkoliz	27
2.4.3.5 Asidoliz	28
2.4.4 Yapılandırılmış yağların kullanım alanları	28
2.5 Enzimatik yöntem ile yapılandırılmış yağ üretimi	30
2.5.1 Yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan lipaz enzimleri	30
2.5.2 Enzimatik prosesi ve ürün verimini etkileyen faktörler	31
2.5.2.1 Lipaz seçiminin etkisi	31
2.5.2.2 Su miktarının etkisi	33
2.5.2.3 Sürenin etkisi	33
2.5.2.4 Sıcaklığın etkisi	34
2.5.2.5 Substrat mol oranının etkisi	34
2.5.2.6 Solvent sisteminin etkisi	34
2.5.3 Kimyasal ve enzimatik yöntemlerin kıyaslanması	35
2.6 Literatürde KLA ile yapılandırılmış yağ üretimi üzerine yapılan çalışmalar	35
2.7 Tepki Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology)	41
2.7.1 Merkezi bileşik deney tasarımları	43
2.7.2 Varyans analizi (ANOVA)	45
2.7.3 Regresyon analizi	46
2.7.4 Kalanların toplamı	46
2.7.5 Korelasyon katsayısı	47
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	48
3.1 Kullanılan Hammaddeler	48
3.2 Çalışma Yöntemi	48
3.2.1 Kullanılan hammaddelerin karakterizasyonu	48
3.2.2 Zeytinyağı ile KLA'nın asidoliz reaksiyonunda uygulanan yöntem	49
3.2.3 Asidoliz ürünlerinin analizi	50
3.2.4 Deneysel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi	51
3.2.5 Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu	52
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	53
4.1 Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri	53
4.2 Tepki Yüzey Metodolojisi'nde Kullanılacak Değişken Seviye Değerlerinin Belirlenmesi	55
4.3 Tepki Yüzey Metodolojisi'ne göre Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu	61
4.4 Farklı Reaksiyon Koşullarının Zeytinyağı ile Konjuge Linoleik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Etkilerinin İstatiksel Açıdan Değerlendirilmesi	65
4.5 Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması	69
5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER	74
6. KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	86

KISALTMALAR

ANOVA	: Varyans Analizi
DAG	: Diaçilgliserol
DHA	: Dokosahekzaenoik
EFA	: Esansiyel Yağ Asitleri
EPA	: Eikosapentaenoik
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
GC	: Gaz Kromatografisi
GLA	: γ -Linolenik Asit
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
KLA	: Konjuge Linoleik Asit
L	: Uzun Zincirli Yağ Asidi
LCFA	: Uzun Zincirli Yağ Asitleri
LCT	: Uzun Zincirli Triaçilgliserol
M	: Orta Zincirli Yağ Asidi
MAG	: Monoaçilgliserol
MCFA	: Orta Zincirli Yağ Asitleri
MCT	: Orta Zincirli Triaçilgliserol
MS	: Kütle Spektrofotometresi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
S	: Kısa Zincirli Yağ Asidi
SCFA	: Kısa Zincirli Yağ Asitleri
TAG	: Triaçilgliserol
TYM	: Tepki Yüzey Metodolojisi
YY	: Yapılandırılmış Yağlar
ZY	: Zeytinyağı

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1:	Zeytinin Kimyasal Bileşimi 4
Tablo 2.2:	Zeytinyağı Yağ Asitleri Bileşimi 8
Tablo 2.3:	Yıllara Göre Dünya Zeytinyağı Üretim Rakamları 12
Tablo 2.4 :	Bazı Gıdaların KLA İçerikleri 16
Tablo 2.5:	Üç Faktörlü Sistem için Yüzey Merkezli Merkezli Bileşik Deney Tasarımı.....45
Tablo 3.1:	Gaz Kromatografik Analiz Koşulları.....49
Tablo 4.1:	KLA Yağ Asitleri Bileşimleri 54
Tablo 4.2:	Zeytinyağı Yağ Asitleri Bileşimi 55
Tablo 4.3:	Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Enzim Miktarı ile Değişimi.....56
Tablo 4.4:	Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Enzim Miktarı ile Değişimi 57
Tablo 4.5:	Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Mol Oranı ile Değişimi 59
Tablo 4.6:	Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Reaksiyon Süresi ile Değişimi ..60
Tablo 4.7:	Yüzey Merkezli Küp Tasarımında Kullanılan Bağımsız Değişkenler ve Bu Değişkenler için Kodlanan Seviyeler 62
Tablo 4.8:	Yüzey Merkezli Küp Deney Tasarımındaki Deney Tasarım Noktaları.....62
Tablo 4.9:	Zeytinyağı ile Konjuge Linoleik Asidin Asidolizinde Elde Edilen TAG Ürünlerin Yağ Asitleri Bileşimleri 63
Tablo 4.10:	Zeytinyağı ile Konjuge Linoleik Asidin Asidolizinde Elde Edilen TAG Ürünlerin Yağ Asitleri Bileşimleri 63
Tablo 4.11:	Zeytinyağı ile Konjuge Linoleik Asidin Asidolizinde Elde Edilen TAG Ürünlerin Yağ Asitleri Bileşimleri 64
Tablo 4.12:	Zeytinyağı ile Konjuge Linoleik Asidin Asidolizinde Elde Edilen TAG Ürünlerin Yağ Asitleri Bileşimleri 64
Tablo 4.13:	Yüzey Merkezli Küp Tasarımına göre Yürütülmüş Asidoliz Reaksiyonlarından Elde Edilen Tepkiler 65
Tablo 4.14:	Bağımsız Değişkenler ile Bağımlı Değişkenler Arasındaki İlişkiye Bağlı Olarak Lineer ve Kuadratik Modellerde Etkilerin Tahminleri ve Katsayıları.....66
Tablo 4.15:	Varyans Analizi Sonuçları 67
Tablo 4.16:	Bağımsız Değişkenlerin Kritik Değerleri.....68

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1:	Zeytin Meyvesi 3
Şekil 2.2:	Zeytinyağının Üretim Aşamaları 9
Şekil 2.3 :	Linoleik ve Konjüge Linoleik Asidin Kimyasal Yapıları..... 14
Şekil 2.4 :	Yapılandırılmış Yağların Genel Yapısı 21
Şekil 2.5 :	Esterifikasyon Reaksiyonu 26
Şekil 2.6 :	İki Farklı Triaçilgliserol Arasındaki Transesterifikasyon Reaksiyonu 27
Şekil 2.7 :	Bir Açilgliserol ve Bir Alkol Arasındaki Alkoliz Reaksiyonu.....28
Şekil 2.8 :	Bir Açilgliserol ve Bir Asit Arasındaki Asidoliz Reaksiyonu 28
Şekil 2.9:	Pozisyonel Seçiciliğe Sahip Olmayan Lipazların Varlığında Gerçekleşen İnteresterifikasyon Reaksiyonları 32
Şekil 2.10 :	sn-1 ve sn-3 Pozisyonunda Seçiciliğe Sahip Olan Lipazların Varlığında Gerçekleşen İnteresterifikasyon Reaksiyonları 32
Şekil 2.11:	Merkezi Bileşik Deney Tasarımında Üç Değişkenli Bir Sistem için Deney Noktaları Örneği 43
Şekil 2.12:	Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarımında Üç Değişkenli Bir Sistem için Deney Noktaları Örneği 44
Şekil 4.1:	Çalışmada Kullanılan KLA Kapsüllerinin İnce Tabaka Kromatogramı.....54
Şekil 4.2:	Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Enzim Miktarı ile Değişimi 56
Şekil 4.3:	Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Enzim Miktarı ile Değişimi 58
Şekil 4.4:	Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin KLA:Zeytinyağı Mol Oranı ile Değişimi 59
Şekil 4.5:	Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Reaksiyon Süresi ile Değişimi ..61
Şekil 4.6:	Gözlenen Değerlere Karşılık Tahmin Edilen Değerler Arasındaki İlişki 69
Şekil 4.7.a:	Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Mol Oranı ve Enzim Miktarı ile Değişimini Gösteren İzdüşüm Grafiği.....70
Şekil 4.7.b:	Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Mol Oranı ve Enzim Miktarı ile Değişimini Gösteren Tepki Yüzey Grafiği 70
Şekil 4.8.a:	Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Enzim Miktarı ve Reaksiyon Süresi ile Değişimini Gösteren İzdüşüm Grafiği.....71
Şekil 4.8.b:	Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Enzim Miktarı ve Reaksiyon Süresi ile Değişimini Gösteren Tepki Yüzey Grafiği 72
Şekil 4.9.a:	Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Mol Oranı ve Reaksiyon Süresi ile Değişimini Gösteren İzdüşüm Grafiği 73

Şekil 4.9.b : Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Mol Oranı ve Reaksiyon Süresi ile Değişimini Gösteren Tepki Yüzey Grafiği....73

SEMBOL LİSTESİ

ε	: Kalanların Toplamı
y	: Deneylerde Gözlenen Çıktı Değerleri
$\hat{y}$	: Deneysel Tasarımdan Elde Edilen Çıktı Değerleri
R^2	: Korelasyon Katsayısı
$\bar{y}$	: Deneysel Sonuçların Ortalama Değeri
Y	: Tepki
β_0	: Ortalama Etki
β_i	: Değişkenlerin Lineer Katsayıları
β_{ii}	: Değişkenlerin Kuadratik Katsayıları
β_{iii}	: Değişkenlerin Etkileşimleri için Belirlenen Katsayılar
X_i	: Bağımsız Değişkenler
X_j	: Bağımsız Değişkenler
S	: Süre
M	: Zeytinyağı/Konjuge Linoleik Asit Mol Oranı
E	: Enzim Miktarı

ZEYTİNYAĞINDAN KONJUGE LİNOLEİK ASİT İLE YAPILANDIRILMIŞ YAĞ ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU ÖZET

Bilim ve teknolojiadaki gelişmeler ile toplumlar beslenme ve gıda konusunda yeni çalışmalara yönelmektedirler. Günümüzde günlük olarak tüketilen yağ miktarının ve kompozisyonun insan sağlığı üzerindeki etkilerinin incelendiği mevcut araştırma sonuçlarına dayanarak, daha az oranda ve sağlığa yararlı yağ tüketiminin yanında kullanılan yağın kalitesinin ve özelliklerinin geliştirilmesi de büyük önem kazanmaktadır. Bu amaçla yapılandırılmış yağlar üretilerek, tüketicilere farklı özelliklerde, besin içeriği zenginleştirilmiş ve sağlığa pek çok olumlu etkisi olan yeni alternatif yağlar sunulmaktadır.

Yapılandırılmış yağlar triaçilgliserol yapısında bulunan yağ asitlerinin kompozisyonlarının veya dağılımlarının modifiye edilmesiyle elde edilen yağlardır. Fonksiyonel gıda başlığı altına girebilecek yapılandırılmış yağlar insan sağlığını olumlu yönde etkileyebilecek şekilde üretilbilirler.

Özellikle Akdeniz ülkeleri ve Türkiye Dünya zeytinyağı üretiminde ön sıralarda yer almaktadır. Zeytinyağı içerdiği çeşitli bileşenler sayesinde insan sağlığı açısından pek çok faydalı özelliğe sahip, en eski çağlardan beri yüksek oranlarda tüketilen, değerli bitkisel bir yağ çeşididir.

Konjuge linoleik asit (KLA), konjuge çift bağ içeren linoleik asidin pozisyonel ve geometrik izomerlerinin karışımını ifade eder. Genellikle tereyağı, süt, peynir, yoğurt gibi hayvansal ürünlerde bulunur. Son yıllarda yapılan çalışmalar KLA'nın insan sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, ülkemizde büyük bir üretim kapasitesine sahip olan zeytinyağının konjuge linoleik asit ile enzimatik olarak zenginleştirilmesi ve sağlığa yararlı, bir çok olumlu özelliğe sahip fonksiyonel bir gıda haline gelmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, zeytinyağı ile KLA asidoliz reaksiyonları *Thermomyces lanuginosa* lipaz enzimi varlığında hekzan ortamında gerçekleştirilmiştir. Tepki Yüzey Metodolojisi uygulanarak, reaksiyon parametrelerinin (enzim miktarı, substrat mol oranı ve sürenin) zeytinyağına katılan KLA yüzdesi üzerine olan etkileri incelenmiş ve reaksiyon koşulları optimize edilmiştir.

Üç değişkenli ve üç seviyeli Yüzey Merkezli Küp Deney Tasarımı kullanılarak yürütülmüş deneyler sonucunda, optimum reaksiyon koşulları %7,1 enzim miktarı, 1:6,6 ZY:KLA mol oranı ve 7,9 saat reaksiyon süresi olarak saptanmıştır. Bu koşullarda, zeytinyağından içeriğinde %48,2 konjuge linoleik asit bulunan yapılandırılmış triaçilgliseroller elde edilebilmiştir.

PRODUCTION AND OPTIMIZATION OF STRUCTURED LIPID WITH OLIVE OIL AND CONJUGATED LINOLEIC ACID SUMMARY

With developments in science and technology, communities make new studies about food and nutrition. Depending on the results of the scientific researches in which the effects of composition and content of lipids on the health are examined, decreasing of the fat and oil content consumed in diet, consuming lipids which have more beneficial health benefits, and improving the quality and special features of lipids are also becoming important. Structured lipids are developed for that purpose and enriched new alternative oils and fats which have different features and beneficial effects on the health can be available.

Structured lipids are triacylglycerols that have been modified by incorporation of new fatty acids or changing the position of naturally existing fatty acids. Structured lipids which can be defined as functional food can be produced in a way that has beneficial effects on the health.

The countries in Mediterranean and Turkey are the leading countries in olive oil production in all over the world. Olive oil has important health benefits, since including different components. It is an important vegetable oil sort which has been consumed since the oldest times.

Conjugated linoleic acid (CLA) is a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid with conjugated double bond. CLA mainly exists in foodstuffs of ruminant origin such as butteroil, milk, cheese and yoghurt. The last studies show that CLA has beneficial health benefits.

In this study, enrichment of olive oil with CLA by using lipase as a catalyst and develop a functional food that has various health benefits and functions are aimed. For this purpose, the acidolysis reaction of olive oil with CLA in the presence of *Thermomyces lanuginosa* lipase and hexzan was studied in detail. The effects of enzyme amount, substrate molar ratio and time on incorporation yield and ratio are investigated and optimized by Response Surface Methodology.

Among all the experimental results which are occurred by Face Centered Cube Experimental Design (3 parameters and 3 levels) for optimization, the optimum reaction conditions are found as %7,1 enzyme amount, a substrate molar ratio of 1:6,6 of OO:CLA and reaction time of 7,9 hour. In these conditions the incorporation ratio of conjugated linoleic acid into olive oil is determined as %48,2.

1. GİRİŞ

Bilim ve teknolojiadaki hızlı gelişmeler toplumların her türlü bilgiye en kısa ve kolay şekilde ulaşmalarını sağlamaktadır. Bu gelişmeler sonucunda toplumlar mal ve hizmet tüketiminde daha hassas olmaya başlamışlardır. Talep edilen mal ve hizmetlerin niteliklerine yönelik beklentiler her geçen gün değişim göstermektedir. Bu değişimler ve artan nüfus gıda maddelerine olan ilgiyi de farklı bir şekilde yönlendirmiş ve alternatif gıda ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Yağlar insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptirler ve sağlık açısından son derece faydalı gıda maddelerinin başında gelmektedirler. Fakat sağlığa olan faydalarının yanında doğru tüketilmediklerinde obezite, kalp ve damar hastalıkları gibi rahatsızlıklara neden olabilmektedirler. Halbuki yağların özellikleri olumlu şekilde geliştirilerek sağlığa daha faydalı ürünler elde edebilmek son yıllarda yapılan çalışmalarla mümkün olabilmektedir. Bunların arasında yapılandırılmış yağların üretimine ilişkin çalışmalar başta gelmektedir.

Yapılandırılmış yağlar, triaçilgliserol üzerine yeni yağ asitlerinin yerleştirilmesi veya doğal yapısındaki yağ asitlerinin pozisyonlarının ve/veya yağ asitlerinin bileşimlerinin değiştirilmesi ile elde edilen triaçilgliserollerdir. Yağların özelliklerini istenilen şekilde değiştirebilmek amacı ile farklı yöntemlerle yapılandırılmış yağ üretilebilir. Yapılandırılmış yağ üretiminde en çok kullanılan yöntem enzimatik interesterifikasyondur. Bu reaksiyonlar lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleşirler. Enzimatik reaksiyonlar daha ılımlı koşullar altında çalışmaya imkan sağladıkları ve son ürünlerdeki yağ asidi dağılımının kontrolüne izin verdikleri için tercih edilirler.

Zeytinyağı, sahip olduğu yağ asidi kompozisyonu, hidrokarbonlar ve steroller gibi bileşenler sayesinde insan sağlığı açısından oldukça önemli bir yağ çeşididir. Özellikle Akdeniz kıyılarında üretimi gerçekleştirilen zeytinyağı dünyanın bilinen en eski ve önemli yağlarından biridir.

Konjuge linoleik asit (KLA) konjuge çift bağ içeren linoelik asidin pozisyonel ve geometrik izomerlerinin karışımını ifade eder. Genellikle geviş getiren hayvanların etlerinde ve bu hayvanların süt, tereyağı gibi ürünlerinde bol miktarda bulunur. Son

yıllarda yapılan alışmalar KLA'in insan sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Literatürde enzimatik olarak yapılandırılmış yağların üretimine ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak zeytinyağından KLA ile yapılandırılmış yağ üretimi konusunda yapılmış tek bir çalışmaya rastlanılmıştır. Bu nedenle bu çalışmada, ülkemizde yüksek oranlarda üretilen zeytinyağının lipaz enzimi kullanılarak KLA ile zenginleştirilmesi ve Tepki Yüzey Metodolojisi ile reaksiyon parametrelerinin optimize edilmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Zeytin Meyvesi ve Özellikleri

Zeytin, zeytingiller (Oleaceae) familyasından Akdeniz iklimine özgü *Olea europaea* olarak bilinen zeytin ağacının meyvesidir [1,2]. Zeytin ağacı 20 metreye kadar boyolanabilen, sık dallı, yayvan tepeli, herdem yeşil yapraklı bir ağaçtır. Bazen 1000 yıldan daha uzun süre meyve verebilen zeytin ağacının yaprakları birbirine çaprazdır. Yapragını dökmeyen zeytin ağacının oval biçimli, ince uzunca yapraklarının üstü koyu yeşil ve altı gümüşü renktedir [1].

Zeytinin fiziksel özellikleri ve kimyasal bileşimi elde edilecek son ürünün kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir [3]. Zeytin ağacı meyvesi tek çekirdekli ve etlidir. Olgun meyve ağırlığı 1,5 ile 13 g arasında değişmektedir. Meyve ağırlığının %13-30'unu sert kabuklu çekirdek (endocarp), %65-83'ünü meyve eti (mesocarp) ve %1,5-3,5'ini deri (epicarp) oluşturmaktadır [1]. Şekil 2.1'de zeytin meyvesine ait bir fotoğraf görülmektedir.



Şekil 2.1: Zeytin Meyvesi [4]

Zeytin meyvesinin temel bileşenleri su, yağ, karbonhidratlar, proteinler, vitaminler, organik asitler, renk maddeleri ve inorganik maddelerdir. Zeytin bileşiminin büyük bir kısmı su ve yağdan oluşmaktadır [1]. Zeytinde bulunan yağın önemli bir bölümü meyve eti kısmında yer almakta ve meyvenin bünyesindeki mevcut suyla emülsiyon halinde bulunmaktadır [5]. Zeytin C vitamini içeren ve bileşiminde birçok fenolik madde bulunduran bir meyvedir. Bu maddeler içinde en önemlisi zeytin meyvesinde acılığa yol açan oleoropin adlı fenolik bileşiktir. Zeytinin yağ ve diğer bileşenlerinin kompozisyonu değişkendir ve bu değişkenlik iklim, toprak, budama, gübreleme,

ağaca yapılan işlemler ve hasat yöntemleri gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Zeytinin kimyasal bileşimi genel olarak Tablo 2.1’de gösterilmektedir [1].

Tablo 2.1: Zeytinin Kimyasal Bileşimi [1]

Zeytin Bileşeni	Miktar (%)
Su	35-50
Yağ	20-35
Karbonhidratlar (glikoz ve diğerleri)	2,8-6,2
Protein	1,6-2,5
Kül (mineral madde)	1-5
Aromatik maddeler	<1
Renk maddeleri	<1
Polifenoller	<1
Pektinler	<1

Zeytin ağacı, tarihin her aşamasında Akdeniz’de kurulan bütün uygarlıkların ve daha sonraları bir çok ülkenin vazgeçilmez bir parçasını oluşturmuştur [6]. Dünya’da zeytin alanları 30°-45° kuzey ve güney enlemleri arasında yayılım göstermektedir. Zeytin ağacı bu coğrafi kuşaklar arasında gelişme ve meyve verme yönünden en uygun koşullara sahip olmaktadır. Zeytin ağacı don tehlikesinin bulunmadığı ılıman iklim koşulları altında derin, verimli, kısmen tuzlu ve su geçirgenliği iyi olan topraklarda en iyi şekilde yetiştirilebilmektedir [1]. Ağaç varlığının %98’i Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerde yer almaktadır [7]. İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye ve Tunus Dünya tane zeytin üretiminde önemli bir yere sahip olan ülkelerin başında gelmektedir [7, 8]. Ülkemizde Ege, Akdeniz, Marmara ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde yaygın olarak yetiştirilen zeytin ağacı uzun yıllık bir meyve ağacıdır [7].

Meyvesi doğasından gelen acılık maddesi nedeni ile zeytin doğrudan değil mutlaka işlenerek tüketilmelidir [7]. Bu nedenle de zeytin meyvesi yağlık ve sofralık olarak ikiye ayrılır. Çok eski çağlardan beri yetiştirilen ve ilk tarım ürünlerinden biri olan zeytin, önemli bir yağ kaynağıdır [1,9].

2.2 Zeytinyağı

Zeytinyağı, sadece zeytin ağacı meyvelerinden elde edilen, hiçbir kimyasal işlem görmeden bile doğal hali ile tüketilebilen ve oda sıcaklığında sıvı olan bir yağdır [10]. Zeytinyağı dünyanın en eski ve en önemli yağlarından biridir. Özellikle Akdeniz ülkelerinde geniş bir kullanım alanı bulan zeytinyağı, esas olarak yemeklerde tüketilmektedir [11]. Ayrıca gıda sanayisinde, sabun yapımında, tekstil yağları üretimi ve sülfonatlı bileşiklerin üretiminde de zeytinyağı kullanılmaktadır [10].

Zeytin meyvelerinin normal iriliği aldığı ve yağ içeriklerinin maksimum düzeye ulaştığı devrede toplanarak çeşitli işlemlerle yağın meyve suyundan ayrılması zeytinyağı üretiminin temelini oluşturmaktadır. Bu şekilde zeytinden ana ürün olarak yağ elde edilmektedir. Meyvenin yağ içeriği, olgunluk ilerledikçe artar ve ağaç üzerinde yeşil meyve kalmayınca en yüksek seviyeye ulaşır [10].

2.2.1 Zeytinyağı çeşitleri

Zeytinyağları temel olarak serbest yağ asitlerinin miktarına göre değerlendirilir. Uluslararası Zeytinyağı Konseyi ve Türk Standartları Enstitüsü'nün tanımlamalarına göre 3 tip zeytinyağı vardır [12,13].

2.2.1.1 Naturel zeytinyağı

Naturel zeytinyağları zeytin ağacı meyvesinden, doğal özelliklerini değiştirmeyecek bir sıcaklıkta sadece mekanik veya fiziksel işlemler uygulanarak elde edilen, berrak, yeşilden sarıya değişebilen renkte, kendine özgü tat ve kokuda olan doğal hali ile gıda olarak tüketilebilen yağlardır. Naturel zeytinyağları kendi içlerinde üç gruba ayrılırlar [1]:

- a) Naturel sızma zeytinyağı: Kokusu ve tadında kusur olmayan, serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok % 1 olan naturel zeytinyağıdır [13]. Naturel sızma zeytinyağı her tür yemeklere uygun olmakla beraber salatalar için ideal bir kullanım alanına sahiptir [1].
- b) Naturel birinci zeytinyağı: Kokusu veya tadında çok hafif kusurları bulunabilen, serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok %2 olan zeytinyağıdır [13].

c) Naturel ikinci zeytinyağı: Kokusu veya tadında tolere edilebilen kusurları bulunan, serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok % 3,3 olan naturel zeytinyağıdır [13].

d) Lampante naturel zeytinyağı: Oleik asit cinsinden asitlik derecesi % 3,3'den yüksek olan zeytinyağı çeşididir. Bu zeytinyağı çeşidinin asitlik derecesinin yüksek olması nedeni ile rafine edilerek tüketilmesi gerekmektedir [13].

2.2.1.2 Rafine zeytinyağı

Zeytin ham yağının yapısında değişikliğe yol açmayan metodlarla rafine edilmesi sonucu elde edilen, sarının değişik tonlarında rengi olan kendine özgü tat ve kokuda bir yağdır [1]. Serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok % 0,3'tür [13]. Rafine zeytinyağı elde edebilmek amacı ile yağlar, asiditenin giderilmesi (nötralizasyon), rengin açılması (ağartma) ve koku giderilmesi (deodorization) olarak bilinen üç değişik türde işleme tabi tutulurlar. Rafinasyon işlemleri ile triaçilgliserollerin orijinal yapıları bozulmadan zeytinyağı kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve istenmeyen bileşenler uzaklaştırılmaktadır [1].

2.2.1.3 Riviera zeytinyağı

Riviera zeytinyağı, rafine zeytinyağı ile doğal halinde gıda olarak tüketilebilecek naturel zeytinyağlarının karışımından oluşan, yeşilden sarıya değişen renkte, kendine özgü tat ve kokuda bir yağ çeşididir. Serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok % 1,5'tur. Kullanılan yağların türü ve karışım oranlarına bağlı olarak bu yağların asitlik dereceleri, renkleri ve organoleptik özellikleri (tat ve aromaları) farklılık göstermektedir [1].

2.2.2 Zeytinyağı bileşenleri

Zeytinyağı, açık rengi ve eşsiz lezzeti ile ayrı bir özelliğe sahiptir. Yağın, kendine has lezzeti ve aroması, yapısında farklı miktarlarda çok çeşitli bileşenlerin varolmasından kaynaklanır [3,14]. Zeytinyağı bileşenleri, sabunlaşabilen ve sabunlaşamayan bileşenler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Zeytinyağının temel yapısını oluşturan triaçilgliseroller ve serbest yağ asitleri ile fosfatidler başlıca sabunlaşabilen bileşenler arasındadır. Sabunlaşmayan bileşenler ise, hidrokarbonlar,

steroller, alkoller, aroma maddeleri ve pigmentler ile diğer bileşenlerden oluşmaktadır [1].

Zeytinyağının %99'u gliserole bağlı yağ asitlerinden (diğer adı ile trigliserit) oluşmaktadır. Zeytinyağındaki yağ asitlerinin büyük bir kısmı doymamış yapıdadır. Zeytinyağının başlıca yağ asitleri oleik (18:1), linoleik (18:2), palmitoleik (16:1), palmitik (16:0) ve stearik (18:0) asittir [1]. Zeytinyağında en yüksek oranda bulunan yağ asidi oleik asittir. Bunun yanında zeytinyağı diğer bitkisel yağlara göre daha çok oleik ve daha az linoleik ve linolenik asit içermektedir. Bu durum zeytinyağını oksidasyona karşı daha dirençli kılmaktadır. Zeytinyağının yağ asidi bileşenleri ve içerikleri, zeytinin yetiştirme ve ekim alanının iklim koşulları, zeytinyağı çeşidi ve daha birçok faktöre bağlı olarak değişim gösterebilir [13,15]. Zeytinyağındaki yağ asidi kompozisyonu değişimi genel olarak Tablo 2.2'de görülmektedir.

