

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HAM PAMUK YAĞINDAN ENZİMATİK YÖNTEMLE
FOSFOLİPİDLERİN GİDERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seval KARAHASAN

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

OCAK 2012

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HAM PAMUK YAĞINDAN ENZİMATİK YÖNTEMLE
FOSFOLİPİDLERİN GİDERİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Seval KARAHASAN
(506091057)**

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Melek TÜTER

OCAK 2012

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506091057 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Seval KARAHASAN**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “**HAM PAMUK YAĞINDAN ENZİMATİK YÖNTEMLE FOSFOLİPİDLERİN GİDERİLMESİ**” başlıklı tezini, aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı: **Prof. Dr. Melek TÜTER**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Filiz KARAOSMANOĞLU**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Sevil YÜCEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : **19 Aralık 2011**
Savunma Tarihi : **25 Ocak 2012**

ÖNSÖZ

Öncelikle bana bu projede çalışma imkânı verdiği için ve tez çalışmalarım süresince her türlü yardım ve desteklerinden ötürü tez danışmanım Prof. Dr. Melek TÜTER'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince yardım ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN'e ve Prof. Dr. H. Ayşe AKSOY'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında laboratuvarlarındaki imkânlardan yararlanmama olanak verdikleri için Prof. Dr. A. Nusret BULUTÇU'ya ve Prof. Dr. Hale GÜRBÜZ'e teşekkür ederim.

Aylarca süren çalışmalarımız boyunca her anımızı paylaştığımız, her konuda yardımlarını ve dostluğunu esirgemeyen sevgili arkadaşım Göknur TÜRETKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimimi BİDEB 2210 Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı tarafından verilen burs ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü destekleriyle bana güç veren aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2011

Seval KARAHASAN
(Kimya Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
KISALTMALAR	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. TEORİK ÇALIŞMA.....	3
2.1 Yağlar ve Genel Özellikleri.....	3
2.1.1 Pamuk bitkisi ve pamuk çekirdeği.....	6
2.1.2 Pamuk yağı ve bileşimi.....	8
2.1.3 Pamuk yağının Türkiye'deki ve dünyadaki durumu.....	10
2.1.4 Pamuk yağının kullanım alanları	13
2.2 Bitkisel Yağ Rafinasyonu.....	14
2.2.1 Kimyasal rafinasyon	16
2.2.2 Fiziksel rafinasyon	17
2.3 Yapışkan Maddelerin Giderilmesi.....	18
2.3.1 Hidratasyon yöntemiyle yapışkan maddelerin giderilmesi.....	21
2.3.2 Asidik yöntemle yapışkan maddelerin giderilmesi.....	22
2.3.3 Enzimatik yöntemle yapışkan maddelerin giderilmesi.....	23
2.3.3.1 Literatürde enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi üzerine yapılmış çalışmalar	28
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	33
3.1 Kullanılan Malzemeler	33
3.2 Kullanılan Yöntemler	33
3.2.1 Pamuk yağının yağ asidi bileşiminin belirlenmesi	33
3.2.2 Ham pamuk yağından fosfolipidlerin giderilmesi	34
3.2.2.1 Asidik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi	34
3.2.2.2 Enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi.....	35
3.2.2.3 EnzyMax® yöntemi ile fosfolipidlerin giderilmesi	36
3.2.3 Pamuk yağının fosfor içeriğinin belirlenmesi.....	37
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	39
4.1 Ham Pamuk Yağının Karakterizasyonu	39
4.2 Asidik Yöntemle Ham Pamuk Yağından Fosfolipidlerin Giderilmesi	39
4.3 Enzimatik Yöntem ile Ham Pamuk Yağından Fosfolipidlerin Giderilmesi.....	40
4.4 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine Karıştırma Hızının Etkisi	41
4.5 Ham Pamuk Yağından Fosfolipidlerin Giderilmesinde Kullanılacak Uygun Enzimatik Yöntemin Belirlenmesi	42