Zeytinyağında yağ asitlerinden başka çok sayıda olmalarına rağmen sadece küçük miktarlarda bulunan bileşenler vardır. Azınlık bileşenler olarak adlandırılan bu bileşenler oldukça önemlidir. Bu bileşenlerden bazılarının insan sağlığı için yararlı olduğu bildirilmiş, diğer bir kısmının yağın kararlılığına olumlu yönde etki ettiği gözlenmiş ve azımsanmayacak bir kısmının da yağın kendine has lezzetini oluşturduğu saptanmıştır. Zeytinyağının azınlık bileşenlerini hidrokarbonlar, tokoferoller, aldehytler, alkoller, fenoller, esterler, ketonlar, furanlar, fosfatidler, steroller, fosfolipitler, aroma maddeleri ve renk vericiler oluşturmaktadır. Bu bileşenler toplam zeytinyağı bileşiminin en çok %1'ini oluşturmaktadırlar [3,13,16].

Zeytinyağında en temel hidrokarbon bileşenlerine örnek olarak skualen ve β -karoten gösterilebilir. C_{11} ve C_{30} aralığında değişim gösteren parafinler, iso ve anti iso hidrokarbonlar, fenantren, piren ve florantrén diğer hidrokarbon bileşenleri arasında yer almaktadır. Zeytinyağı çeşidine ve üretildiği meyvenin özellikleri ile yetiştirilme koşullarına bağlı olarak değişik oranlarda, yüksek E vitamini aktivitesi gösteren α -tokoferol içermektedir. Zeytinyağında bulunan renk verici maddeler ise feofitinler ve klorofillerdir [1,3].

Tablo 2.2: Zeytinyağı Yağ Asitleri Bileşimi [1]

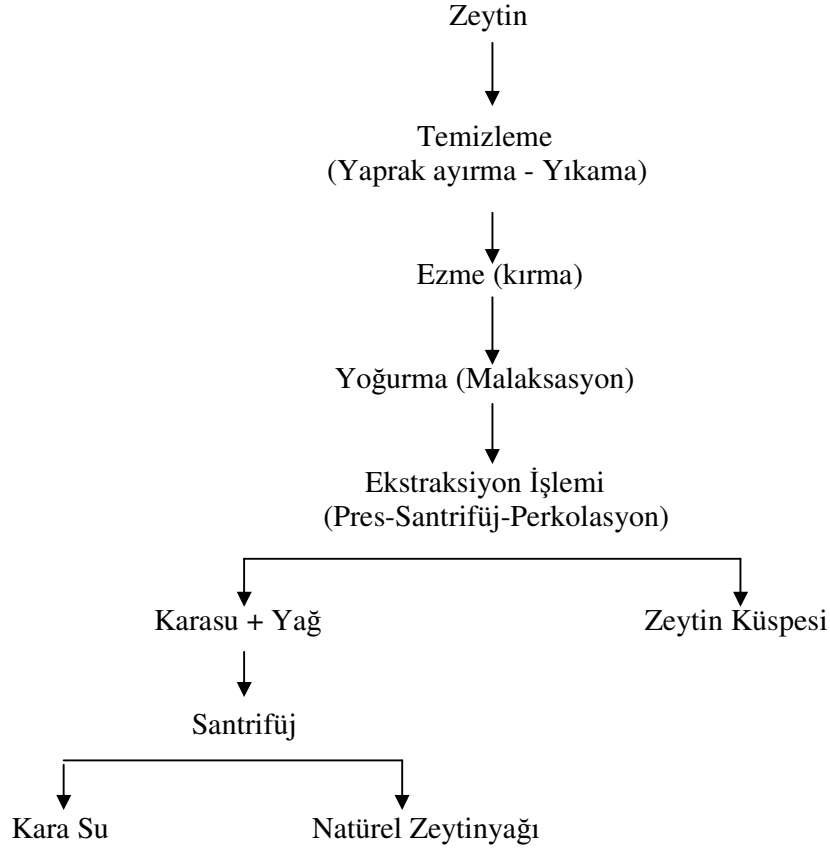
Yağ Asidi	Bileşim (%)
Oleik asit (18:1)	55-83
Palmitik asit (16:0)	7,5-20
Linoleik asit (18:2)	3,5-20
Stearik asit (18:0)	0,5-5
Palmitoleik asit (16:1)	0,3-3,5
Linolenik asit (18:3)	0,0-1,5
Miristik asit (14:0)	0,0-0,1
Araşidonik asit (20:0)	0,0-0,8
Behenik asit (22:0)	0,0-0,2
Lignoserik asit (24:0)	0,0-1
Heptadekanoik asit (17:1)	0,0-0,6
Heptadekanoik asit (17:0)	0,0-0,5

2.2.3 Zeytinyağı üretimi

Zeytinyağı üretiminde bilinen en eski yöntem, zeytinlerin bir tokmak yardımı ile havanlarda veya geniş değirmen taşlarında ezilmesidir. Günümüzde ise teknolojik gelişmeler ile presleme, santrifüj veya perkolasyon yöntemleri zeytinyağı üretiminde geniş kullanım alanı bulmaktadır. Bu işlemlerin sonucunda yağ, su ve zeytin küspesi elde edilir [10].

Zeytinden yağın mekanik yöntemlerle çıkarılması, zeytin dokusundaki yağ damlacıklarının birleşerek sürekli bir sıvı faz oluşturacak şekilde büyük damlalar haline gelmesi ve bunu takiben yağın dokudan ayrılması ile gerçekleşmektedir. Zeytinde yağ daha çok meyve eti kısmında, daha az miktarda ise meyve kabuğunda ve deri içinde bulunmaktadır. Zeytinler en uygun olgunlukta hasat edilir ve uygun bir şekilde işlenirse istenilen nitelikte ve kalitede zeytinyağı elde edilebilir [3,10].

Kaliteli, taze ve olgun zeytin meyvesinden zeytinyağı üretimi, genel olarak üç kademededen oluşmaktadır. Bu kademeler sırasıyla zeytine uygulanan ön işlemler, yağ ve karasuyun katı fazdan ekstraksiyonu ve yağ ile karasuyun birbirinden ayrılması şeklinde özetlenebilir [5]. Şekil 2.2’de zeytinyağı üretim aşamaları görülmektedir.



Şekil 2.2: Zeytinyağının Üretim Aşamaları [3]

2.2.3.1 Zeytine uygulanan ön işlemler

Ön işlemler, zeytin meyvesinden yağ ekstraksiyonuna uygun bir yapıya sahip hamur elde edilmesi amacı ile uygulanmaktadır. Bu işlemler arasında temizleme, zeytinlerin ezilmesi ve yoğurma yer alır [5].

Temizleme

Hasat sırasında yaprak, dallar, toprak, taş ve diğer yabancı maddeler zeytinlerle birlikte toplanır ve taşınır. Bu maddelerin üretim esnasında herhangi bir verim kaybına yol açmasını önlemek ve kaliteli yağ üretebilmek amacı ile bu maddelerin temizlenmesi gerekmektedir. Yıkama sırasında zeytinlerin zarar görmemesi ve

yıkama suyunun kirlenmeden zamanında değiştirilmesi son derece önemlidir. Yaprak ayırma ise zeytinlerin tarlada temizlenmesi veya yıkama makinelerine monte edilen emme sistemi ile gerçekleştirilmektedir [5,10].

Zeytinlerin kırılması

Özellikle meyve eti kısmında yer alan yağ içeren hücre çeperlerinin fiziksel yolla hasara uğratılması ve böylece yağ zerreciklerinin birleşerek ekstraksiyona daha uygun ve akışkan bir yapı kazanmalarını sağlamak amacı ile zeytinlerin kırılması gerekmektedir. Bu işlemi gerçekleştirmek için taş değirmenler veya metal kırıcılar kullanılmaktadır [5].

Yoğurma (malaksasyon)

Kırılan ve ezme haline getirilen yapının homojenleştirilmesi ve yağ damlacıklarının birleşerek elde edilen hamurun bir sonraki katı ve sıvı faz ayrımı işlemine hazırlanması amacı ile uygulanmaktadır. Bu kademede metal yoğurucular ile uygun süre ve sıcaklık kombinasyonları ile yağ verimi arttırılmaya çalışılmaktadır [10].

2.2.3.2 Yağ ve karasuyun katı fazdan ekstraksiyonu

Ön işlemlerle elde edilen zeytin hamuru, yağ ekstraksiyonu için en uygun hale getirilmiştir. Zeytinin yüksek su içeriği nedeni ile ekstraksiyon aşamasında sıvı fazı oluşturan yağ ve karasu, katı fazdan farklı yöntemlerle ayrılmaktadır. Bu amaçla, presleme, santrifüjleme, perkolasyon ve bu sistemlerin kombinasyonları kullanılmaktadır [5].

Presleme

Zeytinyağı üretiminde basınç uygulaması uygulanan en eski tekniktir. Bu yöntemde, yoğurma işlemi ile uygun hale getirilen zeytin hamuru preslere beslenmekte ve böylece uygulanan basınç sayesinde yağ ve kara su karışımı katı faz olan zeytin küspesinden ayrılmaktadır. Günümüzde çok değişik presleme sistemleri geliştirilmiş ve kullanılmaktadır [5,10].

Santrifüjleme

Bu yöntem, zeytin hamurundaki yağ ve karasuyun yüksek devir hızıyla dönen santrifüjler yardımı ile katı fazdan ayrılması esasına dayanmaktadır. Bu sistemde, hamura uygun sıcaklık ve miktarda su eklenerek, yüksek devir hızının etkisi ile sıvı fazın ayrılması sağlanmaktadır [5,10].

Perkolasyon (seçici filtrasyon)

Perkolasyon yönteminde zeytin hamurunun içerisine daldırılan çelik plakalar ile sıvı fazlar arasında yüzey gerilimi oluşturulmakta ve böylece metal plaka yüzeyinin yağ fazıyla kaplanması sağlanmaktadır [5,10].

2.2.3.3 Yağ ve karasu karışımının ayrılması

Elde edilen yağ ve karasu karışımı son olarak bir santrifüj ile ayrılmaktadır. Santrifüjle ayırmanın esası hızlı bir şekilde yağın karasudan ayrılmasıdır. Zeytinyağı üretiminde santrifüj kullanılması ile birlikte daha kaliteli yağ elde edilerek büyük bir avantaj sağlanmaktadır. Yağ ve karasu karışımı ayrıldıktan sonra, yağın içinde kalan diğer safsızlıkların da en iyi şekilde giderilmesi amacı ile filtrasyon işlemi (yağın süzülmesi) gerçekleştirilebilir [5,10].

2.2.4 Türkiye ve Dünya’da zeytincilik ve zeytinyağı sektörü

Türkiye zeytin ağacı varlığı bakımından ilk sıralarda yer almaktadır. Zeytinciliğin merkezi olan Akdeniz havzasının doğusunda yer alan ülkemizde zeytin, Ege ve Marmara sahillerimiz başta olmak üzere tüm sahil şeritlerimizde ve Güneydoğu Anadolu Bölgemizde yetiştirilmektedir. Ülkemizde zeytin üretiminin %80.5’i Ege Bölgesinde yapılmaktadır. Bu bölgeyi %11.8 ile Akdeniz, %6.1 ile de Marmara Bölgesi izlemektedir. Ülkemizde birçok ailenin geçim kaynağı zeytinciliktir ve zeytinyağı tüketimi, üretim bölgelerinde yoğunluk kazanmış durumdadır [7,17].

Dünya’da zeytin ağacı varlığının %98’i Akdeniz ülkelerinde yoğunlaşmış durumdadır. Zeytinyağı bölgesel nitelikli bir ürün olduğu için tüketimi de daha çok üretildiği bölgelerde yoğunlaşmıştır. Zeytin ağacının özelliği dolayısıyla zeytinyağının üretimi yıllara göre farklılık göstermektedir. Dünya zeytinyağı üretiminin %60’ı Avrupa ülkeleri, %40’ı da diğer ülkeler tarafından gerçekleştirilmektedir [7,17,18]. Dünya zeytinyağı üretimi istatistikleri ve Türkiye’nin üreticiler arasındaki konumu Tablo 2.3’teki gibi özetlenebilir.

Tablo 2.3: Yıllara Göre Dünya Zeytinyağı Üretim Rakamları (*1000 ton) [17]

ÜLKE	1999/ 2000	2000/ 2001	2001/ 2002	2002/ 2003	2003/ 2004	2004/ 2005	2005/ 2006
Avrupa Birliği Ülkeleri Toplam Üretimi	1878,5	1940,5	2463,5	1942,5	2488	2353,5	1947,5
Cezayir	33,5	26,5	25,5	15	69,5	33,5	47,5
Arjantin	11	4	10	11	13,5	10	25
Kıbrıs	3,5	5,5	6,5	7	-	-	-
Hırvatistan	9	5,5	6,5	7	3	5	5,5
İran	2,5	3	2,5	1,5	2,5	4	4
İsrail	2,5	7	3,5	9	3	9,5	4
Ürdün	6,5	27	14	28	25	29	20
Lübnan	5	6	5	6	7,5	6	5,5
Fas	40	35	60	45	100	50	75
Filistin	2	20	18	21,5	5	20	10
Suriye	81	165	92	165	110	175	100
Tunus	210	130	35	72	280	130	200
Türkiye	70	175	65	140	79	145	112
Avusturalya	0,5	1	1	2	2,5	4,5	5
Mısır	2,5	0,5	1,5	5	2	2,5	2,5
ABD	1	0,5	0,5	1	1	1	1
Libya	7	4	7	6,5	12,5	12,5	9
Meksika	1	1,5	2	2,5	2,5	2,5	2,5
Sırbistan&Karadağ	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Diğer Ülkeler	6,5	7,5	7,5	7,5	7	7	8
Dünya Toplam	2374,5	2565,5	2825,5	2495,5	3174	3001	2584,5

2.2.5 Zeytinyağının fonksiyonel özellikleri ve insan sağlığı üzerindeki etkileri

Zeytinyağının özellikle mekanik sistemler kullanılarak elde edilmesi nedeniyle insan sağlığı açısından birçok olumlu etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Antioksidan içeriği yüksek olan naturel sızma zeytinyağı, tarihsel gelişim süreci içinde sadece gıda maddesi olarak tüketilmemiş aynı zamanda farklı hastalıkların tedavisinde de kullanılmıştır. Zeytinyağı günümüzde halen aynı özellikleri nedeniyle kullanımına devam edilen ve geniş bir tüketim alanına sahip önemli bir ürün niteliğindedir [3,19, 20].

Zeytinyağının sağlık üzerine olumlu etkileri, bu yağın E vitamini ile tekli doymamış yağ asitlerince ve özellikle de oleik asitçe zengin olması ve fenolik maddeleri yüksek oranda içermesinden kaynaklanmaktadır [20]. Zeytinyağının yüksek oranda içerdiği ve antioksidan özelliği gösteren fenolik bileşenler sayesinde kalp ve damar sağlığı korunmakta ve kalp ve damar hastalıklarının oluşum riski azalmaktadır [21]. Fenolik bileşenlerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra antimikrobiyal, antitrombotik ve deriyi koruyucu özellikleri de bulunmaktadır. Bu bileşenler zeytinyağının oksidasyon yönünden stabilitesini arttırmada son derece etkilidirler. Ayrıca fenolik maddelerin zeytinyağına tat ve koku etkilerinin yanında muhtemel kanser oluşumunun engellemesine karşı olumlu etkileri de söz konusudur [20,22].

Owen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada zeytinyağının içerdiği oleik asit ve fenolik bileşenlerin bağırsak, göğüs ve cilt kanseri ile koroner kalp hastalığını önlediği ve oksidatif stresi yok ederek yaşlanmaya karşı koruyucu etki yaptığı görülmüştür [23].

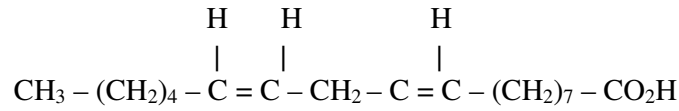
Zeytinyağı sindirim kolaylıkları yüksek bir yağ olmakla birlikte yaşlılarda ve bebeklerde beyin ve sinir sisteminin gelişme ve yenilenmesinde son derece etkilidir. Ayrıca zeytinyağı kandaki kolesterol düzeyini düşürmesinin yanı sıra mide asitliğini azaltarak gastrit ve ülser oluşumuna karşı koruyucu bir rol oynamaktadır [20].

Zeytinyağı insan sağlığına belirtilen çok çeşitli faydaları bulunmasına karşın, 0-1,5 mol/mol linolenik asit içeriği ile omega 3 esansiyel yağ asitleri bakımından fakir bir yağ çeşididir. Bu özelliğinin geliştirilmesi amacı ile yapılandırılmış yağ üretiminde zeytinyağı kullanılabilir [1].

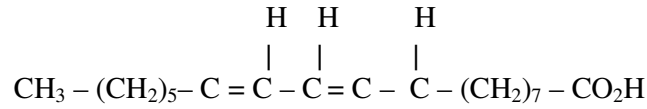
2.3 Konjuge Linoleik Asit

1980 yıllarında ABD’de Wisconsin Üniversitesi’nden Michael Priza ve arkadaşları hamburger etinden elde ettikleri maddenin kanser oluşumunu engellediğini bulmuşlardır. Daha sonra bu maddenin konjuge linoleik asit olduğu belirlenmiş ve kısaca KLA olarak isimlendirilmiştir [24,25]. KLA, insan ve hayvanlar için esansiyel bir yağ asidi olan linoleik asitten (18:2) oluşan, konjuge çift bağlar içeren oktadekadienoik asidin pozisyonel ve geometrik izomerlerinin oluşturduğu grubuna verilen addır [26,27].

Linoleik asit, 18 karbonlu bir yağ asidi olup 9. ve 12. pozisyonlarda cis konfigürasyonunda çift bağlar bulunmaktadır. Çift bağlar bir metilen (-CH₂-) grubu ile ayrılmaktadır. Konjuge linoleik asit moleküllerinde ise, linoleik asitten farklı olarak bir adet çift bağdan sonra tek bağ gelmektedir. Bu tek bağı ise yine bir çift bağ takip etmektedir [28,29]. Linoleik asit ve konjuge linoleik asitlerin kimyasal yapıları Şekil 2.3 de görülmektedir.



Linoleik Asit



Konjuge Linoleik Asit

Şekil 2.3 : Linoleik ve Konjuge Linoleik Asidin Kimyasal Yapıları [25]

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, konjuge linoleik asidin (6, 8), (9, 11), (10, 12), (8, 10), (7, 9), (11, 13) ve (12, 14) pozisyonlarında, farklı cis ve trans konfigürasyonuna sahip 28 izomeri bulunduğu belirlenmiştir. Her bir izomer farklı fonksiyonel özelliklere sahiptir [30].

Gıdalarda en çok **9c**, **11t** ve **10t**, **12c** izomerleri bulunur. Bu izomerler KLA’nın biyolojik aktif izomerleridir. Hayvanlar üzerinde yapılmış çalışmalara göre, **9c**, **11t**

izomerinin anti-kansorejen etki gösterdiği ve **10t, 12c** izomerinin ise kas miktarını arttırdığı gözlenmiştir. Biyolojik etkinliğe sahip bu izomerler toplam KLA izomerlerinin %80-90'ını oluşturur [31,32].

2.3.1 Konjuge linoleik asit oluşumu

Linoleik asitten KLA oluşumu esas olarak mikrobiyal enzimatik reaksiyonlar ile gerçekleşmektedir. Linoleik asit içeren bitkileri yiyen dana, koyun gibi geviş getiren hayvanların sindirim sistemlerinde bulunan rumen mikroorganizmaları (*Butyrivibrio fibrisolvens*) tarafından linoleik asidin biyohidrojenasyonu sonucunda KLA oluşmaktadır. Bu reaksiyonlarda isomeraz enzimi etkinliğini göstermektedir. Rumen mikroorganizmaları tarafından gerçekleştirilen indirgenme reaksiyonlarında öncelikle linoleik asit cis-9, trans-11 KLA izomerine, sonrasında vasetik (t11-18:1) aside ve en sonunda stearik aside dönüştürülmektedir. Bu reaksiyonlar dolayısıyla bu hayvanların süt yağı ve et yağlarında cis ve trans KLA izomerleri görülmektedir. Ayrıca et ve süt ürünleri gibi gıdalara uygulanan ısı işlemler esnasında KLA oluşmaktadır [25,28,33].

KLA izomerleri gıdaların besin değerlerini arttırmak üzere ticari amaçlarla da üretilmekte ve çeşitli gıda maddelerinin zenginleştirilmesi için kullanılmaktadır. Endüstriyel KLA karışımı elde edebilmek için uygulanan en yaygın yöntemlerden biri aspir, mısırozü, ayçiçek gibi linoleik asitce zengin yağların veya direkt linoleik asidin alkali izomerizasyonudur. İnsan vücudu KLA üretememektedir, bu nedenle ihtiyacı olan KLA'yı sığır ve koyun eti ile süt ürünlerinden sağlayabilir [25,32,34].

2.3.2 Konjuge linoleik asit kaynakları

Süt, peynir, yoğurt, tereyağı, sığır eti gibi ürünler başlıca KLA kaynaklarıdır. Özellikle kuzu eti KLA bakımından en zengin kaynaklardan biridir. 1g yağın içermiş olduğu toplam KLA içeriklerine bakıldığında, kuzu eti 5,6 mg ve sığır eti 2,9-4,3 mg KLA içermektedir. Rumeni olmayan tavuk ve domuz etleri sırası ile 0,9 mg/g ve 0,6 mg/g KLA içermektedir. Deniz ürünlerinden somon 0,3 mg/g, alabalık 0,5 mg/g ve karides ise 0,6 mg/g KLA içeriğine sahiptirler. Hayvansal gıdaların yanı sıra bazı sebzeler de düşük miktarlarda KLA içermektedirler. Bunun yanında bazı sıvı yağ türlerinde de az miktarda KLA bulunmaktadır. Örneğin kanola yağı 0,5 mg/g, ayçiçek yağı 0,4 mg/g, mısır 0,2 mg/g ve zeytinyağı 0,2 mg/g KLA içermektedir. Günlük olarak tüketilen besinlerde KLA içeriği 2,9-8,92 mg/1 g yağ olacak şekilde

değişim göstermektedir [34,35]. Tablo 2.4’de bazı gıdaların KLA içeriği görülmektedir.

Tablo 2.4 : Bazı Gıdaların KLA İçerikleri [25,34]

Gıda maddesi	Toplam KLA (mg/g yağ)	9c, 11t izomeri (%)
Sığır kıyma	4,3	85
Sığır budu	2,9	79
Dana eti	2,7	84
Kuzu eti	5,6	92
Domuz eti	0,6	82
Tavuk eti	0,9	84
Hindi eti	2,5	76
Süt	5,5	92
Tereyağı	4,7	88
Yoğurt	4,8	84
Dondurma	3,6	86
Çedar peyniri	3,6	93
Mozeralla peyniri	4,9	95
Bitkisel yağlar	0,1-0,7	38-47

2.3.3 Gıdaların KLA içeriğini etkileyen etkenler

Gıdaların KLA içeriği bir çok faktöre bağlı olarak değişmektedir. En önemli KLA kaynaklarından biri olan hayvanların yaşı, diyeti ve cinsi KLA içeriğini etkileyen en temel faktörlerdir. Ayrıca hayvanın yetiştiği bölge ve mevsim de KLA içeriğini etkilemektedir. Hayvanların beslendikleri yemler de oldukça önemlidir. Yüksek dağlık bölgelerden elde edilen sütlerin ve yaz mevsiminde elde edilen sütlerin KLA

içeriğinin daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ruminant kaynaklı gıdaların yağ içeriğindeki artış da KLA miktarını arttırmaktadır. Gıdalar üretilirken kullanılan proses ve proses şartları da KLA içeriği için oldukça önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda, ısıtma, pişirme metodu, seçilen starter kültür, olgunlaşma süresi kullanılan katkı maddeleri gibi etkenlerin KLA içeriğini etkilediği gözlenmiştir [32,34].

Tokuşoğlu ve arkadaşları ülkemizdeki farklı peynir çeşitlerinde KLA miktarı ile bileşimi arasındaki ilişkiyi belirlemeye yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada, kullanılan peynir üretim yönteminin farklılığının, sütün farklılığının, üretimde kullanılan starter kültürün farklılığının ve olgunlaşma süresinin peynirlerdeki KLA miktarının farklılaşmasına neden olduğu belirlenmiştir [36].

Lin ve arkadaşları, saklama koşullarının çedar peyniri KLA içeriğine olan etkisini incelemiştir. Çalışma sonucunda konserve peynirde vakum ile paketlenmiş peynire oranla daha yüksek miktarda KLA bulunduğunu tespit etmişlerdir [37].

Akalın ve arkadaşları ise prosesin, starter kültür tipinin, fruktooligosakkarit eklenmesinin ve saklama koşullarının probiyotik yoğurtlardaki KLA miktarına etkisini incelemiştir. Yoğurtlardaki KLA seviyesinin fruktooligosakkarit ilavesi ile arttırılabildiği belirtilmiştir [38].

Zlatanov ve arkadaşları tarafından yürütülen bir diğer çalışmada ise farklı proses koşullarının peynirlerin KLA miktarına olan etkisi incelenmiştir. En yüksek KLA miktarının olgunlaşma süresi uzun olan peynirlerde olduğu belirlenmiştir [39].

2.3.4 Gıdalarda KLA analizi

Gıdalardaki yağ asidi analizi yöntemleri ile KLA analizi yapılmaktadır. Bu yöntemler ve uygulanabilirlikleri KLA izomerlerini en doğru şekilde analiz edebilmek açısından son derece önemlidir. Bu yöntemlerden en yaygın olarak kullanılanı, yağ asidi metil esterlerinin oluşturulması ve Gaz Kromatografisinde (GC) analiz edilmesidir [40]. Yağ asidi metil esterlerinin oluşumu için asit veya alkali katalizörler kullanılabilir. Uzunluğu 30 m'den 100 m'ya kadar değişen polar kapiler kolona sahip, alev iyonizasyon dedektörü bulunan gaz kromatografi cihazları KLA analizi için kullanılmaktadır [41]. Fakat KLA'nın tüm izomerlerinin analizinde GC yeterli olmamaktadır. Daha detaylı bir KLA analizi için Ag^+ -HPLC kullanımı gerekmektedir. Bunun yanı sıra Kütle Spektrofotometresi (MS), Nükleer Manyetik

Rezonans (NMR) ve “Fourier Transform Infrared Spektroskopisi” (FTIR) KLA analizinde kullanılan diğer cihazlardır. Yaygın olarak süt ve süt ürünleri ile yağlardaki KLA içeriğinin tespiti için GC ve HPLC yöntemi kullanılmaktadır [31,42].

2.3.5 KLA’nın sağlık üzerine etkileri

Yapılan bir çok araştırmada KLA’in sağlık üzerine pek çok olumlu etkisi olduğu beyan edilmiştir. KLA’nın çok çeşitli faydaları, izomerlerinin her birinin ya da bir kaçının ayrı veya ortak etkilerinden kaynaklanmaktadır. KLA’in insan metabolizması üzerindeki muhtemel faydaları, bağışıklık sistemini güçlendirme, kanser oluşumunu azaltma veya elimine etme, kemik ve kıkırdak sağlığını iyileştirme, yüksek kolesterolü ve damar tıkanıklığını engelleyerek kalp hastalıklarından koruma ve obeziteyi engelleme olarak özetlenebilir [34,43].

İnsanların günlük KLA alımı cinsiyete ve diyetle ilgili olarak 0,3-1,5 g arasında değişiklik göstermektedir. 70 kilodaki bir insan için 3,5 g/gün KLA’in tüketiminin sağlığa olumlu etki gösterdiği tespit edilmiştir [44]. Başta A.B.D olmak üzere Fransa, İngiltere ve İtalya gibi bir çok ülkede KLA’in sağlık üzerine etkilerini inceleyen bir çok çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmaların çok büyük bir kısmı deney hayvanları üzerinde klinik olarak test edilmiştir [25,34].

2.3.5.1 Anti-kanserojen etkisi

KLA’in kanser gelişiminin bir çok evresinde antikanserojenik etki gösterdiği bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda KLA’in kimyasal olarak oluşan tümör gelişimini engellediği ve kanser hücrelerinin büyümesini durdurduğu belirlenmiştir. Kanserlin değişik evrelerinde KLA izomerlerinin etkisi, tümörün özelliği ve pozisyonu itibari ile farklılık göstermektedir. %1 ve daha düşük KLA düzeylerinin kanseri inhibe edebilme etkinliği bulunmaktadır. % 0.1 oranındaki KLA miktarı bile bazı durumlarda tümör gelişimini engelleyebilmektedir [25,45].

Beppu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, KLA izomerlerinin kolon kanserinin gelişimini engelleyici özelliğinin olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, KLA izomerleri arasında 9t, 11t izomerinin en güçlü inhibisyon özelliğine sahip olduğu tespit edilmiştir [46].

Bhattacharya ve arkadaşları KLA'in kanser üzerine etkilerini inceledikleri diğer bir çalışmada, 14 hafta boyunca günlük olarak %1 oranında tüketilen KLA'in prostat kanserine neden olan tümörün gelişimini az miktarda da olsa engelleyebildiği tespit edilmiştir [47].

Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, farelere beslenen KLA miktarı arttıkça meme kanserine neden olan tümörün tekrarlanma oranlarında önemli seviyede azalma olduğu belirlenmiştir. 9c, 11t KLA izomerince zengin inek sütünün meme kanseri oluşumunu engellediği ve peynir tüketiminin yüksek olduğu ülkelerde meme kanseri oluşumunun düşük olduğu istatistiksel olarak tespit edilmiştir. Ayrıca KLA'nın bağırsak, mide ve karaciğer kanserlerine karşı da koruyucu etkisi olduğu beyan edilmektedir [48].

2.3.5.2 Bağışıklık sistemine etkisi

KLA'in bağışıklık sistemi üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. KLA çeşitli hayvan cinslerinde kataboliklerin ve sitokinlerin olumsuz etkilerine karşı bağışıklık sistemini koruduğu ve hücreler arası uyarı iletimini sağladığı belirlenmiştir. %5 oranında KLA içeren bir beslenme şeklinin hastalıkla ya da diyetle oluşabilecek aşırı kilo kaybını da engelleme etkisi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda ayrıca KLA'in antialerjik özellik gösterdiği de tespit edilmiştir [32,49].

Cook ve arkadaşları, kemiriciler ve kümes hayvanlarında diyetle alınan KLA'in bağışıklık sistemine olumlu etkilediğini ve büyüme baskılanmasını önlediğini gözlemlemişlerdir [50].

Miller ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada, farelerde KLA'in endotoksine bağlı olarak meydana gelen büyüme baskılanmasını önleme kapasitesi incelenmiştir. Çalışmanın sonunda %0,5 oranında KLA içeren diyetle beslenen farelerde olumlu sonuçlara ulaşılmıştır [51].

2.3.5.3 Kalp ve damar hastalıkları üzerindeki etkisi

Tüketilen besinlerde doymuş yağ miktarının fazla olması kalp ve damar hastalıklarına yakalanma riskini arttırmaktadır. Hayvanlarla yapılan çalışmalarda KLA'in bu hastalıkların oluşum riskini azalttığı görülmüştür. KLA trigliserit düzeyini ve kötü kolesterolü düşürmekte, iyi kolesterolü ise arttırmaktadır [32].

KLA kanın akışkanlığını arttırarak kanın kalp tarafından kolayca pompalanmasına yardımcı olmaktadır. Bu şekilde damar tıkanıklığı ya da damarlara yağ birikimi belirli bir düzeyde önlenebilmektedir. Ayrıca KLA antioksidant özelliğe sahip bir yağ asididir. KLA'in arterlerde bağ dokusu oluşumunu ve lipid depolanmasını azalttığı da gözlenmiştir [25].

2.3.5.4 Anti-diyabetik etkisi

Yapılan çalışmalar kilo fazlalığı sorununun çözümünde KLA'in etkili olabileceğini göstermiştir. KLA düzenli bir şekilde tüketildiğinde karın çevresinde biriken yağları azaltmaktadır. KLA'in insülin hassasiyetini arttırarak antidiyabetik etkisinin olduğu farelerle yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir [52].

2.3.5.5 Vücut kompozisyonuna etkisi

KLA vücuttaki yağ depolarını azaltan ve yağsız kas kütesini arttıran bir maddedir. KLA'nın yağ hücrelerinden yağın çıkışını ve kas hücrelerine yağ, glikoz ve diğer besinlerin girişini arttırdığı belirlenmiştir. Kas hücresi içine giren bu besinler kasların çalışması durumunda yakılarak kasları beslemekte ve kasların büyümesini sağlamaktadır. Bu nedenle, özellikle vücut gelişimi yapan sporcular KLA'i takviye besin maddesi olarak kullanmaktadır [25,32,53].

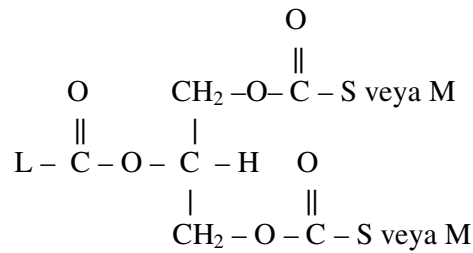
2.4 Yapılandırılmış Yağlar

Yağların temel yapısını gliserol ve yağ asitlerinden oluşan triaçilgliseroller (TAG) teşkil eder. Yağlar triaçilgliseroller dışında mono ve digliseritler, fosfatidler, steroller, terpenler, yağ alkoller, yağda çözünen vitaminler ve diğer bazı bileşenleri de içermektedirler. Yağlar suda çözünmezler, ancak eter, benzen, kloroform gibi organik çözücülerde çözünürler [10,54].

Yağların kimyasal yapısı, onun fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini belirler. Yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin hemen hemen tamamı yağ asitlerinin yağdaki oranı ve çeşitleri tarafından etkilenmektedir. Yağların fiziksel ve kimyasal yapısı, triaçilgliserol üzerindeki yağ asitlerinin yapısına ve yağ asitlerinin gliserol iskelet üzerindeki dağılımına bağlıdır. Yağ asitleri, zincir uzunluğuna ve çift bağın sayısı, pozisyon ve konfigürasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Triaçilgliseollerin kompozisyonu her yağa özgüdür. Yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin aynı

olmamasının nedeni triaçilgliserol içindeki yağ asidi dağılımının ve yapısının farklılığıdır [55,56,57].

Bitkisel veya hayvansal yağların bir kısmı gıda uygulamaları ve beslenme için çok uygun değildir. Bu yüzden, günümüzde yağların çoğu biyoteknolojik uygulamalar ile değişik şekillerde modifiye edilerek amaca uygun hale getirilmektedir. Yapılandırılmış Yağlar (YY'lar) triaçilgliserollerin yapısı üzerine yeni yağ asitlerinin yerleştirilmesi veya doğal yapısındaki yağ asitlerinin pozisyonlarının ve/veya yağ asitlerinin bileşimlerinin değiştirilmesi ile modifiye edilmiş triaçilgliserollerdir [58,59]. Şekil 2.4'de yapılandırılmış yağların genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2.4 : Yapılandırılmış Yağların Genel Yapısı (L: uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi ve S: kısa zincirli yağ asidini ifade etmektedir.) [60]

Üretilen yapılandırılmış yağlar hem yapısal hem de metabolik olarak, gelişigüzel hazırlanmış orta zincirli TAG (MCT) ve uzun zincirli TAG (LCT) karışımlarından oldukça farklıdır [60].

2.4.1 Yapılandırılmış yağ sentezlenmesinin nedenleri

Yapılandırılmış yağlar son yıllarda insan sağlığına olumlu etkileri olan, doğrudan gıda ya da gıda bileşeni olarak kullanılan yağlar olup fonksiyonel gıda başlığı altına girmektedirler. Yapılandırılmış yağlar, yağların fiziksel ve/veya kimyasal karakterini geliştirmek, besinsel özelliklerini değiştirmek amacı ile sentezlenirler. Yapılandırılmış yağlar tedavi edici veya ürünün fonksiyonel özelliklerini iyileştirme amaçlı olarak kullanılabilirler. Bunun yanında bu yağlar “nutraceutical” olarak adlandırılan sağlığı kuvvetlendirici yeni bir lipid çeşidi olarak bilinmektedirler. “Nutraceutical”, beslenme etkisinin yanında sağlığa faydası olan gıda maddelerinin tanımlanmasında kullanılan bir terimdir. Bu ürünlerin normal bir gıdaya katılması, katıldığı gıdaya sağlık yönünden faydalı özellikler kazandırır [61].

Yapılandırılmış yağ üretiminde farklı yağ asitleri kullanılarak her birinin özellikleri sayesinde YY'ların fizyolojik yararları da artırılmış olmaktadır. Yapı taşları olarak kullanılan yağ asitlerinin TAG molekülündeki pozisyonu YY'ların sağlık için yararlarını belirlemektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda yapılandırılmış yağların insan metabolizmasının üzerinde birçok faydasının olduğu görülmüştür. Yapılandırılmış yağlar bağışıklık sistemini geliştirmek, kandaki kolesterol miktarının düşürmek, beyin gelişimini olumlu yönde etkilemek gibi çeşitli faydalara sahiptirler. Sindirim ve emilim özellikleri değiştirilerek hazırlanan yapılandırılmış yağlar, belirli diyet yağlarını metabolize edemeyen veya pankreatik rahatsızlıkları olan kişiler için faydalı olmaktadır. Yapılandırılmış yağlar kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu özelliklerinin yanında kanser oluşumunu inhibe edebilme ve trombozu önleyebilme etkisine de sahiptirler [60,62].

Yapılandırılmış yağlar, insan sağlığına olan faydalarının yanı sıra yağların kullanım fonksiyonlarını geliştirmek amacı ile üretilmektedirler. Yapılandırılmış yağlar, TAG'ın erime sıcaklığı, katı yağ miktarı, iyot ve sabunlaşma değerleri gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilmek için kullanılırlar. Farklı nitelikte özel yağlar üretmek, doymamış yağ asidi içeren margarin üretmek, yağın kristal yapısını değiştirmek ve yağların erime özelliklerini geliştirmek yapılandırılmış yağların üretilmesinin diğer nedenleri arasındadır [57].

2.4.2 Yapılandırılmış yağ sentezinde kullanılan yağ asitleri

Yağ asitleri, yağların en temel bileşeni olan, kimyasal açıdan genellikle çift sayıda karbon atomu içeren, değişik zincir yapı ve uzunluğunda, alifatik (açık zincir yapısında) organik asitlerdir [63]. Yapılandırılmış yağ sentezinde çeşitli yağ asitleri kullanılmaktadır. Yapılandırılmış yağların istenilen özelliklere sahip olması için yağ asitlerinin hepsinin fonksiyon ve özelliklerini göz önünde bulundurmak son derece önemlidir. Yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan yağ asitleri kısa zincirli yağ asitleri, orta zincirli yağ asitleri ve uzun zincirli yağ asitleri şeklinde sıralanabilir. Ayrıca çoklu ve tekli doymamış yağ asitleri de yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılmaktadır. Kullanılan yağ asidi ve bunların TAG içindeki konumu yapılandırılmış yağların fiziksel, fonksiyonel ve metabolik özelliklerini belirler [59].

2.4.2.1 Kısa zincirli yağ asitleri

Kısa zincirli yağ asitleri (SCFA)'nin zincir uzunluğu 2-6 karbon atomu arasında değişim göstermektedir. Bu yağ asitleri uçucu yağ asitleri olarak da bilinmektedir. Kısa zincirli yağ asitlerinin geleneksel kaynakları, inek sütü ve tereyağıdır. Suda çözünebilme özellikleri, moleküler yapıları ve kısa zincir uzunluğu sayesinde bu yağ asitleri diğer yağ asitlerine göre midede daha çabuk adsorbe olmaktadır. SCFA'lar diğer yağ asitlerine göre daha az yanma ısısına sahip olduklarından daha az kalorifik değer göstermektedirler [59,60].

2.4.2.2 Orta zincirli yağ asitleri

Orta zincirli yağ asitleri (MCFA) 6-12 karbon atomu arasında değişim gösteren zincir uzunluğuna sahiptirler. Hindistan cevizi ve hurma yağı başlıca MCFA kaynaklarıdır. Orta zincirli yağ asitleri vücutta glükoz kadar çabuk metabolize olabilmektedir. Obeziteyle mücadelede faydalı olabilecekleri halde serum içerisindeki kolesterol miktarını da belirgin şekilde arttırabilirler. MCFA'ların sahip olduğu doğal hareket kabiliyetinin, çözünürlüğünün ve metabolizmada çok kolay kullanılma özelliklerinin, daha sağlıklı doymamış yağ asitleri ile birlikte kullanılması, MCFA'lardan en etkin faydayı sağlar [59,60].

2.4.2.3 Uzun zincirli yağ asitleri

Uzun zincirli yağ asitleri (LCFA) 14-24 karbon atomu arasında değişim gösteren zincir uzunluğuna sahiptirler. Hayvansal ve bitkisel yağlarda yaygın olarak bulunmaktadır. SCFA ve MCFA'lara göre daha yavaş adsorbe ve metabolize olmaktadır. Büyük bir çoğunluğu da kalsiyumla birleşerek dışkı ile atılmaktadır. LCFA'lar kan içinde taşınmaz ya da adsorbe edilemezler. Çünkü bu yağ asitlerinin SCFA ve MCFA'ya göre daha fazla hidrofobik özelliği vardır. Çok değişik tipte uzun zincirli yağ asitleri bulunmaktadır. Fakat bu yağ asitlerinin içinde, yapılandırılmış yağlar için en önemli olanları insanlar tarafından üretilmeyen esansiyel yağ asitleridir (EFA). Linoleik asit ve Linolenik asit EFA grubu yağ asitleridir [60].

Uzun zincirli yağ asitleri doymuş ve doymamış yağ asitleri olarak iki gruba ayrılabilirler. ω -3, ω -6 ve ω -9 yağ asitleri doymamış yağ asitleri arasındadır.

n-3 yağ asitleri olarak da bilinen ω -3 yağ asitlerinin en çok bilineni linolenik asittir. Linolenik asit soya fasulyesi ve keten tohumu yağlarında ve yeşil yapraklı bitkilerin kloroplastlarında bulunmaktadır. Dokosaheksaenoik (DHA), eikosapentenoik (EPA) ve γ -linolenik asit (GLA) diğer önemli ω -3 yağ asitleri arasındadır [60].

ω -6 (*n*-6) yağ asitleri arasında en çok bilinen yağ asidi linoleik asittir. Linoleik asit hindistan cevizi, kakao ve palm cevizi gibi pek çok bitki tohumunda bulunur. Oleik asit ise ω -9 (*n*-9) yağ asitleri arasında en yaygın olarak bilinen yağ asididir. Oleik asit insan vücudunda sentezlenebildiği için esansiyel yağ asidi grubu içinde yer almamaktadır [60].

Genelde doymuş yağ asitlerinin plazma ve serum kolesterolünü yükselttiği açıklanmaktadır. Fakat son yıllarda yapılan araştırmalarda 4-10 karbon atomu olan yağ asitlerinin kolesterolü yükseltmediği görülmektedir. Uzun zincirli yağ asitlerinden stearik asidin de kolesterolü yükseltmediği bilinmektedir. Yüksek oranda uzun zincirli doymuş yağ asidi içeren TAG'ların erime noktaları yüksek olduğundan mide ve bağırsakta absorpsiyonları azdır ve büyük kısımları dışarı atılır. Ayrıca kan içerisinde de taşınamazlar. Bu özellikleri ile düşük kalorili yapılandırılmış yağ üretimi için yaygın olarak kullanılırlar [60].

2.4.3 Yapılandırılmış yağların sentezi

Yapılandırılmış yağların sentezi, temel olarak kimyasal ya da enzimatik yolla gerçekleştirilmektedir. Bunun yanında mikrobiyal sentez, yağlı tohumların ıslahı veya genetik yapılarının değiştirilmesi gibi biyolojik yöntemler de yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılmaktadır. Başarılı bir şekilde istenilen özelliklere sahip yapılandırılmış yağ elde edebilmek için bu yöntemler arasından en doğru tercihi yapabilmek son derece önemlidir. Hangi yöntemin tercih edileceği kullanılan substratın uygunluğuna ve istenen son ürüne bağlıdır [64].

Kimyasal yolla yapılandırılmış yağ üretiminde alkali metal veya alkali metal alkilatı katalizör olarak kullanılır. Bu katalizörlerden sodyum metoksit kimyasal reaksiyonlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu prosesler yüksek sıcaklık ve susuz ortam koşullarında oluşturulur. Kimyasal esterleşme reaksiyonlarında değişik triaçilgliserol türleri oluşur ve bunların içinde istenmeyen ve uzaklaştırılması zor olan ürünler bulunur. Kimyasal sentez ucuz ve kolay yürütülebilen bir işlem

olmasına rağmen spesifik reaksiyon ürünlerinin üretimi yapılamaz. Saflaştırma işlemleri zordur [65].

Enzimatik yöntem yapılandırılmış yağ üretiminde çok sık kullanılan bir yöntemdir. Enzimatik üretim lipaz enzimleri katalizörlüğünde gerçekleşir. Lipaz katalizörlüğü varlığında yürütülen reaksiyonlar, esterleşme ve hidroliz reaksiyonlarının bir kombinasyonudur. Yapılandırılmış yağların üretilmesi genellikle substratın içinde çözündüğü ve hidrolizin minimum olduğu organik çözücülerde lipaz varlığında gerçekleştirilir. Hidrofobik çözücüler, daha az enzim inaktivasyonuna neden olduğundan tercih edilir. Yapılandırılmış yağların enzimatik yolla üretimi, çevre ve sağlık açısından pek çok olumlu etkiye sahip olduğundan son yıllarda tercih edilir hale gelmiştir. Enzimatik yöntem ile fiziksel özellikleri ve yağ asidi bileşimi açısından farklılık gösteren ve ekonomik değeri olan ürünler üretilmektedir [57,66].

Hayvansal kökenli yağların üretiminin pahalı ve yetersiz olması bitkisel kökenli yağlara olan ilgiyi ve tüketimi arttırmaktadır. Genetik modifikasyon alanında bitkisel kökenli yağlar konusunda yapılan çalışmalar da her geçen gün hız kazanmaktadır. Genetik modifikasyon gen transferi yoluyla mikroorganizmaların, bitkilerin ve hayvanların farklı özellikler kazanmalarını sağlamaktadır. Bu amaçla özellikle bitkisel kaynaklardan yeni yağlar elde etmek için yağ asidi ve triağılglicerollerin biyosentezi için gerekli olan genler bitkiye transfer edilebilmektedir. Bu tip genetik modifikasyonlar mısır, soya fasulyesi, kanola ve diğer yağlı tohumlarda uygulanmaktadır [66].

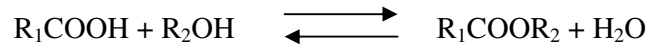
Ayrıca yapılandırılmış yağlar mikroorganizmalardan fermantasyon yoluyla da elde edilebilmektedir. Hayvansal kaynaklı yağlara ve balık yağlarına göre daha basit bir kompozisyona sahip olan bu yağlar ağır metal, pestisit ve kolesterol içermezler [66].

2.4.3.1 Esterifikasyon

Bir alkol ve asidin katalizör varlığında reaksiyona girerek ester oluşturduğu reaksiyonlara esterifikasyon (esterleşme) reaksiyonu adı verilir. Yapılandırılmış yağlar, TAG karışımlarından serbest açıl gruplarının hidrolizinden sonra gerçekleşen esterifikasyon reaksiyonları ile hazırlanabilirler. Esterifikasyon reaksiyonları ile farklı özelliklere sahip yağ asitleri gliserid yapıya katılırlar [67,68].

Esterifikasyon hidrolizin tam tersi gerçekleşen bir reaksiyondur. Hidroliz reaksiyonları ise, su varlığında yağların ester bağlarının kırılması ile gliserol, yağ asitleri ve kısmi açıl gliserollere dönüştüğü reaksiyonlardır. Hidroliz ve esterifikasyon reaksiyonları arasındaki denge değişiminde ortamdaki su miktarı ve aktivitesi son derece etkilidir. Esterifikasyon reaksiyonları tersinir reaksiyonlardır ve susuz ortamda gerçekleşirler. Reaksiyon ortamında aşırı su olması durumunda denge hidroliz yönündedir. Fakat ortamda su miktarı sınırlı ise denge esterifikasyon tarafındadır. Esterifikasyon bir denge reaksiyonudur ve reaksiyon sonucunda su oluşur. Esterifikasyon reaksiyonu sonucunda oluşan suyun birikmesi ve fazlalığı enzimatik reaksiyonlarda çeşitli problemler oluşturabilir. Enzimatik reaksiyonlarda katalizör olarak kullanılan lipazın aktivitesi ortamda biriken su ile inhibe olabilmektedir. Bu durumda oluşan esterlerin hidrolize olma olasılıkları artmaktadır. Bu nedenle esterifikasyon sonucunda oluşan su en doğru şekilde ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Bunun yanında ortamda enzimin aktivitesini sürdürebileceği oranda suyun geride bırakılması da son derece önemlidir [68].

Esterifikasyon sonucunda ortamda monoaçilgliseroller (MAG), diaçilgliseroller (DAG) ve triaçilgliseroller (TAG) oluşmaktadır. Reaksiyon ürünleri MAG, DAG ve TAG karışımı ile reaksiyona girmemiş gliserolden oluşmaktadır. Bu ürünlerin kozmetik, gıda, eczacılık gibi birçok alanda uygulaması mevcuttur [67]. Şekil 2.5’de genel olarak esterifikasyon reaksiyonu görülmektedir.



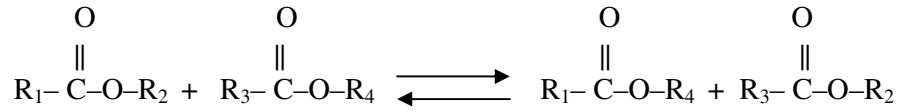
Şekil 2.5 : Esterifikasyon Reaksiyonu [67]

2.4.3.2 İnteresterifikasyon

İnteresterifikasyon (iç esterleşme) reaksiyonları bir ester ile başka bir bileşen arasında gerçekleşen açıl grup değişimleridir. Reaksiyonlara giren bileşenler asit, alkol veya ester olabilir. Reaksiyonlar sonucunda farklı bir ester oluşumu gerçekleşir. İnteresterifikasyon tek başına ya da diğer yöntemlerle beraber kullanılarak yapılandırılmış yağların fiziksel ve fonksiyonel açıdan istenilen özelliklerde üretilmelerini sağlamaktadır. Hem kimyasal hem de enzimatik olarak interesterifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilebilmektedir [32,57].

2.4.3.3 Transesterifikasyon

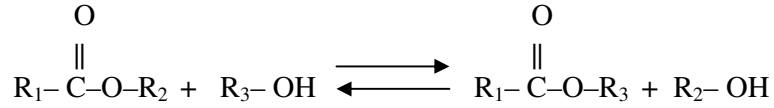
Transesterifikasyon reaksiyonu, iki ester arasında gerçekleşen açıl grup değişimidir. Bunun yanında bazı kaynaklarda transesterifikasyon bir ester ile bir alkol, bir asit, bir başka ester veya amin arasında gerçekleşen reaksiyonları ifade eden genel bir terim olarak da kullanılmaktadır. Yapılandırılmış yağların üretiminde kullanılan en temel reaksiyonlardan biri transesterifikasyon reaksiyonudur. İki TAG arasından yağ asitlerinin yer değiştirmesi ile yeni TAG oluşumunu sağlayan transesterifikasyon reaksiyonu yağlara farklı özellikler kazandırmada son derece etkindir [57]. Şekil 2.6'da iki farklı triaçilgliserol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.6 : İki Farklı Triaçilgliserol Arasındaki Transesterifikasyon Reaksiyonu [57]

2.4.3.4 Alkoliz

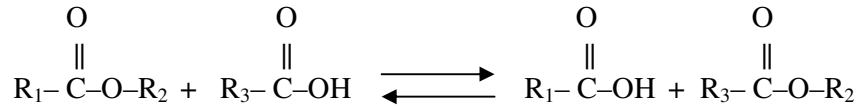
Alkoliz, bir alkol ve bir ester arasında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonudur. Reaksiyon sonucunda yeni bir alkol ve ester oluşumu gerçekleşir. Alkoliz sırasında TAG'ların hidrolizi ile DAG ve MAG oluşabilir. Alkoliz, triaçilgliserol ve metanolün esterifikasyonu ile metil ester elde etmek için kullanılabilir. Ayrıca alkolizin en temel uygulamalarından biri gliseroliz reaksiyonudur. Gliseroliz reaksiyonu, triaçilgliserol ve gliserol arasındaki açıl grup değişimidir. Gliseroliz sonucunda TAG, DAG ve MAG'lar oluşmaktadır. Alkoliz reaksiyonu bir denge reaksiyonudur ve alkol fazlası reaksiyonu ürün lehine döndürür. Alkoliz reaksiyonlarında metanol, bütanol, propanol gibi basit alkoller kullanılır. Bu alkoller arasında en çok metanol kullanım alanı bulmaktadır. Çünkü, metanol kısa zincirli bir alkoldür ve polar bir bileşiktir [57]. Şekil 2.7'de bir açilgliserol ve bir alkol arasında gerçekleşen alkoliz reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.7 : Bir Açılglicerol ve Bir Alkol Arasındaki Alkoliz Reaksiyonu [57]

2.4.3.5 Asidoliz

Asidoliz bir asit ve bir ester arasındaki açıl grup değişiminin gerçekleştiği interesterifikasyon reaksiyonudur. Asidoliz, yeni serbest yağ asidinin triaçilgliserole katılımını gerçekleştirmede son derece etkili bir yöntemdir. Asidoliz reaksiyonunda serbest ya da etil ester formundaki yağ asitlerinin yağlara inkorporasyonu söz konusudur. Bitkisel yağlar ve balık yağlarından yaygın olarak asidoliz yöntemi ile yapılandırılmış yağ üretilmektedir [57]. Şekil 2.8’de bir açılglicerol ve bir asit arasındaki asidoliz reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.8 : Bir Açılglicerol ve Bir Asit Arasındaki Asidoliz Reaksiyonu [57]

2.4.4 Yapılandırılmış yağların kullanım alanları

Yapılandırılmış yağlar, insan sağlığına olumlu etkileri ve besinlerin kullanım fonksiyonlarına olan katkıları dolayısıyla birçok kullanım alanı bulmaktadır. Yapılandırılmış yağların potansiyel kullanım alanları arasında margarinler, tereyağları, kızartma yağları, azaltılmış veya düşük kalorili yağlar bulunmaktadır. Günlük olarak büyük tüketim miktarlarına ulaşan tüm bu yağ çeşitlerinin birçok özelliği insan sağlığını olumlu ya da olumsuz yönde etkilemektedir. Doymuş yağ asidi içeriği yüksek olan margarinlerin tüketimi kalp ve damar hastalıklarına neden olabilmektedir. Yapılandırılmış yağların sentezi ile doymamış yağ asidi içeriği yüksek margarinler üretebilmek ve olası hastalıkları önleyebilmek mümkündür. Bunun yanında tereyağı ve margarinin erime özellikleri de tüketici tarafından oldukça önemlidir. Yüksek oranda doymuş yağ asidi içeren yağlar oda sıcaklığında katı, yüksek oranda doymamış yağ asidi içeren yağlar ise oda sıcaklığında sıvı olmaya eğilimlidirler. Tereyağı ve margarinin erime özelliklerini istenen şekilde olumlu yönde değiştirmek için yapılandırılmış yağ üretimi gerçekleştirilir [60].