4.6 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine Enzim Miktarının Etkisi	44
4.7 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine Su Miktarının Etkisi	45
4.8 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine Asit Miktarının Etkisi	46
4.9 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine Sıcaklığın Etkisi	48
4.10 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine pH'ın Etkisi	49
5. VARGILAR VE ÖNERİLER	51
KAYNAKLAR.....	53
EKLER.....	57
ÖZGEÇMİŞ	63

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1	: Pamuk çekirdeğinin kompozisyonu	7
Çizelge 2.2	: Pamuk çekirdeğinin mineral ve vitamin içeriği.....	7
Çizelge 2.3	: Pamuk yağının yağ asidi ve triaçilgliserol bileşimi.....	9
Çizelge 2.4	: Pamuk yağının bazı karakteristik özellikleri	9
Çizelge 2.5	: Dünya yağlı tohum üretimi.....	11
Çizelge 2.6	: Dünya bitkisel ham yağ üretimi	11
Çizelge 2.7	: Dünya pamuk ekim alanları.....	11
Çizelge 2.8	: Türkiye yağlı tohumlar üretimi	12
Çizelge 2.9	: Rafinasyon basamakları ve yağdan ayrılan maddeler	15
Çizelge 2.10	: Bazı ham yağların fosfolipid içerikleri	19
Çizelge 3.1	: Gaz kromatografisi analiz koşulları.....	34
Çizelge 4.1	: Ham pamuk yağının yağ asidi bileşimi	39
Çizelge 4.2	: Ham pamuk yağından asidik yöntemle fosfolipid giderilmesinde, yağın fosfor içeriğinin zamana göre değişimi	40
Çizelge 4.3	: Ham pamuk yağından enzimatik yöntemle fosfolipid giderilmesinde yağın fosfor içeriğinin zamana göre değişimi	40
Çizelge 4.4	: Ham pamuk yağından enzimatik yöntemle fosfolipid giderilmesine karıştırma hızının etkisi	42
Çizelge 4.5	: Farklı enzimatik yöntemler sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi	43
Çizelge 4.6	: Farklı enzim miktarlarında gerçekleştirilen enzimatik yöntem sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi	44
Çizelge 4.7	: Farklı su miktarlarında gerçekleştirilen enzimatik yöntem sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi	45
Çizelge 4.8	: Farklı asit miktarlarında gerçekleştirilen enzimatik yöntem sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi	47
Çizelge 4.9	: Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen enzimatik yöntem sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi	48
Çizelge 4.10	: Farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen enzimatik yöntem sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi	49

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Triaçilgliserol oluşum reaksiyonu	3
Şekil 2.2 : Pamuk bitkisi	6
Şekil 2.3 : Pamuk tohumu ve iç çekirdeği.....	7
Şekil 2.4 : 2010 yılı Türkiye bitkisel ham yağ üretimi	13
Şekil 2.5 : Türkiye sıvı yağ tüketimi.....	13
Şekil 2.6 : Kimyasal ve fiziksel rafinasyon basamakları	15
Şekil 2.7 : Fosfolipidin genel kimyasal yapısı ve bazı önemli fosfolipidler.....	20
Şekil 2.8 : Hidratasyon yöntemi ile yapışkan maddelerin yağdan giderilmesi	21
Şekil 2.9 : Asidik yöntem ile yapışkan maddelerin yağdan giderilmesi	23
Şekil 2.10 : EnzyMax yöntemi ile yapışkan maddeleri yağdan giderme prosesi.....	24
Şekil 2.11 : Fosfolipazların çalışma mekanizması	26
Şekil 2.12 : Fosfolipidin enzimatik hidrolizi	26
Şekil 3.1 : Asidik yöntemle fosfolipid gideriminin akım şeması.....	34
Şekil 3.2 : Enzimatik yöntemle fosfolipid gideriminin akım şeması	35
Şekil 3.3 : EnzyMax® yöntemi ile fosfolipid giderimi akım şeması.....	36
Şekil 3.4 : Yağların fosfor içeriğini belirlemek için kullanılan kalibrasyon eğrisi..	38
Şekil 4.1 : Ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesinde kullanılan asidik ve enzimatik yöntemlerin zamana bağlı olarak fosfor içeriklerini karşılaştırılması.....	41
Şekil 4.2 : Farklı enzimatik yöntemlerle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi.....	43
Şekil 4.3 : Farklı enzim miktarlarına göre ham pamuk yağının fosfor içeriğinin değişimi.....	45
Şekil 4.4 : Farklı su miktarlarına göre ham pamuk yağının fosfor içeriğinin değişimi.....	46
Şekil 4.5 : Farklı asit miktarlarına göre ham pamuk yağının fosfor içeriğinin değişimi.....	47
Şekil 4.6 : Farklı sıcaklık değerlerine göre ham pamuk yağının fosfor içeriğinin değişimi.....	49
Şekil A.1 : Farklı karıştırma hızlarında enzimatik yöntemle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi	58
Şekil A.2 : Farklı enzim miktarlarında, enzimatik yöntemle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi	58
Şekil A.3 : Farklı su miktarlarında, enzimatik yöntemle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi	59
Şekil A.4 : Farklı asit miktarlarında, enzimatik yöntemle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi	59
Şekil A.5 : Farklı sıcaklık değerlerinde, enzimatik yöntemle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi.....	60