Yapılandırılmış yağların en çok ilgi çeken uygulama alanlarından biri de, bir TAG molekülüne SCFA, MCFA ve LCFA katılımı ile elde edilen düşük kalorili yağ sentezidir. Yapıya bağlanan kısa zincirli yağ asitlerinin uzun zincirli yağ asitlerine oranla daha az kalori vermeleri, düşük kalori değerine sahip yağların üretilmesini sağlamaktadır. Caprenin ve Salatrim 5 kcal/g kalori değerine sahip kalorisi düşürülmüş yapılandırılmış yağlardır. Caprenin, hindistan cevizi, palm çekirdeği ve kolza yağlarından elde edilebilen kaprilik ve kaprik asit ile behenik asidin esterifikasyonu sonucu oluşur. Salatrim ise kanola ve soya gibi bitkisel yağların çeşitli SCFA'larla transesterifikasyonu sonucunda üretilmektedir. Caprenin kakao yağı benzeri özellikler göstermektedir. Bundan dolayı caprenin şekerleme ürünlerinde kakao yağı yerine kullanılabilir. Süt ürünleri, çikolata kaplı şekerlemeler, karamel, unlu mamuller, mayonez ve soslar ise salatrimin kullanıldığı ürünlere örnek olarak gösterilebilir [60,68].

Kakao yağı ikameleri, şekerlemeler, yumuşak şekerler, bebek mamaları, cipsler, unlu mamuller, soslar, çerez gıdalar ve günlük süt ürünleri yapılandırılmış yağların diğer kullanım alanları arasındadır. Örneğin, kalorisi düşürülmüş yapılandırılmış yağlar unlu gıdalarda, süt ürünlerinde, soslarda ve kakao ikame yağlarında kullanılır. Kakao yağı, şekerleme ve çikolata sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat kakao yağının fiyatının çok yüksek olması, üreticileri diğer yağları yapılandırarak, kakao benzeri yağları üretmeye yöneltmiştir. Kakao eşdeğeri yağlar kimyasal ya da enzimatik interesterleşme reaksiyonları ile üretilir. Bu amaçla, palm yağı veya ayçiçeği yağı ile stearik asit arasında interesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilebilir [60,65,68].

Anne sütü bebek sağlığı ve gelişiminde çok önemli bir unsurdur. Palmitik asit bebekler için kullanışlı bir enerji kaynağıdır. Anne sütü de %20-30 oranında palmitik asit içerir. Fakat anne sütü yanında bebelere beslenen bebek mamalarının da yağ içeriği, anne sütü ile aynı veya yakın yağ asidi bileşimi ve dağılımına sahip olmalıdır. Bu amaçla anne sütü TAG'larına benzer yapıda yapılandırılmış triaçilgliserol üretimi, sn-1 ve sn-3 spesifik lipaz kullanılarak, palm yağından elde edilen tripalmitin ile oleik asidin asidolizi ile gerçekleştirilir. Bu şekilde yeniden oluşturulmuş TAG'lar bebek mamalarında kullanılır [64,69,70].

Tıbbi uygulamalarda yarar sağlayacak ve sağlık açısından olumlu etkilere sahip yapılandırılmış yağların üretimi son derece önemlidir. Enteral ve parenteral beslenme

tıp alanında hastaya uygulanan beslenme çeşitleridir. Enteral beslenme bir hortum aracılığı ile hastaya mide-bağırsak sisteminden besinin iletilmesidir. Parenteral beslenme ise besinin hastaya damardan verilmesidir. Orta zincirli triağılglicerol (MCT) ve uzun zincirli triağılglicerol (LCT)'lerden oluşan fiziksel karışımlarının enteral ve parenteral beslenmede faydalı oldukları bilinmektedir. Bünyesinde LCFA ve MCFA bulunduran yapılandırılmış yağlar, MCFA'ların daha yavaş ve kontrollü bir şekilde kan dolaşımına katılmasını kolaylaştırmak amacı ile tasarlanmışlardır. MCFA içeren yapılandırılmış TAG'lar uzun zincirli TAG'lara kıyasla daha küçük molekül büyüklüğüne sahiptirler ve sudaki çözünürlükleri daha iyidir. Bu yüzden MCFA içeren yapılandırılmış lipidler, çok çabuk hidroliz olurlar ve absorpsiyonları daha yüksektir [64,71].

Sağlık değeri yüksek yapılandırılmış yağ üretimi gıda ve sağlık açısından olumlu etkileri bilinen bazı yağ asitlerinin TAG moleküllerine katılması ile gerçekleştirilir. Bu amaçla yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan yağ asitlerine örnek olarak *n-3* ve *n-6* yağ asitleri gösterilebilir. Yapılarında *n-3* ve *n-6* yağ asitleri bulunduran yapılandırılmış yağlar, trombozun engellenmesinde, kalp hastalıklarında, bağışıklık sistemini güçlendirmede, alerjik vakalarda, diabet ve kireçlenme ile mücadelede ve kanser riskini azaltmada kullanılabilir [60].

2.5 Enzimatik yöntem ile yapılandırılmış yağ üretimi

Enzimatik yöntemle yapılandırılmış yağ üretiminde gerçekleşen reaksiyonlar hidrolaz grubu enzimlerinden lipazlar tarafından katalizlenmektedirler. Lipazlar ortam koşullarına ve substratlara bağlı olarak, tersinir tepkimelerin her iki yönünü de katalizleyebilmeleri nedeniyle transesterifikasyon, asidoliz ve alkaliz reaksiyonlarında etkili olurlar [57,68].

2.5.1 Yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan lipaz enzimleri

Enzimlere olan ilgi sahip oldukları özellikler nedeniyle gün geçtikçe artmaktadır. Enzimler gıda, deterjan, eczacılık, tekstil ve kozmetik gibi bir çok sanayi dalında yaygın bir şekilde kullanım alanı bulmaktadır. Bu enzimlerden lipaz enzimleri de kimya, gıda, deri, kozmetik ve eczacılık gibi bir çok sektörde kullanılmaya başlanmıştır. Triağılglicerol açıl hidrolazları olarak da bilinen lipazlar hayvansal ve bitkisel triağılglicerollerini diağılglicerol, monoağılglicerol, serbest yağ asitleri ve

gliserole hidroliz eden enzimlerdir. Ayrıca lipazlar esterifikasyon reaksiyonlarını da katalizleyebilirler [68,72].

Lipazlar bitkiler, hayvanlar ve doğal ya da genetik olarak iyileştirilmiş mikroorganizmalar tarafından elde edilebilirler. Mikrobiyal kaynaklı lipazlar kolay üretilibilmeleri nedeniyle ticari olarak çok yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Mikrobiyal lipazlar maya, bakteri ve küf kaynaklarından elde edilen enzimlerdir [72]

Uzun zincirli triaçilgliseroller, lipazların doğal substratlarıdır. Lipazlar heterojen reaksiyon sistemlerinde yağ-su ara yüzeyinde absorbe olduklarında aktif hale gelebilen biyokatalizörlerdir. Lipazlar hidrofobik yüzeylerde yüksek verimlilik göstermektedirler [68,72].

2.5.2 Enzimatik prosesi ve ürün verimini etkileyen faktörler

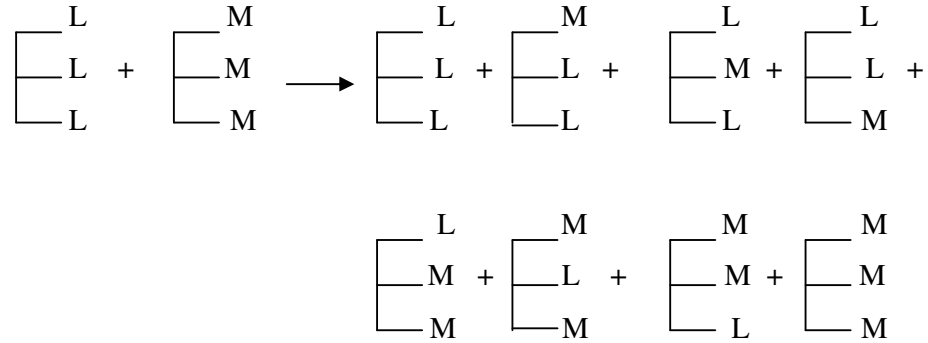
Enzimatik yöntemle yapılandırılmış yağ üretiminde reaksiyon koşullarını ve ürün verimini etkileyen bir çok faktör bulunmaktadır. Reaksiyonlarda kullanılacak enzim çeşidi, enzimin aktivitesi, enzimin miktarı, enzimin yükü, enzimin substrata göre değişen seçiciliği ve diğer özellikleri elde edilecek verim açısından son derece önem taşımaktadır. Ayrıca ortamdaki su miktarı, çözücü çeşidi, ortamın pH'sı, substrat-molar oranı, inkübasyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı, prosesi ve ürün verimini etkileyen diğer faktörlerdir. Reaksiyonların hangi şartlar altında yürütüleceği substratın tipine ve istenen son ürünün özelliklerine bağlı olarak belirlenir [57,68].

2.5.2.1 Lipaz seçiminin etkisi

Lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilen reaksiyonlarda en yüksek verimle en yüksek saflıkta ve istenen özellikte ürün elde etmek amaçlanmaktadır. Bu yüzden reaksiyon ve ürün veriminin artırılmasında enzim seçimi son derece önemlidir [57].

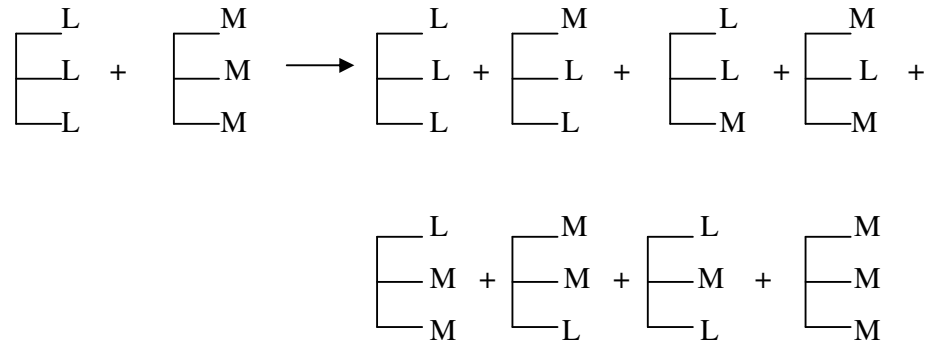
Enzimlerin seçicilik özellikleri reaksiyonların gerçekleşmesi sırasında pek çok avantaj sağlamaktadır. Lipazın seçicilik özelliği enzimin moleküler seçicilik özelliği, substratın yapısı ve enzimin substrata bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından kontrol edilir. Lipazların sahip oldukları yağ asidi seçicilikleri, insan sağlığını olumlu yönde etkileyecek yağ üretiminde ve yağın besin değerini arttırmak için yağ asitleri ile zenginleştirmede kullanılmaktadır. Lipazların pozisyonel seçiciliği, substrat seçiciliği ve stereospesifikliği sayesinde daha verimli bir şekilde istenen özelliklerde yapılandırılmış yağ üretmek mümkündür [68,72]. Bazı lipazlar yağ asitleri ile

gliserid iskeleti arasındaki bağları gelişigüzel şekilde parçalarlar. Pozisyonel seçicilik özelliğine sahip olmayan bu tür lipaz kaynaklarına örnek olarak *Candida sp.* ve *Pseudomonas sp.* gösterilebilir. Şekil 2.9'da pozisyonel seçiciliğe sahip olmayan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonlarının genel yapısı görülmektedir [72]. Şekil 2.9'deki MLL, LML, LLM, LMM, MLM ve MML yapılandırılmış yağları ifade etmektedir.



Şekil 2.9: Pozisyonel Seçiciliğe Sahip Olmayan Lipazların Varlığında Gerçekleşen İnteresterifikasyon Reaksiyonları (L: Uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi) [73]

Pozisyonel seçicilikleri olan lipazlar ise sadece sn-1 ve sn-3 pozisyonundaki yani dıştaki ester bağlarını parçalamaktadırlar. *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus* ve *Rhizopus delemar*, sn-1 ve sn-3 pozisyonunda seçiciliğe sahip olan lipazlara örnek olarak gösterilebilir [72]. Şekil 2.10'da , sn-1 ve sn-3 pozisyonunda seçiciliğe sahip olan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonlarının genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2.10 : sn-1 ve sn-3 Pozisyonunda Seçiciliğe Sahip Olan Lipazların Varlığında Gerçekleşen İnteresterifikasyon Reaksiyonları (L: Uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi) [73]

Yağ asidinin zincir uzunluğuna göre seçici olan lipazlar da bulunmaktadır. Örneğin, *Penicillium cyclopium* lipazı uzun zincirli yağ asitlerini parçalamaktadır. Bunun yanında *Aspergillus niger* ve *Aspergillus delemar* lipazları ise kısa zincirli yağ asitlerine seçicilik göstermektedir. Ayrıca yağ asidi seçici özelliğine sahip lipazlar da mevcuttur. Bu lipazlar cis-9 pozisyonuna karşı duyarlıdırlar. *Geotrichum candidum* lipazı cis-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun yağ asitlerine yönelik seçici özellik göstermektedir [72,73].

2.5.2.2 Su miktarının etkisi

Yapılandırılmış yağ üretimi sırasında gerçekleşen reaksiyonlarda ortamda bulunan su miktarı reaksiyon hızını ve verimini etkilemektedir. Hidroliz ve esterifikasyon reaksiyonları tersinir reaksiyonlardır. Hidroliz reaksiyonunda su tepkimeye girerken, esterifikasyonda su ürün olarak görünmektedir. Su miktarına göre reaksiyon hidroliz ya da esterifikasyon yönünde gerçekleşir [73,74].

Enzimlerin büyük bir kısmı işlevlerini su içerisinde gösterdiklerinden suyun miktarı enzim işlevinde etkili bir parametredir. Enzimlerin sahip oldukları üç boyutlu yapıyı korumaları için ortamda belirli miktarda suyun mevcut olması gerekmektedir. Fakat ortamda aşırı miktarda su bulunması enzim aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Su içeriğinin reaksiyon hızına etkisi enzim kaynağı ve substratı oluşturan bileşenlere göre değişmektedir. Bazı reaksiyonlarda az miktarda su ile yüksek verim elde edilirken, bazılarında ise su miktarı arttıkça reaksiyon hızı da artmaktadır [70,73].

2.5.2.3 Sürenin etkisi

Enzimatik yöntemle yapılandırılmış yağ üretiminde reaksiyonların en kısa sürede en verimli şekilde gerçekleşebilmeleri üretim maliyetlerini düşürmede son derece etkilidir. Genelde uzun reaksiyon sürelerinin, açıl migrasyonunu arttırmasından dolayı daha etkili oldukları bilinmektedir. Enzimatik reaksiyonlarda triağılgiserollere yağ asitlerinin katılımı belli bir süreden sonra sabitlenmektedir. Kullanılan enzimlere ve substratlara göre hem yağlara inkorpore olan yağ asidi yüzdeleri hem de reaksiyonların gerçekleşme süreleri değişim göstermektedir [74].

2.5.2.4 Sıcaklığın etkisi

Enzim aktivitesini belirlemede sıcaklık önemli bir faktördür. Sıcaklık, biyokatalizin gerçekleşmesi için reaktanların çözünmesine yardım eder. Enzimlerin çalışabilecekleri en ideal sıcaklık, optimum sıcaklık olarak ifade edilir ve her enzim için optimum sıcaklık değeri farklıdır. İmmobilize lipazların çoğunluğu için optimum sıcaklık 30 - 62°C arasındadır. Genel olarak sıcaklık artışı reaksiyon hızının artmasına neden olur. Sıcaklık arttıkça hem enzim aktivitesi artış gösterir hem de açıl migrasyonu hızlanır. Fakat çok yüksek sıcaklıklarda enzimler bozunurlar, düşük sıcaklıklarda ise enzimlerin etkinlikleri azalır. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda yağ asitlerinin ısıl bozunmaya uğramaları da reaksiyon hızını azalmaktadır. Bu nedenle reaksiyonlarda optimum çalışma sıcaklığının seçilmesi, enzimin etkinliğini en iyi şekilde gösterebilmesi ve maksimum verimin elde edilmesi açısından son derece önemlidir [74].

2.5.2.5 Substrat mol oranının etkisi

Esterifikasyon reaksiyonlarında kullanılan substrat miktarı ve substratı oluşturan bileşenlerin aralarındaki mol oranları yeni oluşturulan TAG'ın verimini etkilemektedir. Seçilen substrat mol oranı enzimin inhibasyonuna neden olmayacak bir aralıkta seçilmelidir. Belli bir değere kadar substrat mol oranının arttırılması istenen yağ asidinin TAG yapısına katılım miktarını arttırırken aşırı substrat kullanmak inhibasyona neden olabilir. Reaksiyonlardaki substrat mol oranı genellikle prosesin maliyeti ve serbest yağ asitlerinin veya diğer açıl kaynaklarının uzaklaştırılmalarındaki güçlükler göz önünde bulundurularak seçilmelidir [73,74].

2.5.2.6 Solvent sisteminin etkisi

Biyokatalizörler varlığında gerçekleştirilen enzimatik reaksiyonlarda seçilen solventin çeşidi, özellikleri ve karışımın su içeriği oldukça önemlidir. Solvent sistemi, istenen TAG özelliklerini elde etmeye elverişli ve proses koşullarını olumsuz yönde etkilemeyecek şekilde oluşturulmalıdır. Özellikle organik solventlerin seçiminde büyük özen göstermek gerekir. Çünkü, organik solventlerin bazıları, enzimatik reaksiyonları inhibe edebilme etkisine sahiptir. Ayrıca solventlerin hidrofobikliği veya polariteleri enzimlerin üç boyutlu yapılarının korunmasında önemli etkiye sahiptir [57,74].

2.5.3 Kimyasal ve enzimatik yöntemlerin kıyaslanması

Kimyasal ve enzimatik yöntemlerde oluşan reaksiyonlar, açığa çıkan ürünler ve proseslerin işleyişleri bakımından farklılık göstermektedir. Enzimatik reaksiyonların diğer reaksiyonlara göre en önemli avantajı reaksiyonun daha ılımlı koşullar altında yürütülmesidir. Enzimatik reaksiyonlar kimyasal reaksiyonlara oranla daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir. Böylece enzimatik yöntem ile substratın bozunma olasılığı azalır ve enerji tasarrufu sağlanır [60,65].

Enzimatik yöntemde enzimlerin seçicilik özellikleri kullanılarak tepkimeleri yönlendirebilmek mümkün olduğundan istenen niteliklere sahip ürünler elde edilebilir. Enzimlerin seçicilik özellikleri sayesinde yağ asitlerinin TAG yapısındaki dağılımları kontrol edilebilir. Kimyasal katalizörler ise seçicilik özelliğine sahip olmadıklarından, TAG karışımlarında yağ asitlerini rasgele dağıtırlar. Bunun yanında kimyasal reaksiyonlarda istenen özelliklere sahip ürün haricinde istenmeyen pek çok yan ürün oluşumu da gerçekleşmektedir. Enzimatik reaksiyonla oluşan ürünler ise kolay saflaştırılabilir ve reaksiyon sonunda daha az atık oluşur. Enzimatik yöntemde istenmeyen yan reaksiyonlar daha az sayıda oluşur, proses kolay bir şekilde kontrol edilebilir [57, 74, 75].

Son yıllarda yapılandırılmış yağ üretimi ile ilgili gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda, enzimatik yöntemin kimyasal yöntemle oranla daha çok tercih edildiği görülmektedir. Enzimatik yöntemin daha fazla uygulama alanı bulmasında, lipazların seçici özellikleri, ılımlı reaksiyon koşulları ve tanımlanan yapıya sahip ürün elde edilebilmesinin kolaylığı büyük rol oynamaktadır [75].

Enzimatik yöntem ile yapılandırılmış yağ üretiminin birçok avantajı olmasına rağmen ticareti halen başlangıç aşamasındadır. Bu durumun başlıca nedenleri arasında enzimin fiyatı ve büyük ölçekteki proseslerin sorunları yer alır. Bu dezavantajların uygun şekilde proses koşullarının lehi yönünde farklılaştırılması ile enzimatik yöntem ticari anlamda daha çok kullanım alanı bulacaktır [74, 75].

2.6 Literatürde KLA ile yapılandırılmış yağ üretimi üzerine yapılan çalışmalar

Ortega ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada; tam hidrojene soya yağının KLA ile asidoliz reaksiyonu kesikli bir reaktörde ve 75°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. *Candida antarctica*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.* ve

Thermomyces lanuginosus orijinli enzimler toplam substrat ağırlığının %5'i kadar oranında kullanılmıştır. Reaksiyonların sonucunda en yüksek verimi *Rhizomucor miehei* orijinli lipaz enzimi göstermiştir. *Rhizomucor miehei* orijinli lipaz enzimi ile maksimum katılım oranının 12. saatte gerçekleştiği gözlenmiştir. *Candida antartica* ve *Thermomyces lanuginosus* orijinli enzimler ile maksimum katılım 24. saatte gerçekleşmiştir. *Pseudomonas sp.* orijinli enzim ile yapılan çalışmada en düşük reaksiyon hızı gözlenmiş ve bu enzimle yapılan çalışmada en yüksek katılıma 48. saatte ulaşılabilmiştir. Bunun yanında, *Pseudomonas sp.* katalizörlüğünde gerçekleştirilen reaksiyonda oluşan yapılandırılmış TAG fraksiyonları diğer enzimlerle oluşturulan yapılandırılmış TAG'ların erime noktaları ve pozisyonel katılımında büyük fark gözlenmiştir [76].

Martinez ve arkadaşları, değişik çözücülerle mısır yağı ve KLA ile asidoliz reaksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Reaksiyonlarda *Mucor miehei* orijinli IM-60 ve *Candida antartica* orijinli Chirazyme L-2 enzimleri kullanılmıştır. Bu enzimler mısır yağına yüksek oranda KLA katılımını sağlamışlardır. Çözücü olarak kullanılan hekzanın hem en yüksek reaksiyon hızını hem de en yüksek katılım oranını sağladığı gözlenmiştir [77].

Torres ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, ringa balığı yağı ve KLA arasındaki asidoliz reaksiyonu incelenmiştir. Katalizör olarak *Mucor miehei* (L9) orijinli enzim kullanılmıştır. Reaksiyonda reaktanların mol oranları, reaksiyon sıcaklığı ve reaktörün boşluk zamanı deneysel tasarım değişkenleri olarak belirlenmiş ve 3 değişkenli 3 seviyeli faktöriyel tasarım uygulanmıştır. KLA katılım yüzdesi, reaksiyona girmeden kalan n-3 pozisyonu miktarı ve KLA dönüşümü cevap fonksiyonları olarak değerlendirilmiştir. Optimum koşullar 0,8:1 (KLA:ringa yağı) mol oranı, 60°C sıcaklık ve 3 saatlik reaktör boşluk zamanı olarak bulunmuştur [78].

Martinez ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yapılan bir çalışmada, hekzan varlığında mısır yağı ve KLA'nın asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada en yüksek KLA katılımının 1:2,22 (KLA: mısır yağı) mol oranında ve *Rhizomucor miehei* ve *Candida antartica* orijinli enzimler varlığında gerçekleştiği gözlenmiştir. Bunun yanında, KLA katılımının, her iki enzimle yapılan çalışmalarda çoğunlukla TAG'ların sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında gerçekleştiği görülmüştür [79].

Torres ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, ringa balığı yağının KLA ile asidolizinde su içeriğinin KLA katılımına olan etkisi incelenmiştir. Reaksiyonlar *Candida rugosa* enzimi varlığında gerçekleştirilmiştir. Ağırlıkça %0 ile %4 arası su içeriği ile çalışılmıştır. Su içeriği arttıkça reaksiyon hızının arttığını gözlemlemişlerdir [80].

Uribe ve Hernandez tarafından yürütülen çalışmada, farklı TAG'ların KLA ile gerçekleştirdiği enzimatik asidoliz reaksiyonu incelenmiştir. Substrat olarak hindistan cevizi yağı ve trikaprilin kullanılmıştır. Katalizör olarak *Mucor miehei* enzimi seçilmiştir. Reaksiyonlar, KLA miktarı toplam TAG miktarının %10, 20, 30 ve 40 oranlarında olacak şekilde yürütülmüştür. Enzim miktarı toplam substrat miktarının %5'i olacak şekilde belirlenmiştir. Reaksiyonlar 65°C sıcaklıkta 48 saat süre ile yürütülmüştür. Bu reaksiyonlar sonucunda KLA katılımının verimli düzeylerde gerçekleştiği tespit edilmiştir [81].

Martinez ve arkadaşları tarafından gliserinin KLA ile enzimatik esterifikasyonuna ilişkin bir çalışma yürütülmüştür. Reaksiyonlarda çözücü olarak hekzan kullanılmıştır. Reaksiyonlar, *Rhizomucor miehei* ve *Candida antarctica* adında 2 çeşit enzim kaynağı varlığında gerçekleştirilmiştir. Her iki enzim ile çalışıldığında da substrat mol oranı 1:1 olarak seçilmiş ve enzim miktarı da substrat toplamının %5'i olacak şekilde reaksiyonlar yürütülmüştür. *Rhizomucor miehei* enzimi ile 8 saat süre ile 50°C sıcaklıkta gerçekleştirilen reaksiyonda gliserine KLA katılımının %80 oranında olduğu tespit edilmiştir. Aynı substrat mol oranı için *Candida antarctica* enzimi varlığında 8 saat süre ile 40°C sıcaklıkta gerçekleştirilen reaksiyonda ise bu oranın yine %80 olduğu belirlenmiştir [82].

Torres ve arkadaşları tarafından dolgulu yatak reaktörde KLA ile donyağının asidolizinin gerçekleştirildiği bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada katalizör olarak *Thermomyces lanuginosa* adlı enzim kullanılmıştır. Reaksiyonlar sonucunda gliserin zincirine KLA katılımının genellikle sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca reaksiyon kinetiği Michaelis-Menten genel hız eşitliğinden yararlanılarak oluşturulmuş ve kinetik bir çalışma yürütülmüştür [83].

Torres ve arkadaşlarının yürüttüğü başka bir çalışmada ise ringa balığı yağı ile KLA arasındaki asidoliz reaksiyonunun deneysel tasarımını gerçekleştirmek amaçlanmıştır. Reaksiyonlarda *Rhizomucor miehei* enzimi kullanılmıştır. Enzim

miktarı toplam substrat oranının %3'ü ile %6'sı oranında değişecek şekilde seçilmiştir. Toplam substrat miktarı 12 g olacak şekilde her reaksiyonda farklı mol oranları ile çalışılmıştır. Tüm reaksiyonlar 24 saatlik periyotlarda gerçekleştirilmiştir. Yapılan modellemede mol oranı, enzim miktarı ve sıcaklık asidolizi etkileyecek değişkenler olarak belirlenmiştir. Modelleme sırasında Michaelis-Menten mekanizması temel alınmıştır. Çalışma sonucunda düşük mol oranlarında ringa balığı yağına yüksek oranda KLA katılımının olduğu gözlenmiştir. Enzim miktarı ile sıcaklığın ise reaksiyonun dengeye ulaşana kadar geçen süreyi etkilediği görülmüştür. En yüksek KLA katılımının 1.73 mol oranında ve %3 oranındaki enzim miktarı varlığında gerçekleştiği tespit edilmiştir [84].

Garcia ve arkadaşları tarafından organik çözücü ortamında tereyağı ve KLA arasındaki asidoliz reaksiyonuna ilişkin bir çalışma yapılmıştır. Çalışma kesikli ve dolgulu yatak reaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Kesikli reaktörde Chirazyme L-2 ve Chirazyme L-5 enzimlerinin KLA katılımına olan etkileri incelenmiştir. Dolgulu yatak reaktörde ise reaksiyon sırasında Chirazyme L-2 enzimi kullanılmıştır. Farklı sıcaklık ve mol oranlarında asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, reaksiyonlar 2-4 saat aralığında ve 40-60°C sıcaklıklarda yürütüldüğünde, tereyağına KLA katılımının %80-90 oranlarında gerçekleştiği görülmüştür [85].

Garcia ve arkadaşları tarafından yürütülen bir diğer çalışmada ise ringa balığı yağının KLA ile asidoliz reaksiyonu incelenmiştir. Reaksiyonlarda *Mucor miehei*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas* ve *Candida rugosa* enzimleri kullanılmıştır. Substrat miktarı toplam 10 g olacak şekilde ringa balığı yağı ve KLA ağırlık oranı 2:1 olarak seçilmiştir. Reaksiyonlar 50°C sıcaklıkta 72 saat süre gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar sonucunda en hızlı şekilde KLA katılımının *Mucor miehei* enzimi varlığında gerçekleştiği belirlenmiştir [86].

Lee ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise aspir yağına KLA inkorporasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, yapılandırılmış aspir yağının kimyasal özellikleri de incelenmiş ve aspir yağının kendi kimyasal özellikleri ile kıyaslanmıştır. Reaksiyonda katalizör olarak *Rhizomucor miehei* enzimi kullanılmıştır. Enzim miktarı toplam substrat miktarının % 5'i oranında belirlenmiştir. Aspir yağına KLA mol oranı ise 1:3 olacak şekilde seçilmiştir. Reaksiyon 24 saat süre ile 55°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, 2

saatlik reaksiyon sonunda %18.5 olan KLA katılımının, 24 saat sonunda %22,5 oranına yükseldiği görülmüştür [87].

Sehanputri ve arkadaşları dolgu yatak reaktörde tereyağı ve konjuge linoleik arasında gerçekleşen asidoliz reaksiyonunu incelemişlerdir. Reaksiyonlarda *Candida antactica* enzimi kullanılmıştır. Reaksiyonlar 45°C, 50°C ve 55°C sıcaklıklarda, tereyağının KLA'ya farklı ağırlık oranlarında yürütülmüştür. Bu ağırlık oranları 10:1 ve 2:1 olacak şekilde seçilmiştir. Her iki ağırlık oranı için de optimum KLA katılımı, 50°C sıcaklıkta %60 ile %85 oranlarında gerçekleşmiştir [88].

Villeneuve ve arkadaşları yapılandırılmış yağlar konusunda farklı bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada KLA ve laurik asit içeren yapılandırılmış yağlar elde edilmiştir. Yağ olarak hint tohumu yağı kullanılmıştır. Katalizör olarak *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IM) ve *Carica papaya* enzimleri seçilmiştir. Bu enzimlerden *Thermomyces lanuginosa* daha yüksek verimlilik sağlamıştır. Reaksiyonlar sonucunda *Thermomyces lanuginosa* enzimi varlığında katılımın 72. saatte %58,9 olduğu görülmüştür [89].

Kim ve arkadaşları trikaprilin ve KLA arasında oluşan asidoliz reaksiyonunu 6 farklı enzim ve 3 çözücü varlığında gerçekleştirdikleri bir çalışma yürütmüşlerdir. Reaksiyonlar 55°C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Çalışmada sıra ile *Pseudomonas fluorescens*, *Candida rugosa*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizomucor miebei*, *Aspergillus niger* ve *Candida antarctica* enzimleri kullanılmıştır. Substrat karışımı 43,3 mg trikaprilin ve 56,7 mg KLA olacak şekilde hazırlanmıştır. Çözücü olarak hekzan, aseton ve kloroform ile çalışılmıştır. Hekzan varlığında Novozyme 435 enzimi ile en yüksek KLA katılımı % 56,9 oranında gerçekleşmiştir. Bunun yanında en düşük KLA katılımı Lipozyme IM ile kloroform çözücüsünde %16,2 oranında, Novozyme 435 enzimi varlığında aseton çözücüsünde ise %22,2 oranında belirlenmiştir [90].

Nurcan Bakır 2005 yılında fındık yağının KLA ile enzimatik olarak zenginleştirilmesi üzerine bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada, reaksiyon verimine sıcaklık, süre ve substrat mol oranının etkileri incelenmiştir. Bu amaçla Tepki Yüzey Yöntemi uygulanmıştır. Deneyisel tasarımda 41°C, 50°C ve 59°C sıcaklıklarda 6, 15 ve 24 saat süre ile çalışılmıştır. Fındık yağı: KLA mol oranı 1:2, 1:3 ve 1:4 olacak şekilde seçilmiştir. Katalizör olarak *Thermomyces lanuginosa* enzimi kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda elde edilen kritik değerler, sıcaklık için 53,1°C, süre için 20 saat ve mol oranı için ise 1:1,6 olacak şekilde tespit edilmiştir [32].

Pelin Baykar tarafından 2006'da yapılan bir çalışmada çörek otu yağının KLA ile asidolizi ile yapılandırılmış yağlar sentezlenmiştir. Çalışmada *Thermomyces lanuginosa* enzimi substrat miktarının %12'si oranında kullanılmıştır. Reaksiyonlar 50 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Çörekotu yağı KLA mol oranı 1:1, 1:3 ve 1:5 olacak şekilde seçilmiştir. Bu koşullar altında optimum KLA katılımı için reaksiyon süresi 6 saat ve çörekotu yağı KLA mol oranı 1:3 olarak belirlenmiştir [91].

Kıvanç Kızılkurt 2007 yılında kanola yağı ve KLA ile yapılandırılmış yağ üretimi konusunda bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Kanola yağının KLA ile asidolizinde *Thermomyces lanuginosa* enzimi kullanılmıştır. Reaksiyonlarda kanola yağı: KLA mol oranı 1:3 olacak şekilde sabit tutulmuştur. Reaksiyonlar 50 °C sıcaklıkta 6 saat süre ile yürütülmüştür. Enzim miktarı ise toplam substrat miktarının %6, %9 ve %12'si oranında seçilmiştir. Çalışma sonucunda KLA katılımı için optimum enzim miktarı %9 olarak tespit edilmiştir. Bu koşullarda KLA katılımı %35,7 miktarında gerçekleşmiştir [92].

Esra Demiröz 2007 yılında kanola yağından enzimatik asidoliz reaksiyonu yoluyla KLA varlığında yapılandırılmış yağ üretimine ilişkin bir çalışma yürütmüştür. Çalışmada *Thermomyces lanuginosa* enzimi kullanılmıştır. Reaksiyonlar 50 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. 1:3, 1:4, 1:5 olmak üzere üç farklı kanola yağı: KLA substrat mol oranında ve 2, 4, 6 saatlik reaksiyon sürelerinde deneyler yürütülmüştür. Kullanılan enzim miktarı toplam substrat miktarının %12'si olacak şekilde seçilmiştir. Çalışma sonucunda kanola yağına katılan maksimum KLA miktarı substrat mol oranı 1:5 ve reaksiyon süresi 6 saat olduğu durumda elde edilmiştir. Bu koşullarda KLA katılımı %46 miktarında gerçekleşmiştir [93].

Literatürde zeytinyağı ve KLA ile yapılmış tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada Cossigani ve arkadaşları zeytinyağını KLA izomerleri ile zenginleştirmek amacı ile asidoliz reaksiyonları yürütmüşlerdir. Çalışmada, öncelikle, aspir yağından (safflower oil) yüksek verimle KLA izomerleri elde edilmiştir. Reaksiyonlar, *Rhizomucor miehei* ve *Candida antartica* adında 2 çeşit lipaz enzimi varlığında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlarda *Candida antartica* orijinli Novozyme 435 ve *Rhizomucor miehei* orijinli Lipozyme IM enzimleri kullanılmıştır. Zeytinyağı ve

KLA substrat mol oranı 2,3:1 olacak şekilde karıştırılmış ve karışıma 2 mL hekzan ilave edilmiştir. Reaksiyon süresinin etkisi her iki enzim cinsi için de belirlenmiştir. 24, 48 ve 72 saatlik reaksiyon sürelerinde enzim cinslerinin verimliliği tespit edilmiştir. Reaksiyon süresi ilerledikçe zeytinyağına KLA katılımının arttığı gözlenmiştir. Reaksiyon süresinin ilerlemesiyle Lipozyme IM enziminin Novozyme 435 enzimine göre daha yüksek verimlilik gösterdiği belirlenmiştir. Enzim seçiciliğinin yanında, KLA katılımının genellikle sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında gerçekleştiği gözlenmiştir [94].

Bu çalışmada ise zeytinyağı ile KLA arasındaki asidoliz reaksiyonu Tepki Yüzey Metodolojisi esaslarına uygun olarak sistematik olarak incelenmiştir ve reaksiyon koşulları optimize edilmiştir. Reaksiyonda *Thermomyces lanuginosa* orijinli Lipozyme TL IM lipaz enzimi kullanılmıştır. Zeytinyağından KLA' ca zenginleşmiş yapılandırılmış TAG'ların üretiminde ve optimizasyonunda 3 değişkenli ve 3 seviyeli 'Yüzey Merkezli Küp Deney Tasarım' modeli kullanılmıştır. Reaksiyona etki eden 3 değişken olarak enzim miktarı, substrat mol oranı ve reaksiyon süresi seçilmiştir. Ön optimizasyon deneyleri ile bu 3 değişken için 9 seviye değerleri belirlendikten sonra seçilen tasarım modeline uygun sayıda asidoliz reaksiyonları yürütülmüştür. Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi ile zeytinyağının KLA ile asidoliz reaksiyonunun optimum reaksiyon koşulları belirlenmiştir.

2.7 Tepki Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology)

Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM) istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir. Prosesler bağımlı ve bağımsız değişkenlerden oluşmaktadır ve Tepki Yüzey Metodolojisi bağımsız değişkenleri parametre veya faktör, bağımlı değişkenleri ise tepki veya çıktı olarak değerlendirmektedir. TYM bağımlı değişkenin çok sayıda bağımsız değişkenden etkilendiği proseslerin analizinde, modellemesinde ve tepkinin optimizasyonunda uygulanan bir seri deney prosedürüdür. Tepki Yüzey Metodolojisi bir çok endüstriyel problemin çözümünde pek çok yarar sağlamaktadır. TYM, proseslerin içerdiği birden fazla bağımsız değişkenin tepki üzerine olan etkisinin belirlenebilmesi ve optimum çalışma koşullarının en doğru şekilde seçilebilmesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. TYM ile bir seferde, seçilen bağımsız değişkenlerin tepki üzerindeki

etkileri görülebilmekte ve özel deney tasarımları kullanılarak optimizasyon için gerekli deney sayısı azaltılabilmektedir [95,96,97].

TYM, prosten en verimli sonucun alınabildiği tepki değerini bulabilmek amacı ile oluşturulmuş bir teknikler bütünüdür. Bu teknikler üzerinde yapılan ilk çalışmalar 1951 yılında Box ve Wilson tarafından yürütülmüştür. Daha sonra, 1957 yılında Box ve Hunter'in, 1958 yılında Bradley'in, 1960 yılında Davies'in, 1987 yılında Khuri ve Cornell'in ve 1995 yılında Myers ve Montgomery'in TYM üzerindeki çalışmaları kullanılan teknikleri geliştirmiştir. Bu tekniklerin tümünde deneylerin tasarımı ve elde edilen deneysel sonuçların analizi yer almaktadır [98,99].

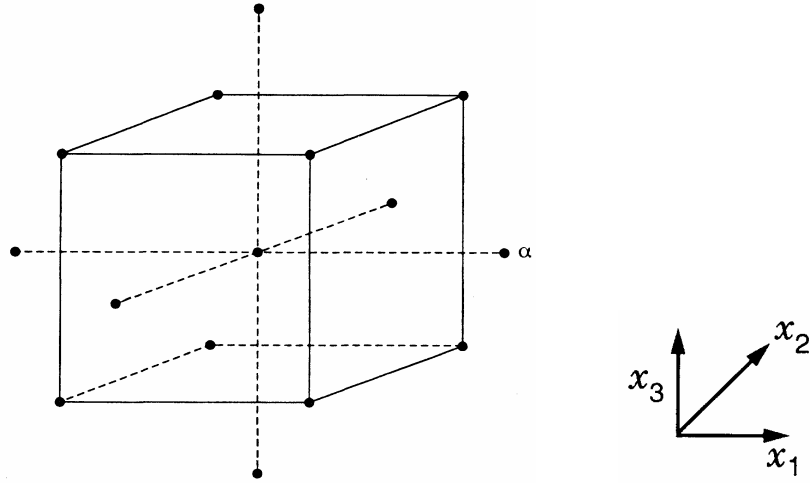
Proseslerde ölçülmek istenen tepki üzerine etki eden çok sayıda değişken bulunmaktadır. TYM kullanılırken tepki üzerine en fazla etki ettiği düşünülen değişkenlerin seçilmesi en doğru sonuçların alınması açısından son derece önemlidir. Değişkenlerin seçiminden sonra ön denemeler ve literatür araştırması ile bu değişkenlerin ölçülebilecekleri değer aralıkları belirlenir. Daha sonra proses için en uygun model denkleminin seçilmesi gerekir. Model denklem, ölçülen tepkiyi proses değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak ifade eder. TYM'de kullanılan model denklemler birinci veya ikinci dereceden olabilir. TYM ile yapılan çalışmalarda daha çok ikinci dereceden model denklemler tercih edilmektedir [95,97,100].

Model denklemin belirlenmesinin ardından optimum noktaya ulaşmak için kullanılan deneysel tasarım yönteminin seçilmesi gerekmektedir. TYM'de en çok kullanılan deneysel tasarımlara Merkezi Bileşik veya Box Behnken Deney Tasarımları örnek olarak gösterilebilir. Bu tasarımlar ikinci dereceden terimler içeren modellerdir, yani bağımsız değişkenler ile çıktı değeri arasında doğrusal yaklaşımın ötesinde bir bağlantı ifade etmektedirler. Bu modeller ile elde edilen sonuçlar tepki yüzey ve izdüşüm (contour) grafikleri ile gösterilerek yorumlanabilir. Tüm bu tasarımlar ile optimizasyon için gerçekleştirilmesi gereken deneylerin koşulları ve deney sayıları belirlenmiş olur [95].

Tepki yüzey ve izdüşüm grafiklerinde iki bağımsız değişkenin çeşitli seviyelerinde elde edilen tepki değerleri y ekseninde gösterilmektedir. Bu şekilde optimizasyon için önemli bir veri olan iki faktörün çıktı üzerindeki etkileri bir cevap yüzeyi şeklinde gösterilmiş olur [95,97].

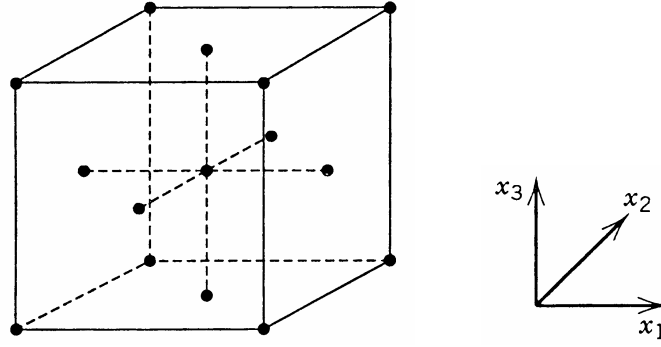
2.7.1 Merkezi bileşik deney tasarımları

Merkezi bileşik deney tasarımları uygulanırken çeşitli deneysel noktalar kullanılmaktadır. Bu deneysel noktalar, küp noktalar (cube points), yıldız noktalar (star points) ve merkez noktaları (center points) olmak üzere üç çeşittir. Küp noktaları için kodlanan bağımsız değişken değerleri ± 1 'dir. Merkezi bileşik deney tasarımında ikinci nokta grubunu oluşturan yıldız noktalarının $(\pm\alpha, 0, 0, \dots, 0)$, $(0, \pm\alpha, 0, \dots, 0)$, $(0, 0, \dots, 0, \pm\alpha)$ olmak üzere değişik koordinatları bulunmaktadır. Diğer nokta grubu ise koordinatları her zaman $(0, \dots, 0)$ olan ve tasarım merkezinde yerleşen merkez noktalarıdır [95,99,101]. Merkezi Bileşik Deney Tasarımında üç faktörlü bir sistem için deney noktaları Şekil 2.11'de görülmektedir. Faktörler x_1 , x_2 ve x_3 şeklinde ifade edilmektedir.



Şekil 2.11: Merkezi Bileşik Deney Tasarımında Üç Değişkenli Bir Sistem için Deney Noktaları Örneği [95]

Merkezi bileşik deney tasarımları içinde sınırlandırılmış, dışından çemberlenmiş ve yüzey merkezli olmak üzere kendi içlerinde farklı türlere ayrılırlar. Bu tasarım türlerinin birbirlerinden ayrılmasında deneyler için kullanılan faktörlerin seviye değerleri etkili olmaktadır. Üç faktörlü bir tasarımda eksensel noktalar küpün yan yüzeylerinin merkezlerinde ise bu tasarım yüzey merkezli tasarım olarak adlandırılır [101,102]. Şekil 2.12'de üç değişkenli bir sistem için Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarım noktaları görülmektedir. Faktörler x_1 , x_2 ve x_3 şeklinde ifade edilmektedir.



Şekil 2.12: Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarımında Üç Değişkenli Bir Sistem için Deney Noktaları Örneği [95]

Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarımında en az iki merkez noktanın olması gereklidir. Yüzey merkezli küp deney tasarımı (Face Centered Design) $\alpha = 1$ 'dir. Tasarım merkezi ise $(0, 0, 0)$ koordinatlarına sahip merkez noktadır. Bu deney tasarımı, yıldız noktaları küpün yüzlerinin tam ortasında bulunmaktadır. Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarımları bağımsız değişkenlerin alt ve üst seviye değerlerinin kesin olarak belirlendiği sistemlerde en doğru sonuçları vermektedirler [97,101,102]. Tablo 2.5'de üç faktörlü sistem için Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarımı görülmektedir.

Tablo 2.5: Üç Faktörlü Sistem için Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarımı [95]

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	0	0
10	1	0	0
11	0	-1	0
12	0	1	0
13	0	0	-1
14	0	0	1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

2.7.2 Varyans analizi (ANOVA)

Varyans analizi özellikle bir çok değişkenin bulunduğu çok seviyeli modellerde kullanılan bir analizdir. Varyans analizi deneysel sonuçların tamamının toplu olarak yorumlanmasını sağlar. Kısaca ANOVA olarak da bilinen varyans analizi, istatistiksel tekniklerin genel toplamıdır. ANOVA nicel ölçümleri kapsayan deneysel verilerin analizi ve elde edilen model hakkında karar verebilmek için geliştirilmiş bir tekniktir [95,97,102].

Varyans analizlerinden elde edilen önem seviyesi, deneyler sonucunda verilen kararın doğruluğunun ne kadar olasılıkla güvenli olduğunu belirler. Önem seviyesi anlamlılık düzeyi olarak da bilinmektedir. Genellikle α ile gösterilen bu ihtimal, çoğu zaman deneysel sonuçların elde edilmesinde önce tayin edilir. Böylece, elde edilen sonuçların yapılan seçimden etkilenmemiş olması sağlanır. Varyans analizi sırasında daha çok 0,05 ve 0,01 anlamlılık düzeyleri kullanılır. Örneğin, 0,05 anlamlılık düzeyi esas alınır, analizin kabul edilebileceği halde reddedilme olasılığı %5 civarındadır. Bu durumda analiz sonucunda verilen kararın doğruluğu %95 güvenli bulunabilir. Bunun anlamı hata yapma olasılığının %5 olduğudur [101].

Varyans analizinde kurulan modele ait keyfi bir anlamlılık düzeyi seçilir ve anlamlılık düzeylerine göre hazırlanmış F tablolarında serbestlik derecelerinin kesişim noktasında bulunan F oranı değerleri ile kıyaslanır. F oranı, ANOVA tablosunda model varyansının hata varyansına oranını ifade eder. Modelin geçerliliği $F_{\text{hesaplanan}}$ ve F_{tablo} değerleri kıyaslanarak anlaşılır. Modelin geçerli olabilmesi için $F_{\text{hesaplanan}} > F_{\text{tablo}}$ olmalıdır [97,102].

2.7.3 Regresyon analizi

Regresyon analizinde bağımlı ve bağımsız değişkenler arasında en uygun bağlantı tespit edilmektedir. Bunu gerçekleştirmek için en uygun deneysel tasarım seçilir. Yapılan deneylerle elde edilen veriler, regresyon analizi sonucunda matematiksel bir formül şeklinde ifade edilir [95,97].

2.7.4 Kalanların toplamı

Deneylerde gözlenen tepki değerleri ile deneysel tasarımdan elde edilen tepki değerlerinin birbirine yakınlıkları, oluşturulan modelin doğruluğunu göstermektedir. Deneylerde gözlenen çıktı değerleri y , deneysel tasarımdan elde edilen çıktı değerleri ise $\hat{y}$ şeklinde gösterilmektedir. Kalanların toplamı, bu değerlerin arasındaki farkların toplamıdır ve seçilen modelin doğru bir model olduğunun göstergesi olarak bu toplamın sıfır ya da sıfıra yakın bir değer olması gerekir [95,97,100]. Matematiksel ifadesi aşağıdaki gibidir:

$$\sum \varepsilon = \sum (y - \hat{y}) \approx 0 \quad (2.1)$$

2.7.5 Korelasyon katsayısı

Tasarımda kullanılan değişkenler arasında etkileşimin olup olmadığı, varsa etkileşimin kuvvetli ya da zayıf olduğu korelasyon katsayısı ile belirlenebilir. Korelasyon katsayısı (R), tasarımdan elde edilen değerler ($\hat{y}$) ile deneysel değerlerin (y), deneysel sonuçların ortalama değerinden ($\bar{y}$) uzaklaşma derecesini vermektedir ve aşağıdaki ifadeden bulunur [97,100].

$$R^2 = \frac{\sum (\hat{y} - \bar{y})^2}{\sum (y - \hat{y})^2} \quad (2.2)$$

R^2 değeri -1 ile +1 arasında değişim göstermektedir. R^2 'nin -1 olması değişkenler arasında negatif tam doğrusal ilişkinin varlığını ortaya koyar, R^2 'nin +1 olması durumunda ise değişkenler arasında pozitif tam doğrusal ilişki söz konusudur [97].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Hammaddeler

Bu çalışmada kullanılan Riviera tipi zeytinyağı ve KLA One (Hard Line Nutrition) marka günlük beslenmeye takviye olarak alınan KLA kapsülleri piyasadan temin edilmiştir. Asidoliz reaksiyonlarında Lipozyme TL IM ticari lipaz enzimi kullanılmıştır. *Thermomyces lanuginosa* kaynaklı ve 1,3-spesifikliği olan bu enzim Novo-Nordisk A/S (Copenhagen, Danimarka) firmasından satın alınmıştır. Reaksiyon ürünlerinin analizlerinde, yağ asitlerinin bileşimlerinin saptanması ve tanımlanmasında kullanılan tüm çözücüler ve kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiş saf ürünlerdir.

3.2 Çalışma Yöntemi

3.2.1 Kullanılan hammaddelerin karakterizasyonu

Çalışmada substrat olarak kullanılan KLA kapsüllerinin kalitatif içeriğinin saptanması İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography) ile yapılmıştır. 0,8 g yağ içeren bir kapsülün tamamı üzerine 10 mL alkol:eter (1:1) (v/v) karışımında çözüldükten sonra, çözeltiden alınan 3 µL lik örnekler Silikajel G 60 ile kaplanmış alüminyum plakalara bir enjektör yardımıyla tatbik edilmiştir. Aynı tabakaya triaçilgliserol, diaçilgliserol, monoaçilgliserol ve serbest yağ asitleri karışımından ibaret olan standard yağ örneği de uygulanmıştır. Tabaka Hekzan:Dietil eter:Asetik asit, 70:30:1 (v/v/v) karışımını içeren çözücü tankına konulmuştur. Burada tabaka komponentlerin birbirlerinden ayrılması için belli bir süre bekletildikten sonra, plaka daha sonra iyot tankında lekelerin görünür hale gelmesi için bırakılmıştır. Tabakanın resmi çekilmiş ve KLA ya ait lekeler ile standard yağın lekeleri karşılaştırılarak KLA nın bileşimi kalitatif olarak belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan substratların (zeytinyağı ve KLA) yağ asidi bileşimleri kapiler gaz kromatografisi (GC) ile saptanmıştır. Bu amaçla önce substratların metil esterleri hazırlanmış ve Hewlett-Packard 5890 Seri II (Hewlett-Packard, Waldron, Almanya)

gaz kromatografi cihazına beslenmiştir. Kromatogramlarda elde edilen piklerin tanımlanmasında, 8:0, 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 ve 20:0 yağ asitlerinden ibaret standart yağ asitlerinin metil esterleri karışımı (Sigma-Aldrich) ile standard KLA metil esterleri karışımı (Arkansas Üniversitesi, Gıda Bilimleri Bölümü, Amerika Birleşik Devletleri)'nın aynı cihaz ve koşullarda yapılan analizlerinden elde edilmiş kromatogramlar kullanılmıştır. Uygulanan kromatografik analiz koşulları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Gaz KromatoGrafik Analiz Koşulları

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

(1) Alev iyonizasyon dedektörü

(2) 30m x 0,25mm, 0,1µm film kalınlığında %5 difenil ve %95 dimetil polisiloksan

3.2.2 Zeytinyağı ile KLA'nın asidoliz reaksiyonunda uygulanan yöntem

Asidoliz reaksiyonları 30 mL'lik koyu kahverengi, kapaklı ve ısıya dayanıklı cam reaksiyon şişelerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şişesine yaklaşık 1 gram substrat karışımı konulmuştur. Bu karışım belirli reaktan mol oranlarında zeytinyağı ve KLA'dan oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Karışıma 5 mL hekzan eklenmiş ve üzerine toplam substrat miktarının ağırlıkça belli orandaki yüzdesi kadar Lipozyme TL IM enzimi ilave edilmiştir. Böylece reaksiyonun gerçekleşeceği karışım hazırlanmış ve bu karışım sıcaklığın 50 °C' de sabit tutulduğu orbital çalkalayıcıya (Edmund Bühler, KS-15, Almanya) yerleştirilmiştir. Reaksiyon sırasında reaksiyon

karışımı 220 rpm sabit hızla karıştırılmıştır. Karışımdan belirli zaman aralıklarında 2'şer mL'lik numuneler alınmıştır. Bu numunelerin analizleri yapılarak asidoliz reaksiyonun ilerleyişi incelenmiş ve değerlendirmeler yapılmıştır.

3.2.3 Asidoliz ürünlerinin analizi

Reaksiyon karışımından alınmış numunelere önce reaksiyonu durdurmak amacı ile 5mL etanol ilave edilmiştir. Asidoliz reaksiyonun ana ürünü, zeytinyağı triaçilgliserollerinden türemiş yeni bir yağ asidi profiline sahip triaçilgliseroller (TAG'lar) dır. Bu TAG'lar ortamda reaksiyona girmemiş KLA ve zeytinyağından açığa çıkmış yağ asitleri ile birlikte bulunurlar. Yeni oluşmuş yapılandırılmış TAG'ların en doğru şekilde analizlerinin yapılabilmesi için, ortamdaki serbest yağ asitlerinin nötralize edilerek uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla 5mL etanol ilave edilmiş numunelere 5mL hekzan eklenmiştir. Bu karışım fenoltalein indikatörlüğünde 0,02 M NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Böylece numune içerisindeki serbest yağ asitlerinden sodyum sabunları elde edilmiştir. Titrasyon işlemi tamamlanan numuneler, ekstraksiyon işlemini gerçekleştirebilmek amacı ile 500 mL'lik ayırma hunisine alınmıştır. Ayırma hunisindeki numune üzerine 25 mL destile su ve 50 mL hekzan ilave edilmiş ve iyice çalkalanmıştır. TAG'lar hekzan fazında çözünürken, su fazına ise yağ asitleri sodyum sabunları geçmiştir. Bu iki fazın birbirinden en iyi şekilde ayrılabilmesi için bir süre beklenilmiştir. Hekzan fazı tamamen nötr olana kadar su ile birkaç kez yıkanmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra ayırma hunisinden alınan yapılandırılmış TAG içeren hekzan fazı döner buharlaştırıcıda çözücüsü tamamen uçurulana kadar evapore edilmiştir. Bu şekilde saf olarak TAG ürünleri elde edilmiştir.