Şekil A.6 : Farklı pH değerlerinde, enzimatik yöntemle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi	60
Şekil A.7 : Farklı pH değerlerine göre ham pamuk yağının fosfor içeriğinin değişimi.....	61

KISALTMALAR

TAG	: Triaçilgliserol
HP	: Hidrate olabilen fosfolipidler
NHP	: Hidrate olamayan fosfolipidler
PA	: Fosfatidik asit
PC	: Fosfatidil kolin
PE	: Fosfatidil etanolamin
PI	: Fosfatidil inositol
PS	: Fosfatidil serin
PL	: Fosfolipaz
PLA1	: Fosfolipaz A1
PLA2	: Fosfolipaz A2
PLB	: Fosfolipaz B
PLC	: Fosfolipaz C
LAT	: Lipid açil transferaz
AOCS	: American Oil Chemistry' Society

HAM PAMUK YAĞINDAN ENZİMATİK YÖNTEMLE FOSFOLİPİDLERİN GİDERİLMESİ

ÖZET

Presleme ve çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen ham yağlar, yapışkan madde (gum) olarak bilinen fosfolipidleri, reçineleri, iz metalleri içerirler. Kimyasal ve fiziksel rafinasyonun ilk kademesini oluşturan yapışkan maddelerin giderilmesi (degumming) işlemi, çeşitli yöntemlerle yağdan bu maddelerin uzaklaştırılmasıdır. Emülgatör yapıdaki fosfolipidlerin uzaklaştırılmasıyla, asitlik giderme aşamasında yağ kaybı önlenir ve atık su miktarı düşer. Ayrıca iz metaller ile oksidatif reaksiyonların oluşması ve yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen koku giderme aşamasında yağ renginin koyulaşması önlenir. Başarılı bir fiziksel rafinasyon için, ham yağın fosfor içeriğinin 10 ppm'in altına düşmesi gereklidir. Sanayide oldukça yaygın olarak uygulanan hidrasyon ve asidik çözeltilerle muamele şeklinde uygulanan yöntemlerle düşük fosfolipid içeren yağlardaki fosfor miktarı istenen seviyeye düşürülebilmektedir. Ancak son yıllarda fosfolipid miktarı çok yüksek olan kolza, pirinç kepeği, soya gibi yağlardan fiziksel yöntemle fosfolipid giderilmesinde enzimatik yöntemler üzerine çalışmalar hız kazanmıştır. Bu amaçla geliştirilen yöntemde, fosfolipidlerin fosfolipaz enzimi yardımıyla suda çözünebilir fosfolipidler haline getirilip, santrifüj ile yağdan uzaklaştırılması amaçlanmaktadır. Bu yöntem daha az atık su ve daha az yağ kaybına neden olduğundan daha ekonomik yöntem olarak önerilmektedir.