Elde edilmiş olan TAG fraksiyonları 0,4 M metanolik sodyum hidroksit ve BF_3 ile metil esterlerine dönüştürülmüştür. Bunun sonrasında oluşan TAG'ların yağ asidi bileşimleri kapiler gaz kromatografisinde Bölüm 3.2.1'de açıklanan analiz koşullarında belirlenmiştir. Gaz kromatogramlarının değerlendirilmesi sonucunda yapılandırılmış TAG'ların yağ asidi bileşimleri ve zeytinyağına katılan konjuge linoleik asit yüzdesi tespit edilmiştir.

3.2.4 Deneysel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi

Bu çalışmada, enzimatik olarak zeytinyağından konjuge linoleik asitçe zenginleşmiş TAG'ların eldesinde, reaksiyon parametrelerinin (değişkenlerin) ürün bileşimi üzerine olan etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacı ile deneysel tasarımdan yararlanılmıştır. Bu amaçla Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılmıştır. 3 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak asidoliz deneylerinin tasarımı yapılmıştır.

Literatür verilerine göre, yapılandırılmış yağların enzimatik yöntemle üretiminde substrat mol oranı, enzim miktarı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı en önemli değişkenler arasındadır. Optimizasyonun en verimli ve doğru şekilde uygulanabilmesi için değişkenlerin ve değişken etki aralıklarının seçimi son derece önemlidir. Bu seçim yapılırken reaksiyon sistemi dışında, ekonomiklik ve uygulanabilirlik faktörleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Literatürde yapılan çalışmalarda uzun reaksiyon sürelerinde ve yüksek enzim miktarlarında yüksek ürün verimi elde edildiği görülmüştür. Ancak ekonomiklik ve uygulanabilirlik açısından kısa reaksiyon süresi ve az miktarda enzimle çalışmak büyük avantaj sağlamaktadır ve bu yüzden tercih sebebi olmalıdır. Yüksek sıcaklık reaksiyon hızını arttırmakta, fakat sıcaklığın yükseltilmesi ile enzimlerin yapıları bozulabilmekte ve yarılanma süreleri kısalmaktadır. Bunun yanında yüksek substrat konsantrasyonları ile çalışıldığında ürünlerin denge verimlerinde artışlar sağlanabilir, fakat bu yüksek konsantrasyonlar enzimleri inhibe edebilir. Enzimlerin aktivitelerini en iyi şekilde gösterebilmeleri için ortamdaki su miktarı da oldukça önemlidir. Enzimlerin üç boyutlu yapılarını korumaları açısından ortamda bir miktar suyun bulunması gerekmektedir [57,68,73,74].

Bu çalışmada enzim miktarı, substratların mol oranı ve reaksiyon süresi değişken olarak seçilmiştir. Kullanılan enzimin optimum çalışma sıcaklığı 50° C olduğundan reaksiyonlar bu sıcaklıkta gerçekleştirilmiş ve sıcaklık parametre olarak incelenmemiştir. Lipozyme TL IM enzimi yapısında %2-3 su bulundurduğundan reaksiyon için gerekli su enzim ile sağlanmaktadır. Bu yüzden ortamdaki suyun reaksiyona etkisi de incelemeye alınmamıştır.

3.2.5 Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu

Reaksiyon koşullarının optimizasyonu Tepki Yüzey Metodolojisine (TYM) göre yapılmıştır. Bu amaçla, 3 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak 17 asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Deneysel sonuçların istatistiksel analizleri Statistica 7.0 (Stat Soft® Inc.) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçların varyans analizleri ve tepki değerlerinin incelenen değişkenlere göre değişimlerini gösteren izdüşüm (Contour plot) ve tepki yüzey (Response surface) grafikleri değerlendirilerek reaksiyon koşulları optimize edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

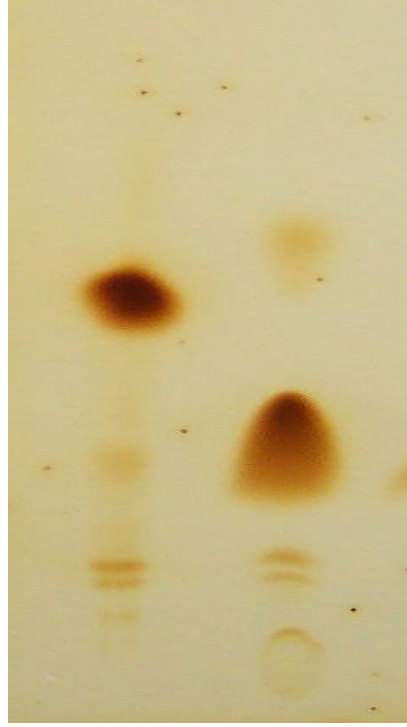
Bu çalışmada zeytinyağından sağlığa daha yararlı olabilecek, vücut metabolizmasını ve bağışıklık sistemini olumlu yönde etkileyecek, hızlı metabolize edilebilen, uzun zincirli konjuge linoleik asitçe zenginleştirilmiş triaçilgliserollerin, enzimatik yöntem ile üretimi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır.

Çalışmanın birinci bölümünde, zeytinyağı ve KLA'nın yağ asitleri bileşimleri saptandıktan sonra, Tepki Yüzey Metodolojisine göre deney noktalarının tasarımı yapılabilmek amacıyla gerekli olan bağımsız değişkenlerin seçimi yapılmış ve her bir değişken için 3 seviye değeri belirlenmiştir. Bu amaçla 3 seri asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Enzim miktarı, substrat mol oranı ve reaksiyon süresinin bağımsız değişkenler olarak seçildiği bu reaksiyonlarda, seçilen bağımsız değişkenlerin yüksek KLA katılımı verebilen etkin çalışma aralıklarında bulunmuş ve bu aralıklarda herbiri için 3 seviye değeri (+1,0,-1 değerleri) tespit edilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, Tepki Yüzey Metodolojisine göre reaksiyon koşullarının optimizasyonu üzerinde deneyler yürütülmüştür. Birinci bölümde bağımsız değişkenler için belirlenmiş 9 seviye değeri kullanılarak, 3 değişken ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun 17 asidoliz deneyi gerçekleştirilmiştir. Deneylerin sonunda elde edilen veriler Statistica 7.0 programı kullanılarak değerlendirilmiş, zeytinyağının konjuge linoleik asit ile asidoliz reaksiyonu optimize edilmiştir. Aşağıdaki bu bölümlerde yürütülen çalışmalara ait veriler ve sonuçlar açıklanmıştır.

4.1 Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri

Çalışmada kullanılan KLA kapsüllerinin içeriği önce kalitatif olarak ince tabaka kromatografisi ile belirlenmiştir. Şekil 4.1'de ince tabaka kromatogramı görülmektedir. Soldan itibaren birinci örnek standard yağa ve ikinci örnek KLA 'ya aittir. Standard yağda koyu renkli büyük leke TAG bileşiğine aittir. KLA daki büyük leke serbest yağ asitlerini göstermektedir. Bu sonuca göre kapsüllerde bulunan KLA serbest yağ asitleri halindedir.



Şekil 4.1: Çalışmada Kullanılan KLA Kapsüllerinin İnce Tabaka Kromatogramı
(Soldan 1. örnek Standard yağ karışımı ve 2. örnek KLA komponentleridir)

KLA kapsüllerinin Bölüm 3.2.1’de sunulan koşullara göre yapılan Gaz Kromatografisi sonuçlarına göre yağ asitleri bileşimi Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1: KLA Yağ Asitleri Bileşimleri

Yağ asidi	Yağ asitleri bileşimi (%)
16:0	3,4
18:2 (KLA)	76,0
18:2	0,7
18:1	17,0
18:0	2,9

Tablo 4.1’de görüldüğü gibi, reaksiyonlarda kullanılan KLA kapsülleri %76 konjuge linoleik asit içermektedir. Ayrıca bu kapsüllerinin içinde az miktarda palmitik, linoleik ve stearik yağ asitleri de bulunmaktadır.

Çalışmalarda kullanılan zeytinyağının yağ asitleri bileşimleri önce Bölüm 3.2.1’de belirtilen koşullarda gaz kromatografik yöntemle belirlenmiştir. Ancak kullanılan kapiler kolonun 18:1 ve 18:2 yağ asitlerini ayıramadığı gözlemlendiğinden, zeytinyağı Vitsan firması’nda analiz ettirilmiştir. Alınan sonuçlar Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Zeytinyağı Yağ Asitleri Bileşimi

Yağ asidi	Yağ asitleri bileşimi (%)
16:1	0,8
16:0	12,2
18:2	9,6
18:1	72,8
18:0	2,7
KLA	0

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi, orijinal zeytinyağı yağ asitleri % 72,8 oleik asit, % 12,2 palmitik asit, % 9,6 linoleik asit, % 2,7 stearik asit ve % 0,8 palmitoleik asitten oluşmaktadır.

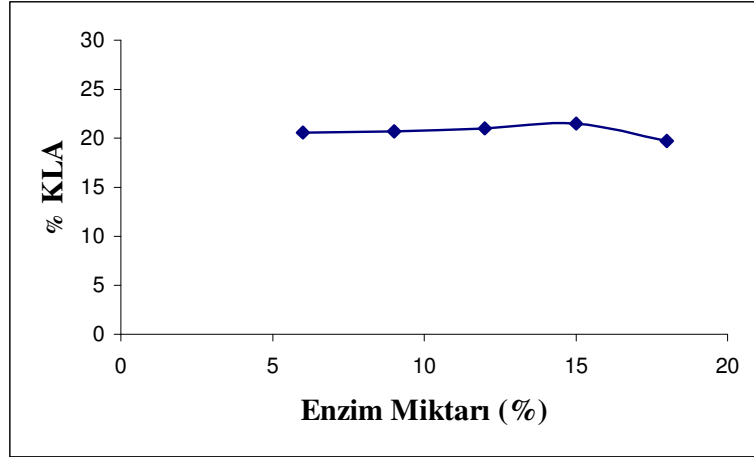
4.2 Tepki Yüzey Metodolojisi’nde Kullanılacak Değişken Seviye Değerlerinin Belirlenmesi

Tepki Yüzey Metodolojisine göre optimizasyonu gerçekleştirebilmek için deneylerin tasarımında, seçilen bağımsız değişkenlerin (enzim miktarının, sustrat mol oranının ve reaksiyon süresinin) seviye değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla önce enzim miktarının seviye değerlerinin tespiti için bir seri asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda, zeytinyağı:KLA mol oranı 1:1 olarak alınmış ve enzim miktarı substratların toplam ağırlığının %3’ü ile %15’i arasında olacak şekilde ortama ilave edilmiştir. Reaksiyonlar 50° C sıcaklıkta ve 220 rpm karıştırma hızında 6 saat yürütülmüştür. Reaksiyon sonunda karışımdan alınmış örneklerden asidoliz ürünü olan TAG lar saf olarak elde edilmiş ve bu TAG ların yağ asitleri bileşimleri belirlenmiştir. Tablo 4.3’de TAG yağ asitleri bileşimlerinin enzim miktarı ile değişimi gösterilmiştir.

Tablo 4.3: Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Enzim Miktarı ile Değişimi (T=50° C; Zeytinyağı:KLA mol oranı, 1:1; reaksiyon süresi 6 saat; E: enzim miktarı; O: Orijinal)

Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (%)					
	TAG (O)	TAG %3 (E)	TAG %6 (E)	TAG %9 (E)	TAG %12 (E)	TAG %15 (E)
16:1	0,8	0,5± 0,02	0,6± 0,02	0,6± 0,02	0,6± 0,1	0,6± 0,1
16:0	12,2	8,5± 0,05	9,2± 0,04	9,3± 0,04	9,2± 0,1	9,0± 0,2
18:2+18:1	84,0	67,6± 0,4	68,8± 0,6	66,2± 0,5	65,7± 0,5	68,1± 0,4
18:0	3,0	2,6± 0,02	2,7± 0,02	2,7± 0,02	2,8± 0,01	2,7± 0,02
KLA	0	20,6± 0,3	20,7± 0,4	21,0± 0,3	21,5± 0,2	19,7± 0,3

Tablo 4.3’de görüldüğü üzere, asidoliz reaksiyonlarında zeytinyağına KLA katılım yüzdesi enzim miktarının artışı ile pratik olarak değişmemektedir. Oluşan yapılandırılmış yağlardaki KLA miktarlarının enzim yüzdesine göre değişimini daha açık bir şekilde görebilmek için, Tablo 4.3’deki değerler kullanılarak Şekil 4.2 oluşturulmuştur.



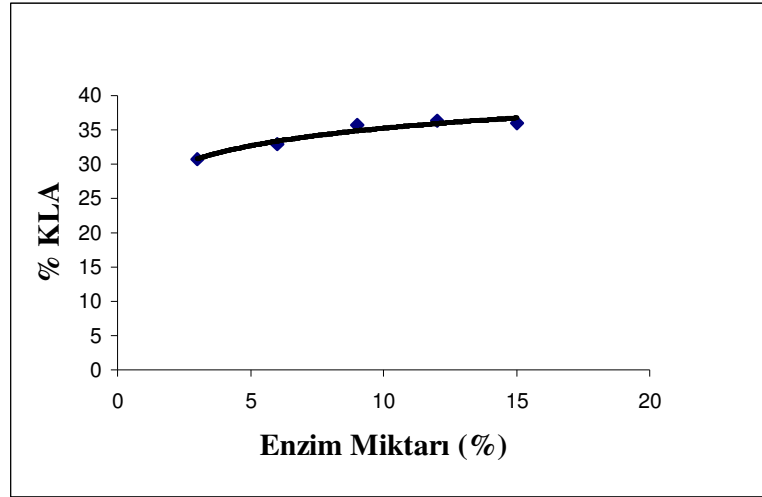
Şekil 4.2: Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Enzim Miktarı ile Değişimi (T=50° C; Zeytinyağı:KLA mol oranı, 1:1; reaksiyon süresi 6 saat)

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi KLA’nın zeytinyağına katılımı ZY:KLA 1:1 mol oranında %20 değerlerinde sabit kalmıştır. Sonuç olarak, substratların (ZY:KLA) mol oranının 1:1 olduğu asidoliz reaksiyonlarında enzim miktarının etkisi görülememiştir. Bu nedenle, reaksiyonlar substratların 1:3 mol oranında aynı reaksiyon koşullarında aynı enzim miktarları ile tekrarlanmıştır. Reaksiyon karışımından alınan ürünlerin analizi yapıldığında Tablo 4.4’de verilen ürün bileşimleri saptanmıştır.

Tablo 4.4: Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Enzim Miktarı ile Değişimi (T=50° C; Zeytinyağı:KLA mol oranı, 1:3; reaksiyon süresi 6 saat; E: enzim miktarı; O: Orijinal)

Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (%)					
	TAG (O)	TAG %3 (E)	TAG %6 (E)	TAG %9 (E)	TAG %12 (E)	TAG %15 (E)
16:1	0,8	0,5± 0,01	0,4± 0,02	0,5± 0,01	0,4± 0,01	0,4± 0,02
16:0	12,2	7,2± 0,05	7,2± 0,06	7,2± 0,05	7,3± 0,04	7,2± 0,05
18:2+18:1	84,0	58,6± 0,4	52,4± 0,5	54± 0,6	54,7± 0,5	53,8± 0,4
18:0	3,0	2,5± 0,02	2,6± 0,03	2,7± 0,03	2,6± 0,02	2,6± 0,01
KLA	0	30,7± 0,4	32,9± 0,4	35,7± 0,3	36,3± 0,3	36± 0,3

Zeytinyağına KLA’nın katılımında enzim miktarının etkisini daha net bir şekilde belirleyebilmek amacı ile daha yüksek substrat mol oranında reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.4’de görüldüğü üzere, %3 enzim miktarında KLA katılımı %30,7 iken, bu katılım %9 enzim miktarında %35,7’ye ulaşmaktadır. Bu artışı daha net bir şekilde görebilmek için Tablo 4.4’teki değerler kullanılarak Şekil 4.3 oluşturulmuştur.



Şekil 4.3: Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Enzim Miktarı ile Değişimi (T=50° C; Zeytinyağı:KLA mol oranı, 1:3; reaksiyon süresi 6 saat)

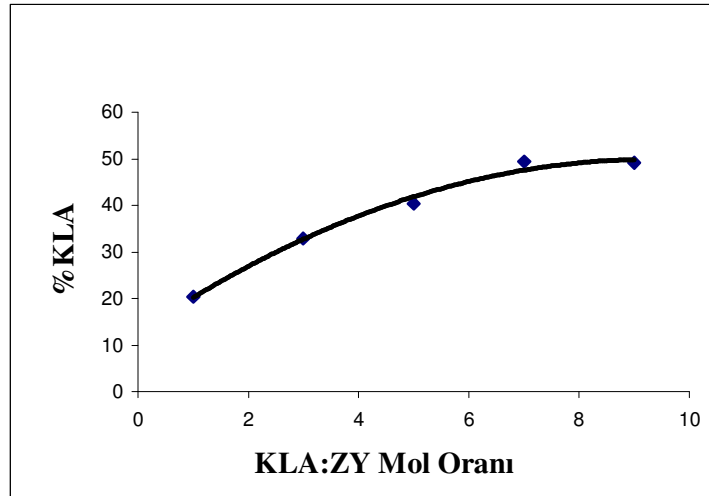
Enzim miktarına göre KLA'nın katılımında görülen artışın incelenmesi ile deneysel tasarımda kullanılacak seviye değerleri (kodları) belirlenmiştir. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi %12 enzim miktarı ve sonrasında KLA katılımı sabit bir değere ulaşmıştır. Bu durumda deneysel tasarımda, %3, %6 ve %9 enzim değerleri ile çalışılmıştır ve bu enzim değerleri -1, 0 ve +1 değişken seviyelerine karşılık gelmektedir.

Enzim miktarı için kodlanan değişken seviyelerinin tespitinden sonra, substratların mol oranının seviye değerlerini belirlemek amacı ile ikinci seri asidoliz reaksiyonları yürütülmüştür. Bu reaksiyonlarda, %6 enzim miktarında ve 6 saatlik sürede ZY:KLA mol oranları 1:1-1:9 arasında değiştirilmiştir. Elde edilen asidoliz ürünü TAG ların gaz kromatografisi ile yağ asitleri bileşimleri saptanmış ve sonuçlar Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5: Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Zeytinyağı:KLA Mol Oranı ile Değişimi (T=50° C; %6 enzim; reaksiyon süresi 6 saat; M: mol oranı; O: Orijinal)

Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (%)					
	TAG (O)	TAG 1:1 (M)	TAG 1:3 (M)	TAG 1:5 (M)	TAG 1:7 (M)	TAG 1:9 (M)
16:1	0,8	0,6± 0,02	0,4± 0,02	0,4± 0,02	0,3± 0,01	0,3± 0,01
16:0	12,2	9,2± 0,04	7,2± 0,06	5,7± 0,05	4,9± 0,04	4,7± 0,03
18:2+18:1	84,0	68,8± 0,6	52,4± 0,5	51,0± 0,4	43,1± 0,3	43,4± 0,2
18:0	3,0	2,7± 0,02	2,6± 0,03	2,3± 0,02	2,3± 0,02	2,3± 0,02
KLA	0	20,7± 0,4	32,9± 0,4	40,4± 0,3	49,4± 0,2	49,2± 0,2

Tablo 4.5'te, %6 enzim miktarı ile değişik substrat mol oranlarında çalışıldığında mol oranının KLA katılımına olan etkisi büyük olmuştur. KLA katılımı 1:1 mol oranında %20,7 iken 1:7 mol oranında ise %49,4 değerindedir. Bu artışı en iyi şekilde görebilmek için Tablo 4.5'teki değerler kullanılarak Şekil 4.4 oluşturulmuştur.



Şekil 4.4: Zeytinyağının KLA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin KLA:Zeytinyağı mol oranı ile değişimi (T=50° C; %6 enzim; reaksiyon süresi 6 saat)

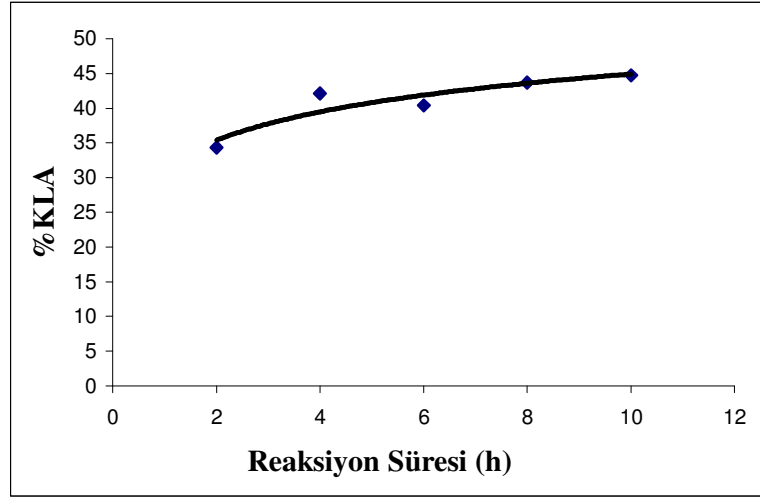
Şekil 4.4'te değişik substrakt mol oranları için KLA katılım yüzdesinin düzenli bir artış izlediği görülmektedir. KLA katılım yüzdesi 1:7 ZY:KLA mol oranında %49,4 değerindedir. 1:7 mol oranından sonra KLA katılım yüzdesinin pratik olarak sabit bir değere ulaşmaktadır. Bu sonuçlara göre, deneysel tasarımdaki -1, 0 ve 1 kodlarına karşılık gelen Zeytinyağı:KLA mol oranı seviye değerleri 1:3, 1:5 ve 1:7 olarak belirlenmiştir.

Son olarak bağımsız değişkenlerden reaksiyon süresi için değişken seviye değerlerini belirlemek amacı ile asidoliz reaksiyonları yürütülmüştür. Bu reaksiyonlar 50° C sıcaklıkta ve substrat miktarının %6 oranındaki enzim miktarı ile 2, 4, 6, 8 ve 10 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonların sonrasında gaz kromatografisi ile tespit edilen ürün TAG'larına ait yağ asidi bileşimleri Tablo 4.6'da belirtilmiştir.

Tablo 4.6: Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Reaksiyon Süresi ile Değişimi (50° C; Zeytinyağı: KLA mol oranı, 1:5; %6 enzim; O: Orijinal)

Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (%)					
	TAG (O)	TAG 2saat	TAG 4saat	TAG 6saat	TAG 8saat	TAG 10saat
16:1	0,8	0,4± 0,03	0,3± 0,02	0,4± 0,02	0,4± 0,01	0,4± 0,01
16:0	12,2	6,6± 0,06	5,7± 0,04	5,7± 0,05	5,7± 0,04	5,7± 0,03
18:2+18:1	84,0	56,0± 0,5	49,3± 0,4	51,0± 0,4	48,2± 0,3	46,7± 0,2
18:0	3,0	2,5± 0,03	2,3± 0,02	2,3± 0,02	2,3± 0,02	2,4± 0,01
KLA	0	34,3± 0,4	42,1± 0,3	40,4± 0,3	43,7± 0,2	44,7± 0,2

Tablo 4.6'da, 1:5 Zeytinyağı:KLA mol oranında ve %6 enzim miktarı ile çalışıldığında, zeytinyağına KLA katılımının sürenin uzaması ile arttığı görülmektedir. KLA katılımı reaksiyon süresi 2 saat iken %34,3, reaksiyon süresi 10 saate ulaştığında ise %44,7'ye ulaşmaktadır. Bu artış reaksiyon süresinin zeytinyağının KLA ile asidolizinde önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Bu etkiyi daha net bir şekilde görebilmek amacı ile Tablo 4.6'daki değerler kullanılarak Şekil 4.5 oluşturulmuştur.



Şekil 4.5: Zeytinyağının KLA ile Asidolizinde, Ürün Triaçilgliserollerinin (TAG) Yağ Asidi Bileşimlerinin Reaksiyon Süresi ile Değişimi (50° C; Zeytinyağı: KLA mol oranı, 1:5; %6 enzim)

Şekil 4.5’de zeytinyağına KLA katılımının yüzde olarak gösterdiği artış açık bir şekilde görülebilmektedir. Belirli bir zamandan sonra KLA katılımına reaksiyon süresinin büyük bir etki göstermediği ve katılımın sabitlendiği Şekil 4.5’de belirtilmektedir. Bu değerlendirmeler sonucunda, yüzey merkezli küp tasarımında kullanılacak, -1, 0 ve +1 kodlarına karşılık gelecek reaksiyon süresi seviye değerleri 2 , 6 ve 10 saat olarak belirlenmiştir.

4.3 Tepki Yüzey Metodolojisi’ne göre Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Konjuge linoleik asitçe zenginleşmiş zeytinyağının enzimatik üretiminde, enzim miktarı, substrat mol oranı ve reaksiyon süresi parametrelerinin etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesinde Tepki Yüzey Metodolojisi uygulanmıştır. Bu çalışmada, 3 değişkenli, 3 seviyeli ve 17 özel tasarım noktası içeren Merkezi Bileşik Yüzey Merkezli Küp Tasarımı esasları temel alınarak alınmıştır. Deneylerin tasarımında seçilen bağımsız değişkenler ve bu değişkenlerin Bölüm 4.2’de belirlenen seviye değerleri Tablo 4.7’de verilmiştir. Yüzey merkezli küp tasarımına göre belirlenen 3 değişkenli ve 3 seviye değerli deney tasarımını noktaları, kodları ve değerleri Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: Yüzey Merkezli Küp Tasarımında Kullanılan Bağımsız Değişkenler ve Bu Değişkenler için Kodlanan Seviyeler

Bağımsız Değişkenler	Kodlanan Değişken seviyeleri		
	-1	0	1
Enzim miktarı (ağırlıkça %)	3	6	9
Zeytinyağı:KLA mol oranı (mol/mol)	1:3	1:5	1:7
Reaksiyon süresi (saat)	2	6	10

Tablo 4.8: Yüzey Merkezli Küp Deney Tasarımındaki Deney Tasarım Noktaları

Deney No	Enzim miktarı (%)		Zeytinyağı: KLA Mol oranı		Zaman (saat)	
	Kod	Değer	Kod	Değer	Kod	Değer
1	-1	3	-1	1:3	-1	2
2	-1	3	-1	1:3	1	10
3	-1	3	1	1:7	-1	2
4	-1	3	1	1:7	1	10
5	1	9	-1	1:3	-1	2
6	1	9	-1	1:3	1	10
7	1	9	1	1:7	-1	2
8	1	9	1	1:7	1	10
9	-1	3	0	1:5	0	6
10	1	9	0	1:5	0	6
11	0	6	-1	1:3	0	6
12	0	6	1	1:7	0	6
13	0	6	0	1:5	-1	2
14	0	6	0	1:5	1	10
15	0	6	0	1:5	0	6
16	0	6	0	1:5	0	6
17	0	6	0	1:5	0	6

Tablo 4.8’de belirlenen koşullarda yşrştşlen 17 asidoliz reaksiyonu sonunda elde edilen TAG şrşnlerinin gaz kromotografisi ile belirlenen yağ asitleri bileşimleri Tablo 4.9-4.12 de gruplar halinde verilmiştir.

Tablo 4.9: Zeytinyağı ile Konjuge Linoleik Asidin Asidolizinde Elde Edilen TAG şrşnlerin Yağ Asitleri Bileşimleri (Enzim miktarı: %3) (Deney No: 1-4 sonuçları)

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	ZY:KLA, 1:3		ZY:KLA, 1:7	
	2 saat	10 saat	2 saat	10 saat
16:1	0,4± 0,04	0,2± 0,03	0,3± 0,06	0,3± 0,05
16:0	8,0± 0,1	7,0± 0,2	6,4± 0,1	6,0± 0,2
18:2+18:1	57,2± 0,4	56,4± 0,3	45,0± 0,3	43,7± 0,4
18:0	2,7± 0,02	2,5± 0,03	2,6± 0,02	2,7± 0,02
KLA	31,3± 0,4	33,7± 0,3	45,5± 0,2	47,2± 0,2

Tablo 4.10: Zeytinyağı ile Konjuge Linoleik Asidin Asidolizinde Elde Edilen TAG şrşnlerin Yağ Asitleri Bileşimleri (Enzim miktarı: %9) (Deney No: 5-8 sonuçları)

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	ZY:KLA, 1:3		ZY:KLA, 1:7	
	2 saat	10 saat	2 saat	10 saat
16:1	0,4± 0,03	0,4± 0,02	0,3± 0,01	0,3± 0,01
16:0	7± 0,03	7,4± 0,02	6,1± 0,2	6,1± 0,2
18:2+18:1	54,2± 0,9	54,0± 0,8	44,5± 0,7	39,1± 0,6
18:0	2,5± 0,05	2,6± 0,04	2,6± 0,03	2,1± 0,02
KLA	35,5± 0,5	36,9± 0,4	46,3± 0,2	47,3± 0,2

Tablo 4.11: Zeytinyağı ile Konjuge Linoleik Asidin Asidolizinde Elde Edilen TAG Ürünlerin Yağ Asitleri Bileşimleri (Süre: 6 saat) (Deney No: 9-12 sonuçları)

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	ZY:KLA, 1:5		ZY:KLA, 1:3	ZY:KLA, 1:7
	%3 Enzim	%9 Enzim	%6 Enzim	%6 Enzim
16:1	0,3± 0,05	0,3± 0,03	0,4± 0,04	0,3± 0,03
16:0	6,1± 0,3	6,3± 0,3	7,6± 0,05	5,9± 0,02
18:2+18:1	47,3± 0,6	44,4± 0,5	53,0± 0,4	43,5± 0,4
18:0	2,6± 0,1	2,5± 0,1	2,8± 0,2	2,7± 0,3
KLA	43,5± 0,3	46,2± 0,2	36,1± 0,2	47,5± 0,1

Tablo 4.12: Zeytinyağı ile Konjuge Linoleik Asidin Asidolizinde Elde Edilen TAG Ürünlerin Yağ Asitleri Bileşimleri (Z.Y:KLA mol oranı: 1:5; Enzim: %6) (Deney No: 13-17 sonuçları)

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)				
	2 saat	10 saat	6 saat	6 saat	6 saat
16:1	0,3± 0,05	0,3± 0,04	0,3± 0,02	0,3± 0,02	0,3± 0,02
16:0	6,8± 0,3	6,2± 0,3	6,1± 0,2	6,0± 0,2	6,0± 0,2
18:2+18:1	46,8± 0,5	45,0± 0,4	45,6± 0,4	45,4± 0,4	45,4± 0,4
18:0	2,6± 0,1	2,5± 0,2	2,5± 0,1	2,5± 0,1	2,5± 0,1
KLA	43,3± 0,3	45,8± 0,2	45,1± 0,2	45,4± 0,2	45,4± 0,2

TYM esaslarına göre yürütülmüş deneylerde elde edilen TAG yağ asitleri bileşimlerinden KLA yüzdeleri tepki değeri olarak Tablo 4.13’de gösterilmiştir.

Tablo 4.13: Yüzey Merkezli Küp Tasarımına göre Yürütülmüş Asidoliz Reaksiyonlarından Elde Edilen Tepkiler

Deney No	Enzim miktarı (%)	Zeytinyağı: KLA mol oranı (mol/mol)	Zaman (saat)	Tepki (%KLA)	
				Gözlenen	Tahmin edilen
1	3	1:3	2	31,3	31,2
2	3	1:3	10	33,7	33,7
3	3	1:7	2	45,5	45,2
4	3	1:7	10	47,2	47,1
5	9	1:3	2	35,5	35,5
6	9	1:3	10	36,9	37,1
7	9	1:7	2	46,3	46,2
8	9	1:7	10	47,3	47,3
9	3	1:5	6	43,5	43,7
10	9	1:5	6	46,2	45,9
11	6	1:3	6	36,1	35,7
12	6	1:7	6	47,5	47,8
13	6	1:5	2	43,3	43,6
14	6	1:5	10	45,8	45,4
15	6	1:5	6	45,1	45,3
16	6	1:5	6	45,4	45,3
17	6	1:5	6	45,4	45,3

4.4 Farklı Reaksiyon Koşullarının Zeytinyağı ile Konjuge Linoleik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Etkilerinin İstatiksel Açıdan Değerlendirilmesi

Tablo 4.13’de belirtilen bağımsız değişken değerlerine karşılık elde edilen tepki değerlerinin istatistiksel analizi için Statistica 7.0 (Stat Soft® Inc.) paket programı kullanılmıştır. 3 değişken ve 3 seviye değerli yüzey merkezli deneysel tasarımda elde edilen tepkilerin değerlendirilmesinde aşağıda verilen 2. dereceden polinom eşitliğinden yararlanılmıştır.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{j=1}^k \sum_{i>j}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (4.1)$$

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

Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerinin tahminleri ve katsayıları programdan elde edilmiştir. Bu değerler Tablo 4.14’de ve varyans analizi sonuçları ise Tablo 4.15 de görülmektedir.

Tablo 4.14: Bağımsız Değişkenler ile Bağımlı Değişkenler Arasındaki İlişkiye Bağlı Olarak Lineer ve Kuadratik Modellerde Etkilerin Tahminleri ve Katsayıları

	Etki	Standart Hata	t	p	Katsayı
Ortalama/Intercept	45,33099	0,145773	310,9705	0,000000	45,33099
(1)Enzim miktarı (L)	2,2	0,215458	10,2108	0,000019	1,10000
Enzim miktarı (Q)	-1	0,416253	-2,4227	0,045911	-0,50423
(2) ZY:KLA mol oranı (L)	12,06000	0,215458	55,9737	0,000000	6,03000
ZY:KLA mol oranı (Q)	-7,10845	0,416253	-17,0772	0,000001	-3,55423
(3)Süre (L)	1,80000	0,215458	8,3543	0,000069	0,90000
Süre (Q)	-1,60845	0,416253	-3,8641	0,006178	-0,80423
Enzim miktarı*Mol oranı (L)	-1,62500	0,240890	-6,7458	0,000266	-0,81250
Enzim miktarı*Süre (L)	-0,42500	0,240890	-1,7643	0,121041	-0,21250
Mol Oranı*Süre (L)	-0,27500	0,240890	-1,1416	0,291164	-0,13750

L : Lineer Q : Kuadratik

Oluşturulan ve 2. dereceden bir polinom olan model denklem aşağıda (4.2) eşitliğinde verilmiştir. Bu denklemde bağımsız değişkenler (X_i) için “S”, “M” ve “E” sembolleri kullanılmıştır. “S” süre, “M” zeytinyağı/konjuge linoleik asit mol oranını ve “E” ise enzim miktarını ifade etmektedir.

$$\begin{aligned} \% \text{ KLA} = & 45,33 + 1,1 * E - 0,504 E^2 + 6,03 * M - 3,554 * M^2 + 0,9 * S - 0,804 * S^2 \\ & - 0,812 E * M - 0,212 E * S - 0,137 M * S \end{aligned} \quad (4.2)$$

Tablo 4.15: Varyans Analizi Sonuçları

Faktör	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	f Değeri	p Değeri
Enzim Miktarı (L)	12,1000	1	12,1000	104,260	0,000019
Enzim Miktarı (Q)	0,6812	1	0,6812	5,869	0,045911
ZY:KLA Mol Oranı (L)	363,609	1	363,6090	3133,05	0,000000
ZY:KLA Mol Oranı (Q)	33,8456	1	33,8456	291,632	0,000001
Süre (L)	8,1000	1	8,1000	69,794	0,000069
Süre (Q)	1,7329	1	1,7329	14,931	0,006178
Enzim Miktarı*Mol Oranı (L)	5,2813	1	5,2813	45,506	0,000266
Enzim Miktarı*Süre (L)	0,3613	1	0,3613	3,113	0,121041
Mol Oranı*Süre (L)	0,1513	1	0,1513	1,303	0,291164
Hata	0,8124	7	0,1161		
Kareler Toplamı	467,555	16			

L : Lineer Q : Kuadratik

Varyans analiz sonuçları incelendiğinde enzim miktarı*süre ve mol oranı* süre lineer etkileşimi haricinde diğer tüm değerler %99 güven aralığında anlamlıdır. Bu durum oluşturulan model denklemin katsayılarının istatistikî olarak %99 doğru olduğunu gösterir. Tablo 4.15’de gösterilen p değeri anlamlılık testi için gerekli bir değerdir. Bu değer Statistica 7.0 programı aracılığı ile Bölüm 2.7.2’de anlatılan F_{tablo} değerinin $F_{\text{hesaplanan}}$ değeri ile kıyaslanması sonucunda bulunmuştur. Tablo 4.15’de gösterilen p değerlerinin 0,01’den düşük olması katsayıların %99 güven aralığında doğru (anlamlı) olduğunu göstermektedir.

Zeytinyağına bağlanan konjuge linoleik asit için oluşturulan model denklemin korelasyon katsayısı (R^2) 0,99 olarak bulunmuştur. Ayrıca deneysel değerler ve tahmin edilen değer arasındaki kalanlar toplamı 0,6 olarak bulunmuştur. Bölüm 2.7.4 ve Bölüm 2.7.5’de anlatıldığı gibi korelasyon katsayısının 1’e yakın olması ve kalanlar toplamının neredeyse 0 olması oluşturulan model denklemin uygunluğunu desteklemektedir.

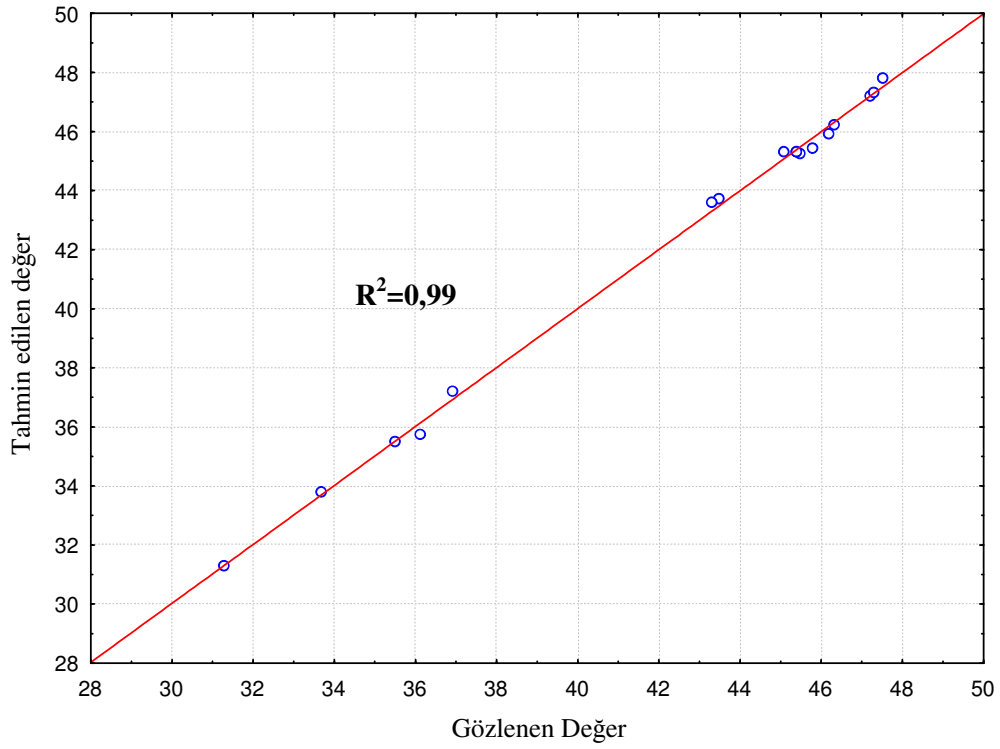
Oluşturulan Tepki-Yüzey modelinde enzim miktarı, ZY/KLA mol oranı ve süre olmak üzere 3 farklı bağımsız değişken için gözlenen minimum ve maksimum değerler ile kritik değerler Tablo 4.16’da görülmektedir.

Tablo 4.16: Bağımsız Değişkenlerin Kritik Değerleri

	Gözlenen minimum değer	Kritik değer	Gözlenen maksimum değer
Enzim miktarı (%)	3	7,1	9
KLA: ZY mol oranı	3	6,6	7
Süre (saat)	2	7,9	10

Tepki yüzey metodolojisine göre elde edilecek kritik tepki değeri % 48,2 olarak bulunmuştur.

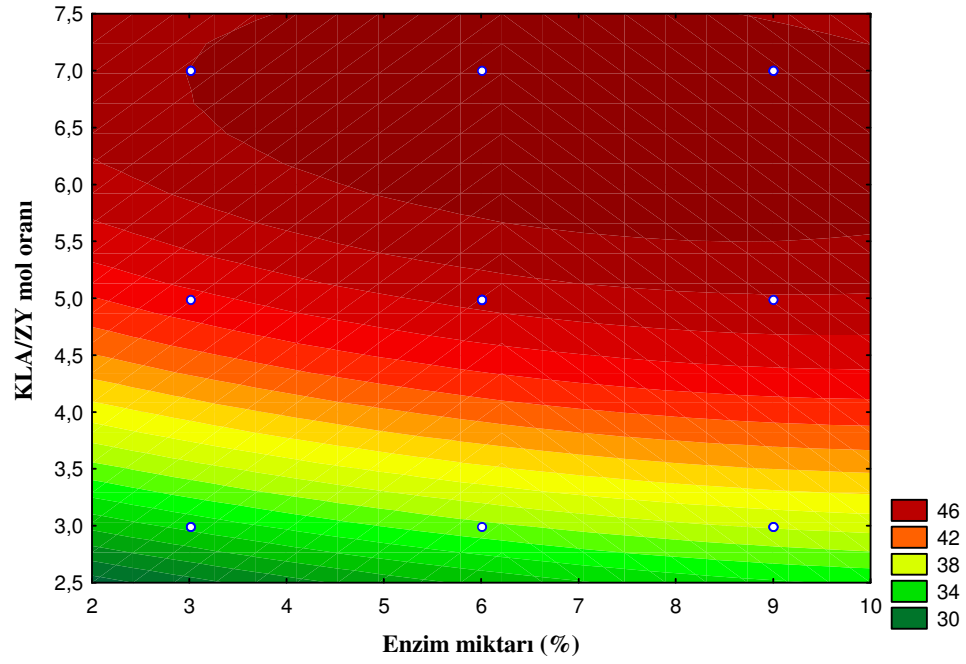
Daha önce elde edilmiş olan model denklemden yararlanarak, gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki ise Şekil 4.6’da verilmiştir.



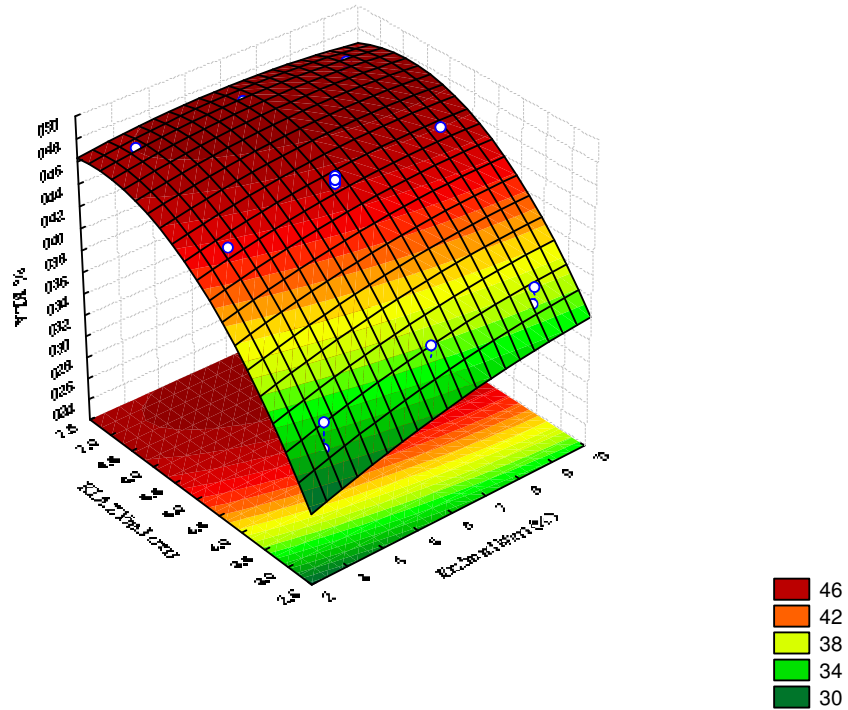
Şekil 4.6: Gözlenen Değerlere Karşılık Tahmin Edilen Değerler Arasındaki İlişki

4.5 Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması

Zeytinyağının konjuge linoleik asit ile enzimatik asidoliz reaksiyonu sonucu elde edilen ürünün KLA içeriğinin, KLA/ZY mol oranı ve enzim miktarına göre değişimini gösteren izdüşüm (Contour Plot) ve tepki-yüzey grafikleri (Response Surface) grafikleri Şekil 4.7.a ve Şekil 4.7.b’de görülmektedir. İzdüşüm grafiklerinde görüldüğü gibi elde edilen tepki değerlerine ait eğriler bir düzlem üzerinde gösterilir. Bu düzleme ait koordinatlar bağımsız değişkenlerin seviyelerini göstermektedir. Her bir izdüşüm eğrisi, bağımsız değişkenlere ait seviyelerin bir birleşimi olarak ifade edilen bir düzlemle yüzey arasındaki yüksekliği temsil eden özel bir değere sahiptir [95]. Konjuge linoleik asit içeriğinin, ZY/KLA mol oranı ve enzim miktarına göre değişimini açıklayan grafiklerden, literatürde maksimum tepki olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir. Şekil 4.7.a incelendiğinde zeytinyağında KLA içeriğinin en yüksek olacağı enzim miktarı aralığının % 3-9 ve ZY/KLA mol oranı aralığının da 1:5-1:7 olduğu görülmektedir.

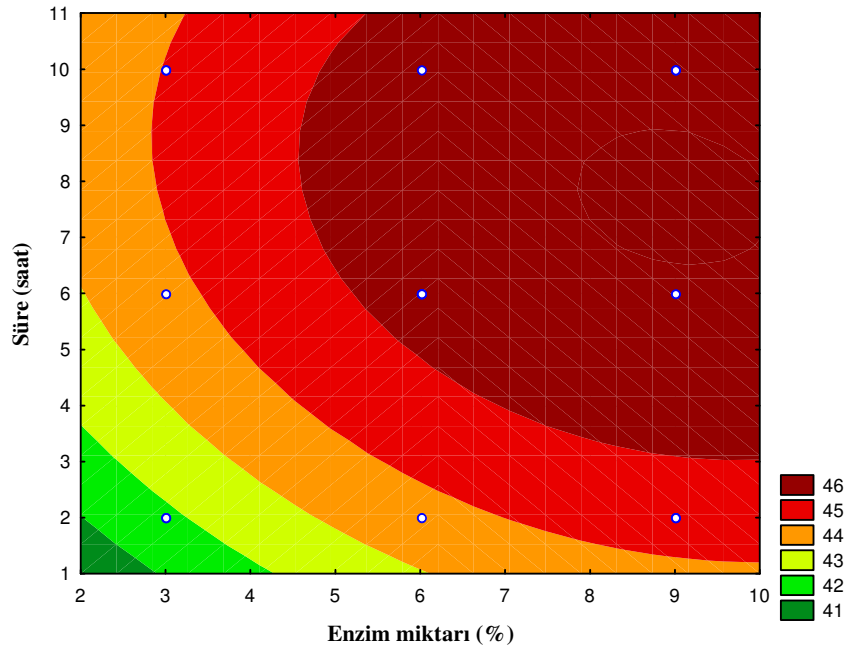


Şekil 4.7.a: Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Mol Oranı ve Enzim Miktarı ile Değişimini Gösteren İzdüşüm Grafiği

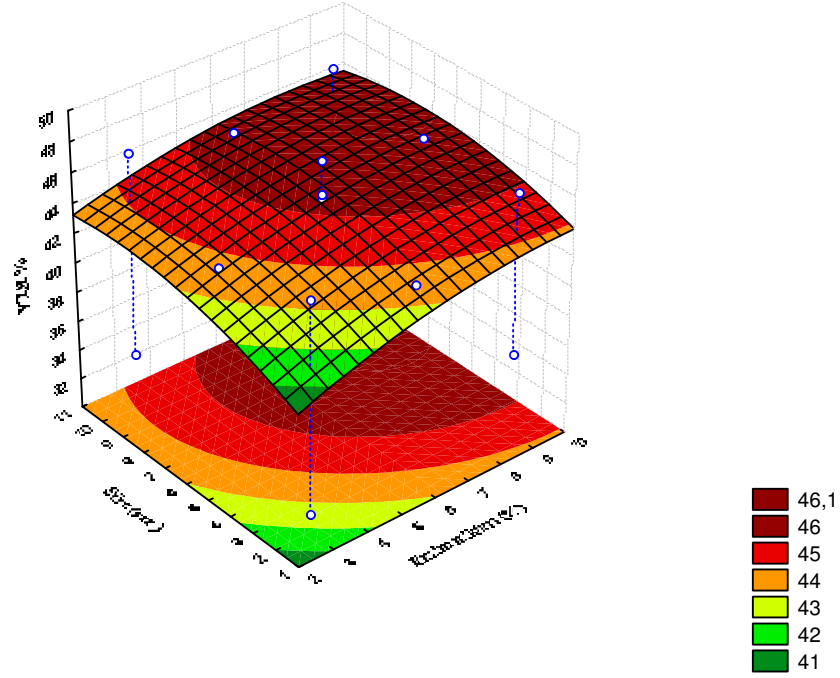


Şekil 4.7.b: Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Mol Oranı ve Enzim Miktarı ile Değişimini Gösteren Tepki Yüzey Grafiği

Zeytinyağının konjuge linoleik asit ile enzimatik asidoliz reaksiyonu sonucu elde edilen ürünün KLA içeriğinin, enzim miktarı ve reaksiyon süresine göre değişimini gösteren tepki yüzey ve izdüşüm grafikleri Şekil 4.8.a ve 4.8.b’de görülmektedir. KLA içeriğine enzim miktarı ve reaksiyon süresinin birbirleri olan etkileşimleri sonucunda literatürde maksimum tepki (maximum response) olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir. Çalışmada gözlenen değer aralığında, enzim miktarının % 6-9 ve reaksiyon süresinin de 6-10 aralığında olması durumunda zeytinyağında KLA içeriği yüksek değerlere ulaşmıştır.

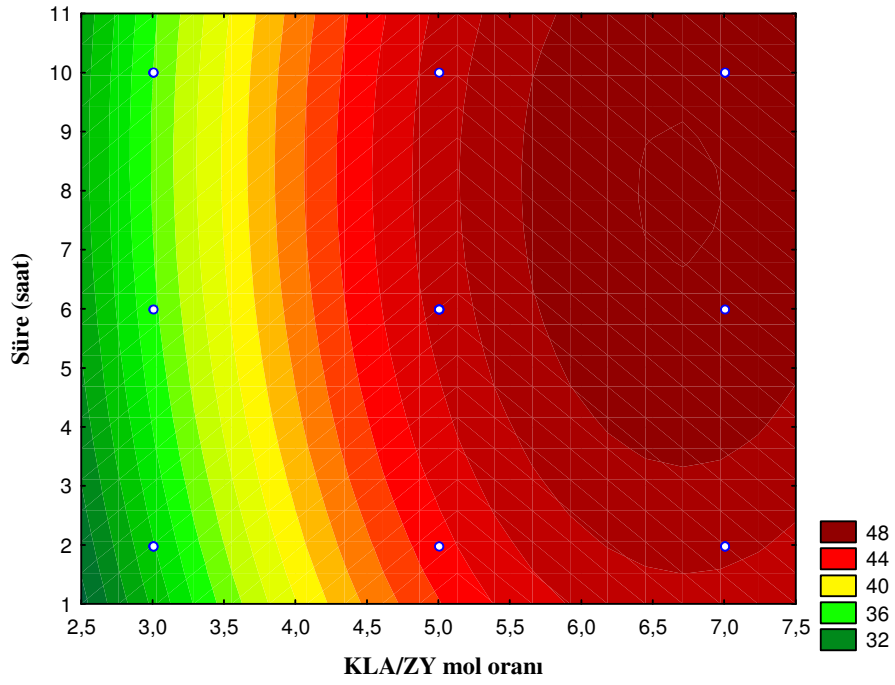


Şekil 4.8.a: Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Enzim Miktarı ve Reaksiyon Süresi ile Değişimini Gösteren İzdüşüm Grafiği

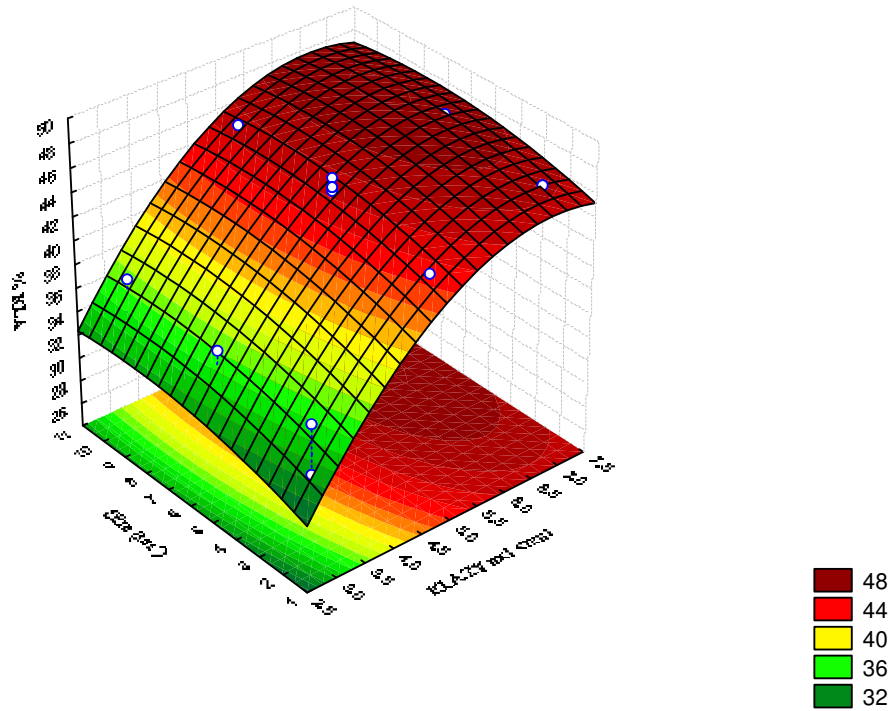


Şekil 4.8.b: Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Enzim Miktarı ve Reaksiyon Süresi ile Değişimini Gösteren Tepki Yüzey Grafiği

Konjuge linoleik asit içeriğinin reaksiyon süresi ve mol oranına göre değişimini gösteren tepki yüzey ve izdüşüm grafikleri Şekil 4.9.a ve 4.9.b’de görülmektedir. Mol oranı ve reaksiyon süresinin konjuge linoleik asit içeriğine etkileri sonucunda literatürde maksimum tepki (maximum response) olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir. Çalışmada gözlenen değer aralığında, ZY/KLA mol oranının 1:5-1:7 ve reaksiyon süresinin de 6-10 aralığında olması durumunda zeytinyağına inkorpore olmuş KLA yüzdesinin yüksek değerlere ulaştığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.9.a: Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Mol Oranı ve Reaksiyon Süresi ile Değişimini Gösteren İzdüşüm Grafiği



Şekil 4.9.b : Ürünün Konjuge Linoleik Asit İçeriğinin (%KLA), Mol Oranı ve Reaksiyon Süresi ile Değişimini Gösteren Tepki Yüzey Grafiği

5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İnsan sağlığı ve beslenme açısından yağlar büyük öneme sahiptirler. Günlük diyetle alınan yağ miktarı ve kompozisyonu olası kalp ve damar hastalıkları ile diğer rahatsızlıklarla ilişkilendirildiğinde, daha az miktarda yağ tüketiminin yanı sıra kullanılan yağın kalitesinin geliştirilmesi de önem kazanmış bulunmaktadır. Bu amaçla son yıllarda yapılandırılmış yağlar üretilerek, tüketicilere besin içeriği zenginleştirilmiş, sağlığa olumlu etkileri olan ve farklı niteliklerde yeni alternatif yağlar sunulmaktadır.