Bu çalışmada, %1-2,5 gibi yüksek miktarda fosfolipid içeren ham pamuk yağındaki fosfolipidlerin *Thermomyces lanuginosus/Fusarium oxysporum*'den elde edilmiş Lecitase® Ultra A1 enzimi yardımıyla uzaklaştırılmasında, karıştırma hızının, enzim, su ve asit miktarlarının, sıcaklığın ve pH'ın etkisi incelenmiş ve uygun koşullar belirlenmiştir.

Fosfor içeriği başlangıçta 845,6 ppm olan ham pamuk yağından fosfolipidlerin uzaklaştırılması amacıyla; asidik, tüm reaktanların aynı çalışma sıcaklığında ortama ilave edildiği enzimatik ve EnzyMax® yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmada önce asidik ve enzimatik yöntemle fosfolipid giderilmesi karşılaştırılmış ve enzimatik yöntemle fosfolipid giderilmesi yönteminin daha etkin olduğu görülmüştür. 3 saatlik fosfolipid giderilmesi işleminde asidik yöntemle elde edilen ürünün fosfor içeriği 357,4 ppm iken enzimatik yöntemle bu değer 149,9 ppm olarak bulunmuştur.

Enzimatik yöntemle fosfolipid giderilmesi üzerine karıştırma hızının etkisi incelenmiş ve en uygun karıştırma hızının 1400 rpm olduğu belirlenmiştir. 500 rpm ve 1400 rpm karıştırma hızlarında gerçekleştirilen deneylerde, 3 saat sonunda alınan yağ örneklerinin fosfor içerikleri sırasıyla 149,9 ppm ve 128,2 ppm olarak belirlenmiştir.

Tüm reaktanların aynı çalışma sıcaklığında ortama ilave edildiği enzimatik ve EnzyMax® yöntemlerini karşılaştırmak amacı ile 1400 rpm karıştırma hızında ve 2 mL enzim miktarı ile deneyler gerçekleştirilmiştir. 3 saat sonunda elde edilen

yağların fosfor içerikleri 89 ppm olarak bulunmuştur. Hem uygulama kolaylığı hem de ekonomik olması açısından tüm reaktanların aynı çalışma sıcaklığında ham yağa ilave edildiği yöntem olan enzimatik yöntem en uygun yöntem olarak seçilmiştir. En düşük fosfor içeriği 8,1 ppm olarak, 75 gram pamuk yağı için, 8 mL enzim, 6 mL su, 0,9 mL sitrik asit miktarlarında, 50°C’de ve pH 5,5’te, 2 saat süreyle yürütülen çalışmada elde edilmiştir.

REMOVAL OF PHOSPHOLIPIDS FROM CRUDE COTTONSEED OIL BY ENZYMATIC METHOD

SUMMARY

Crude oils obtained by pressing and solvent extraction contain a number of impurities such as free fatty acids, mono and di-acylglycerols, phospholipids, resins, trace metals, tocopherols, sterols, hydrocarbons, ketones, pigments, odors and other minor compounds. Most of these have unfavorable effects on the flavor, odor, appearance and shelf life of the oil. The purpose of vegetable oil refining is to remove undesirable impurities with the least possible damage to the triacylglycerols, natural antioxidants and vitamins.

In industrial practice, there are two major alternative processing methods known as chemical and physical refining. In chemical refining, almost all free fatty acids, most of the phospholipids and other impurities are removed during neutralization by treatment with an alkali solution such as sodium hydroxide, potassium hydroxide, sodium bicarbonate. The oil is subsequently bleached and deodorized. The physical refining generally consists of a degumming step followed by bleaching and steam stripping for the purpose of fatty acids and deodorization. Chemical refining of vegetable oils is an important method and generally practiced in the oil refining process. However, the physical refining has advantage such as higher oil yield, reduction of chemicals and water, considerable reduction in the environmental impact.