Türkiye, dünya zeytinyağı üretiminde ilk sıralarda yer almaktadır. Zeytinyağı ekonomik değerinin yanında, sahip olduğu yağ asitleri, hidrokarbonlar, steroller ve diğer azınlık bileşenler açısından oldukça önemli bir besindir.

Konjuge linoleik asit (KLA) konjuge çift bağ içeren linoleik asidin pozisyonel ve geometrik izomerlerinin bir karışımını ifade eder. Son yıllarda kalp ve damar hastalıkları ile kanser üzerine yapılan çalışmalarda KLA'nın insan sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkisinin olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada zeytinyağından sağlığa daha yararlı olabilecek uzun zincirli konjuge linoleik asitçe zenginleştirilmiş triaçilgliserollerin, enzimatik yöntem ile üretimi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla, zeytinyağı ile KLA'nın 1,3-spesifik *Thermomyces lanuginosa* kaynaklı Lipozyme TL IM lipazı varlığında asidoliz reaksiyonu sistematik olarak incelenmiştir.

Çalışmada, zeytinyağı ile KLA'nın asidolizinde enzim miktarı, substrat mol oranı ve süre reaksiyon parametreleri (bağımsız değişkenler) olarak seçilmiştir. Çalışmanın birinci bölümünde, seçilen bu bağımsız değişkenlerin asidoliz ürünü yapılandırılmış triaçilgliserollerin (TAG) yağ asitleri bileşimine, özellikle KLA içeriklerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, üç seri asidoliz reaksiyonu yürütülmüştür. Bu reaksiyonlar sonucunda, reaksiyon parametrelerinin yüksek KLA içerikli ürünler verebilecek etkin çalışma aralıkları ve bu aralıklarda herbiri için üç seviye değerleri (minimum, kritik ve maksimum değerleri) belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, üç değişken için belirlenmiş dokuz seviye değeri kullanılarak Tepki Yüzey Metodolojisine göre reaksiyon koşullarının optimizasyonu üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Optimizasyon için seçilen 3 değişken ve 3 seviyeli Yüzey Merkezli Küp Tasarımı'na uygun 17 asidoliz deneyinin çalışma koşulları belirlenmiş ve deneyler bu esas üzerinden gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar sonucunda ele geçen TAG ürünlerinin KLA içerikleri tepki değerleri olarak Statistica 7.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. İstatiksel analiz sonucunda, tepki değerlerinin değişkenlere göre değişimini veren 2. dereceden bir polinom olan bir model denklem oluşturulmuştur. Gözlenen değerlerle model denklemin verdiği tahmin değerler arasındaki lineer ilişkinin korelasyon katsayısı 0,99 olarak saptanmıştır.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi ile ayrıca reaksiyon için kritik değerler, enzim miktarı %7,1, KLA:ZY mol oranı 6,6 ve reaksiyon süresi 7,9 saat olarak saptanmıştır. Bu koşullarda %48,2 oranında KLA içeren triaçilgliseroller elde edilebileceği belirlenmiştir. Saptanan bu optimum koşullarda zeytinyağı ile KLA'nın asidoliz reaksiyonu gerçekleştirildiğinde, içeriğinde %48,8 KLA bulunan TAG ürünü elde edilmiştir. Bu sonuçla oluşturulan model denklemin doğruluğu deneysel olarak da ispatlamıştır.

Zeytinyağının KLA ile asidoliz reaksiyonunun optimizasyonu üzerinde literatürde herhangi bir çalışma bulunmadığından, bu çalışmadan elde edilen sonuçların literatüre bilimsel bir katkısı olacaktır.

Dünya'da zeytinyağı üretiminin %60'ı Avrupa ülkelerinde gerçekleştirilmektedir ve Türkiye de zeytinyağı üretiminde önemli bir yere sahiptir. Bu durum göz önüne alındığında mevcut zeytinyağı potansiyeli en iyi şekilde değerlendirilebilir, zeytinyağı ve sağlığa bir çok faydası olan KLA'in asidolizi ile tüketicilere farklı niteliklerde yapılandırılmış yağlar sunulabilir.

Sonuçlar gözönüne alındığında zeytinyağının KLA ile asidolizi üzerinde çalışmaların devam etmesi, özellikle farklı lipaz ve farklı reaksiyon koşullarında denemelerin yapılması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] **Boskou, D.**, 1996. *Olive Oil: Chemistry and Technology*, pp. 3-79, AOCS Press Illinois.
- [2] **Firestone, D.**, 2005. Olive Oil, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Volume 2, pp. 303-331, Ed. Shahidi, F., John Wiley & Sons, Canada America.
- [3] **Ünsal, M.**, 2003. Zeytinyağına Lezzet Veren Bileşenler, *Gıda*, **8**, 84-88.
- [4] **Anonim, Zeytin Ağacı**, 2006. Zeytin, Available, www.zeytinagaci.com.
- [5] **Yemişçioğlu, F., Gümüşkesen A. S. ve Otağ R. M.**, 2001. Zeytinyağı Üretiminde Kullanılan Sürekli Sistemler ve Bu Sistemlerin Klasik Presleme Yöntemi ile Karşılaştırılması, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **9**, 26-30.
- [6] **Bogani, P., Galli C., Villa M. and Visioli F.**, 2007. Postprandial Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Extra Virgin Olive Oil, *Atherosclerosis*, **190**, 181-186.
- [7] **Tunahoğlu, R.**, 2002. Zeytinyağı, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, *T.E.A.E-Bakış*, **1**, 1-4.
- [8] **Reyes, J. F. G., Ferrer, C., Ramos, M. J. G., Alba, A. R. F. and Diaz, A. M.**, 2007. Determination of Pesticide Residues in Olive Oil and Olives, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **26**, 239-251.
- [9] **Başoğlu, F.**, 2002. *Yemeklik Yağ Teknolojisi*, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları, 64.
- [10] **Nas, S., Gökalep H. Y. ve Ünsal, M.**, 2001. *Bitkisel Yağ Teknolojisi*, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları Yayını, 10-180.
- [11] **Komili Unilever T.A.Ş.**, 2001. Zeytinyağının Tarihsel Gelişimi, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **9**, 18-20.
- [12] **Anonim, Zeytinyağı Tipleri**, 2007. Zeytinyağı, Available, www.orkide.com.tr.

- [13] **Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, J. D. R. , Bishop, A. G., Prenzler, P. D. and Robards, K.,** 2007. Olive Oil Volatile Compounds, Flavour Development and Quality: A Critical Review, *Food Chemistry*, **100(1)**, 273-286.
- [14] **Tura, D., Gigliotti, C., Pedo, S., Failla, O., Bassi, D. and Serraiocco, A.,** 2007. Influence of Cultivar and Site of Cultivation on Levels of Lipophilic and Hydrophilic Antioxidants in Virgin Olive Oils (*Olea Europea L.*) and Correlations with Oxidative Stability, *Scientia Horticulturae*, **112(1)**, 108-119.
- [15] **Terral, J. F. and Durand, A.,** 2006. Bio-archaeological Evidence of Olive Tree (*Olea europaea L.*) Irrigation During the Middle Ages in Southern France and North Eastern Spain, *Journal of Archaeological Science*, **33(5)**, 718-724.
- [16] **Jimenez, M. S, Velarte V. and Castillo, J. R.,** 2007. Direct Determination of Phenolic Compounds and Phospholipids in Virgin Olive Oil by Micellar Liquid Chromatography, *Food Chemistry*, **100(1)**, 8-14.
- [17] **Çavuşoğlu, R. ve Varlı, R.,** 2006. Küresel Zeytinyağı Pazarlamasında Yeni Bir Model, Sanal Fuarçılık, *Dünya Gıda Dergisi*, **4**, 76-81.
- [18] **Grattan, S. R., Berenguer, M. J., Connell, J. H., Polito, V. S. and Vossen, P. M.,** 2006. Olive Oil Production as Influenced by Different Quantities of Applied Water, *Agricultural Water Management*, **85(1-2)**, 133-140.
- [19] **Yang, D. P., Kong, D. X. and Zhang, D. Y.,** 2007. Multiple Pharmacological Effects of Olive Oil Phenols, *Food Chemistry*, Article in Press.
- [20] **Tiryaki, G. Y.,** 2006. Geleneksel Akdeniz Beslenme Modelinde Zeytinyağı Polar-Fenolik Bileşenleri ve Sağlık Açısından Önemi, *Dünya Gıda Dergisi*, **8**, 66-69.
- [21] **Covas, M. I.,** 2007. Olive Oil and the Cardiovascular System, *Pharmacological Research*, **55(3)**, 175-186.
- [22] **Karantonis, H. C., Antonopoulou, S., Perrea, D. N., Sokolis, D. P., Theocharis, S. E., Kavantzaz, N., Iliopoulos, D. G. and Demopoulos, C. A.,** 2006. In Vivo Antiatherogenic Properties of Olive Oil and Its Constituent Lipid Classes in Hyperlipidemic Rabbits, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **16(3)**, 174-185.

- [23] **Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B. and Barthsch, H.,** 2000. Olive-oil Consumption and Health: the Possible Role of Antioxidants, *The Lancet Oncology*, **1(2)**, 107-112.
- [24] **Çelik, S. ve Demirel, M.,** 2004. İnsan ve Hayvan Sağlığı Bakımından Omega Yağ Asitleri ve Konjuge Linoleik Asitin Önemi, *Y. Y. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, **1**, 25-35.
- [25] **Turuni, M. E. and Martin, J. C.,** 2001. Sources, Functions and Analysis of Conjugated Linoleic Acid and Its Metabolites, in *Structured and Modified Lipids*, pp.251-278, Ed. Gustano F. D., Marcel Dekker Inc., New York.
- [26] **Corino, C., Fiego, D. P. L., Macchioni, P., Pastorelli, G., Giancamillo, A. D., Domeneghini, C. and Rossi, R.,** 2007. Influence of Dietary Conjugated Linoleic Acids and Vitamin E on Meat Quality and Adipose Tissue in Rabbits, *Meat Science*, **76(1)**, 19-28.
- [27] **Noli, C., Carta, G., Cordeddu, L., Melis, M. P., Murru, E. and Bani, S.,** 2007. Conjugated Linoleic Acid and Black Currant Seed Oil in the Treatment of Canine Atopic Dermatitis: A Preliminary Report, *The Veterinary Journal*, **173(2)**, 413-421.
- [28] **Watkins, B. A. and Li, Y.,** 2002. Conjugated Linoleic Acids: Nutrition and Biology, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biology*, pp.637-654, Ed. Akoh, C. C. and Min, D. B., Marcel Dekker Inc, New York.
- [29] **Luna, P., Juárez, M. and Fuente, M. A.,** 2006. Conjugated Linoleic Acid Content and Isomer Distribution During Ripening in Three Varieties of Cheeses Protected with Designation of Origin, *Food Chemistry*, Article in Press.
- [30] **Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechsler, D. and Ryhänen, E. L.,** 2006. Conjugated Linoleic Acids in Milk Fat: Variation and Physiological Effects, *International Dairy Journal*, **16(11)**, 1347-1361.
- [31] **Adlof, R. O.,** 2003. Application of Silver-Ion Chromatography to the Separation of Conjugated Linoleic Acid Isomers, in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, pp. 37-51, Ed. Sebedio, J. L., Christie, W. W. and Adlof, R., AOCS Press, America.

- [32] **Bakır, N.**, 2005. Fındık Yağının Enzimatik Olarak Konjuge Linoleik Asit ile Zenginleştirilmesi ve Fonksiyonel (Yapılandırılmış) Yağ Eldesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [33] **Christie, W. W.**, 2003. Analysis of Conjugated Linoleic Acid: An Overview, in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, pp. 1-30, Ed. Sebedio, J. L., Christie, W. W. and Adlof, R., AOCS Press, America.
- [34] **Ercoşkun, H., Uğuz, Ş. ve Kıralan, M.**, 2005. Konjuge Linoleik Asit, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **19**, 42-45.
- [35] **Parodi, P. W.**, 2003. Conjugated Linoleic Acid in Food, in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, pp. 101-117, Ed. Sebedio, J. L., Christie, W. W. and Adlof, R., AOCS Press, America.
- [36] **Tokuşoğlu, Ö., Akalın, S. ve Gönç, S.**, 2003. Kapiler Gaz Kromatografik Yöntemle Peynirlerde Konjuge Linoleik Miktarlarının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma, *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu*, İzmir, 22-23 Mayıs, 303-309.
- [37] **Lin, H., Boylston, T. D., Luedecke, L. O. and Shultz, T. D.**, 1998. Factor Effecting the Conjugated Linoleic Acid Content of Cheddar Cheese, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46(3)**, 801-807.
- [38] **Akalın, A. S., Tokuşoğlu, Ö., Gönç, S. and Aycan, Ş.**, 2003. Occurrence of Conjugated Linoleic Acid in Probiotic Yoghurts Fortificated Fructooligosaccharide (FOS), *2003 IFT Annual Meeting+Food Expo*, McCormick Place, South Chicago, IL, USA, July 12-16.
- [39] **Zlatanov, S., Laskaridis, K., Feist, C. and Sagredos, A.**, 2002. CLA Content and Fatty Acid Composition of Grek Feta and Hard Cheeses, *Food Chemistry*, **78**, 471-477.
- [40] **Wang, M. L., Lv, J. P., Chu, Z. Q., Cui, Y. Y. and Ren, X. H.**, 2007. Production of Conjugated Linoleic Acid by *Propionibacterium freudenreichii*, *Food Chemistry*, **103(2)**, 313-318.
- [41] **Willet, J.**, 1987. *Gas Chromatography*, pp.1-5, Acol, London.
- [42] **Fuente, M. A., Luna, P. and Juárez, M.**, 2006. Chromatographic Techniques to Determine Conjugated Linoleic Acid Isomers, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **25(9)**, 917-926.
- [43] **Kung, F. C. and Yang, M. C.**, 2006. Effect of Conjugated Linoleic Acid Immobilization on the Hemocompatibility of Cellulose Acetate Membrane, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **47(1)**, 36-42.

- [44] **Watkins, B. A. and Li, Y.,** 2003. CLA in Functional Food: Enrichment of Animal Products, in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, pp. 174-184, Ed. Sebedio, J. L., Christie, W. W. and Adlof, R., AOCS Press, America.
- [45] **Kim, J. H., Hubbard, N. E., Ziboh, V. and Erickson, K. L.,** 2005. Attenuation of Breast Tumor Cell Growth by Conjugated Linoleic Acid via Inhibition of 5-Lipoxygenase Activating Protein, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1736(3)**, 244-250.
- [46] **Beppu, F., Hosokawa, M., Tanaka, L., Kohno, H., Tanaka, T. and Miyashita, K.,** 2006. Potent Inhibitory Effect of trans9, trans11 Isomer of Conjugated Linoleic Acid on the Growth of Human Colon Cancer Cells, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **17(12)**, 830-836.
- [47] **Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J. and Fernandes, G.,** 2006. Biological Effects of Conjugated Linoleic Acids in Health and Disease, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **17(12)**, 789-810.
- [48] **Banni, S., Heys, S. D. and Wahle, K. W. J.,** 2003. Conjugated Linoleic Acids as Anticancer Nutrients: Studies in Vivo and Cellular Mechanisms, in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, pp. 267-278, Ed. Sebedio, J. L., Christie, W. W. and Adlof, R., AOCS Press, America.
- [49] **Cook, M. E., Butz, D., Li, G., Pariza, M. and Whigham, L.,** 2003. Conjugated Linoleic Acid Enhances Immune Responses but Protects Against the Collateral Damage of Immune Events, in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, pp. 283-289, Ed. Sebedio, J. L., Christie, W. W. and Adlof, R., AOCS Press, America.
- [50] **Cook, M. E., Miller, C. C., Park, Y., Pariza, M. W.,** 1993. Immune Modulation by Altered Nutrient Metabolism: Nutritional Control of Immune-induced Growth Depression, *Poultry Science*, **72**, 1301-1305.
- [51] **Miller, C. C., Park, Y., Pariza, M. W., Cook, M. E.,** 1994. Feeding Conjugated Linoleic Acid to Animals Partially Overcomes Catabolic Response Due to Entoxin Injection, *Biochem. Res. Comm.*, **198**, 1107-1112.
- [52] **Choi, J. S. and Song, J.,** 2005. Conjugated Linoleic Acid, Obesity, and Insulin Resistance: Waiting for the Day of Liberation from Chronic Disease, *Nutrition*, **21(11-12)**, 1170-1172.

- [53] **Keim, N. L.**, 2003. Conjugated Linoleic Acid and Body Composition, in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, pp. 316-322, Ed. Sebedio, J. L., Christie, W. W. and Adlof, R., AOCS Press, America.
- [54] **Kayahan, M.**, 2002. Yağ Tüketimi ve Sağlık, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **12**,39-47.
- [55] **Yemişçioğlu, F. ve Gümüşkesen, A. S.**, 2006. Enzimatik İnteresterifikasyon İşleminin Yağın Bazı Özellikleri Üzerine Etkisi, *Dünya Gıda Dergisi*, **8**, 62-65.
- [56] **Iwasaki, Y. and Yamane, T.**, 2000. Enzymatic Synthesis of Structured Lipids, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **10**, 129-140.
- [57] **Willis, W. M. and Marangoni, A. G.**, 2002. Enzymatic Interesterification, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biology*, pp.839-875, Ed. Akoh, C. C. and Min, D. B., Marcel Dekker Inc, New York.
- [58] **Yang, T., Fruekilde, M. B. and Xu, X.**, 2005. Suppression of Acyl Migration in Enzymatic Production of Structured Lipids Through Temperature Programming, *Food Chemistry*, **92(1)**, 101-107.
- [59] **Gültekin, M. ve Karaali, A.**, 2006. Yemeklik Yağ Sanayinde Yenilikler, *Gıda Teknolojisi Dergisi*, **10**, 46-48.
- [60] **Akoh, C. C.**, 2002. Structured Lipids, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biology*, pp.877-901, Ed. Akoh, C. C. and Min, D. B., Marcel Dekker Inc, New York.
- [61] **Gunstone, F. D.**, 2001. Why are Structured Lipids and New Lipid Sources Required?, in *Structured and Modified Lipids*, pp.1-9, Ed. Gustano F. D., Marcel Dekker Inc., New York.
- [62] **Bell, S. J. and Bistran, B. R.**, 1998. Structured Triglycerides and Their Medical Applications, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, pp. 189-194, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, America.
- [63] **Kayahan, M.**, 2001. Yağ Tüketimi ve Sağlık 1, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **9**, 11-16.
- [64] **Mu, H. and Porsgaard, T.**, 2005. The Metabolism of Structured Triacylglycerols, *Progress in Lipid Research*, **44(6)**, 430-448.

- [65] **Greyt, W. D. and Huyghebaert, A.**, 1998. Chemical and Pyhsicochemical Modification of Lipids, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, pp. 1-17, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, America.
- [66] **Gunstone, F. D.**, 2001. Procedures Used for Lipid Modification, in *Structured and Modified Lipids*, pp.11-32, Ed. Gustano F. D., Marcel Dekker Inc., New York.
- [67] **Demirci, F.**, 2005. Trioleinin Enzimatik Asidolizi ile Düşük Kalorili Yapılandırılmış Lipidlerin Üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [68] **Camp, J. V., Huyghebaert, A. and Goeman, P.**, 1998. Enzymatic Synthesis of Structured Modified Fats, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, pp. 20-42, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, America.
- [69] **Balcao, V. M., Kemppinen, A., Malcata, F. X. and Kalo, P. J.**, 1998. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Butterfat with Oleic Acid: Characterization of Process and Product, *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 118-128.
- [70] **Lai, O. M., Low, C. T. and Akoh, C. C.**, 2005. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Palm Olein and Caprylic Acid in a Continuous Bench-Scale Packed Bed Bioreactor, *Food Chemistry*, **92**, 527-533.
- [71] **Lee, K. T. and Akoh, C. C.**, 1998. Structured Lipids: Synthesis and Application, *Food Res. Inter.*, **14**, 17-34.
- [72] **Öztürk, B.**, 2002. Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **12**, 20-38.
- [73] **Hey, C. E. and Xu, X.**, 2001. Structured Triacylglycerols, in *Structured and Modified Lipids*, pp.209-234, Ed. Gustano F. D., Marcel Dekker Inc., New York.
- [74] **Akoh, C. C., Lee, K. T. and Fomuso, L. B.**, 1998. Synthesis of Positional Isomers of Structured Lipids with Lipases as Biocatalysts, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, pp. 46-65, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, America.

- [75] **Gümüşkesen A. S. ve Yemişçiöğlu, F.**, 2000. Katı ve Sıvı Yağların Enzimatik İnteresterifikasyonu, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **6**, 7-10.
- [76] **Ortega, J., Lopez-Hernandez, A., Garcia, H. S. and Hill, C. G.**, 2004. Lipase-Mediated Acidolysis of Fully Hydrogenerated Soybean Oil with Conjugated Linoleic Acid, *Journal of Food Science*, **69(1)**, E1-E6.
- [77] **Martinez, C. E., Vinay, J. C., Brieva, R., Hill, C. G. and Garcia, H. S.**, 1999. Lipase-Catalyzed Interesterification (Acidolysis) of Corn Oil and Conjugated Linoleic Acid in Organic Solvents, *Food Biotechnology*, **13(2)**, 183-193.
- [78] **Torres, C. F., Barrios, E. and Hill, C. G.**, 2002. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Menhaden Oil with CLA: Optimization by Factorial Design, *Journal of The American Oil Chemists Society*, **79(5)**, 457-466.
- [79] **Martinez, C. E., Vinay, J. C., Brieva, R., Hill, C. G. and Garcia, H. S.**, 2003. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Corn Oil with Conjugated Linoleic Acid in Hexane, *Journal of Food Lipids*, **10(1)**, 11-24.
- [80] **Torres, C. F. and Hill, C. G.**, 2001. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Corn Oil with Conjugated Linoleic Acid: Effect of Water Content, *Wiley Periodicals, Inc., Biotechnology Bioengineering*, **78**, 509-516.
- [81] **Uribe, A. R. and Hernandez, E.**, 2004. Solvent-free Enzymatic Synthesis of Structured Lipids Containing CLA from Cocount Oil and Tricaprylin, *Journal of the American Oil Chemists Society*, **81(7)**, 685-689.
- [82] **Martinez, C. E., Vinay, J. C., Brieva, R., Hill, C. G. and Garcia, H. S.**, 2005. Preparation of mono- and diacylglycerols by Enzymatic Esterification of Glycerol with Conjugated Linoleic Acid in Hexane, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **125(1)**, 63-75.
- [83] **Torres, C. F., Munir, F., Lessard, L. P. and Hill, C. G.**, 2002. Lipase-Mediated Acidolysis of Tristearin with CLA in a Packed-bed Reactor: A Kinetic Study, *Journal of the American Oil Chemists Society*, **79(7)**, 655-661.
- [84] **Torres, C. F., Lin, B., Lessard, L. P., Charles, G. and Hill, J.**, 2005. Lipase-Mediated Transesterification of Menhaden Oil with the Ethyl Ester of Conjugated Linoleic Acid: Multi Response Kinetics, *Biochemical Engineering Journal*, **23**, 107-116.

- [85] **Garcia, H. S., Arcos J. A., Keough K. J., Charles, G. and Hill, J.,** 2001. Immobilized Lipase-Mediated Acidolysis of Butteroil with Conjugated Linoleic Acid: Batch Reactor and Packed Bed Reactor Studies, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **11**, 623-632.
- [86] **Garcia, H. S., Arcos J. A., Ward, D. J. Charles, G. and Hill, J.,** 2000. Synthesis of Glycerides Containing n-3 Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acid by Solvent-free Acidolysis of Fish Oil, *Biotechnology Bioengineering*, **70(5)**, 587-591.
- [87] **Lee, J. H., Shin, J. A., Lee, J. H. and Lee, K. T.,** 2004. Production of Lipase Catalyzed Structured Lipids from Saffloweroil with Conjugated Linoleic Acid and Oxidation Studies with Rosemary Extracts, *Food Research International*, **37**, 967-974.
- [88] **Sehanputri, P. M., Charles, G. and Hill, J.,** 2003. Lipase-Mediated Acidolysis of Butteroil with Free Conjugated Linoleic Acid in a Packed Bed Reactor, *Biotechnology Bioengineering*, **83(5)**, 608-617.
- [89] **Villeneuve, P., Barouh, N., Barea, B., Piombo, G., Turon, F., Pina, M. and Lago, R.,** 2007. Chemoenzymatic Synthesis of Structured Triacylglycerols with Conjugated Linoleic Acids (CLA) in Central Position, *Food Chemistry*, **100**, 1443-1452.
- [90] **Kim, I. H., Yoon, C. S. and Lee, K. W.,** 2001. Transesterification of Conjugated Linoleic Acid and Tricaprylin by Lipases in Organic Solvents, *Food Research International*, **34**, 301-306.
- [91] **Baykar, P.,** 2006. Çörekotu Yağından Konjuge Linoleik Asit (KLA) ile Modifiye Lipid Üretimi, *Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Kimya Metalurji Fakültesi, İstanbul.
- [92] **Kızılkurt, K.,** 2007. Kanola Yağından Konjuge Linoleik Asit (KLA) ile Yapılandırılmış Yağ Üretimi, *Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Kimya Metalurji Fakültesi, İstanbul.
- [93] **Demiröz, E.,** 2007. Kanola Yağı Esaslı Yapılandırılmış Yağ Üretimi, *Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Kimya Metalurji Fakültesi, İstanbul.
- [94] **Cossigani, L., Simonetti, M. S. and Damiani, P.,** 2005. Biocatalyzed Acidolysis of Olive Oil Triacylglycerols with 9c, 11t and 10t, 12c Isomers of Conjugated Linoleic Acid, *Eur. Food Research Technology*, **220**, 267-271.

- [95] **Myers, R. H. and Montgomery, D. C.**, 2002. *Response Surface Methodolgy Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley & Sons; Inc. New York.
- [96] **Neter, J., Wassermann, W. and Whitmore, G. A. ,** 1999. *Applied Statistics*, Allyn and Bacon, New York.
- [97] **Bektaş, İ.**, 2006. Tripalmitinin Kaprik Asit ile Enzimatik Asidolizi: Tepki Yüzey Metodolojisi ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [98] **Sambucini, V.**, 2007. A Reference Prior for the Analysis of a Response Surface, *Journal of Statistical Planning and Inference*, **137(4)**, 1119-1128.
- [99] **Dağlı, R.**, 2005. Tripalmitinin Enzimatik Asidoliziyle Düşük Kalorili Yapılandırılmış Lipidlerin Üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [100] **Cornell, J. A.**, 1990. *How to Apply Response Surface Methodology*, Quality Press, Wisconsin, USA.
- [101] **Collins, C. A. and Seeney, F. M.**, 1999. *Statistical Experiment Design and Interpretation: an Introduction with Agricultural Examples*, Wiley, Chichester.
- [102] **Vuchkov, I. N. and Boyadjieva, L. N.**, 2001. *Quality Improvement with Design of Experiments: a Response Surface Approach*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İstanbul’da doğdu. 2001 yılında Kabataş Erkek Lisesi’nden mezun oldu. 2001 yılında Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümünde lisans eğitimine başladı. 2005 yılında lisans eğitimini tamamlayarak İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümünde yüksek lisans eğitimine başladı.