In the degumming step which is the first step of both chemical and physical refining, phospholipids, trace metals, resins known as gums are removed from the oil. The removal of phospholipids is essential for several reasons. Phospholipids are excellent emulsifiers and therefore increase refining losses. Also, they are connected to trace metals, which cause to reduce oxidative stability of oil and they can cause color inversion and fixation in deodorized oils. Depending on their structure, some phospholipids are soluble in the water, while others are insoluble in the water. In the water degumming, only hydratable phospholipids can be removed by water phase after centrifugation. In acid degumming, nonhydratable phospholipids which are converted to hydratable types with acid are removed. Oils degumming process plays a critical role in the physical refining of edible oil. A prerequisite for the successful process of physical refining is to reduce the phosphorus content to less than 10 ppm. Degumming processes like as water degumming and acid degumming for some oils that have high quantities of nonhydratable phospholipids cannot always achieve the low phosphorus contents for physical refining. Super degumming, total degumming and ultrafiltration process designed for physical refining are rarely used in oil plants because of their unreliability and operation costs.

Enzymatic oil degumming is a suitable process for reducing the phosphorus content of vegetable oils below 10 ppm for physical refining. It was first introduced in the 1990s by the German Lurgi and Röhm companies as the “EnzyMax® Process”. In

this process, a phospholipase is used to convert the nonhydratable phospholipids into their hydratable form which were then removed by centrifugation. Compared with the conventional degumming processes, enzymatic degumming has many advantages. In addition to the reduction in the amounts of acid and base used and wastewater generated during the refining process, an enhancement in oil yields and reduction in operation costs can be observed.

Cottonseed oil is obtained from the seeds of the cotton plant. The oil is a by-product of cotton production and as such its availability is dependent upon the supply and demand for the cotton fiber surrounding the oilseed. Its fatty acid profile is typical of the oleic-linoleic group of vegetable oils, since those two acids comprise almost 75% of the total fatty acids. Palmitic acid (21.4-26.4%) is a major saturated fatty acid in cottonseed oil. Crude cottonseed oil contains many kinds of nonglyceride materials which contribute to the strong, characteristic flavor and dark reddish-brown color of the oil such as phospholipids, gossypol, tocopherols, sterols, resins, etc. Crude cottonseed oil contains 1-2.5% phospholipids but the color of the lecithin is too dark for human consumption. Gossypol, one of the most important nonglyceride materials in the cottonseed oil, is a pigment which is toxic and antioxidant. Almost all of these compounds are removed during the refining process. Annual production of cottonseed oil was 5,000,000 tons in the world and 144,000 tons in Turkey in 2010. Cottonseed oil was the 2nd in Turkey ranking after sunflower oil. Almost 100% of cottonseed oil is produced from local seeds. 13.8% of Turkey's 2010 cottonseed oil production was consumed as liquid oil, 17.8% was used in the preparation of margarines, 63.2% was used in the production of soap, paint and feed and 5.5% was exported. Cottonseed oil was the 5th after sunflower, canola, corn and soybean oils in liquid oil consumption of Turkey.

In this study, enzymatic degumming process was applied to remove phospholipids from crude cottonseed oil that contains high level (1-2.5%) phospholipids by using microbial Lecitase® Ultra A1 from *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum*. The effects of important determining factors on the residual phosphorus concentration of cottonseed oil, such as stirring rate, amounts of enzyme, water and acid, temperature and pH were investigated and suitable operating conditions that minimize residual phosphorus were found.

To remove the phospholipids from crude cottonseed oil which's initial phosphorus content was 845.6 ppm, acidic degumming, enzymatic degumming that all reactants were added at reaction temperature and EnzyMax® processes were applied. The reactions were continued for 3 hours and the samples were taken for phosphorus content measurement at certain intervals. Phosphorus contents of crude oil and degummed oils were determined by standard AOCS method Ca 12-55. This method determines phosphorus or the equivalent phosphatide content of oil by ashing the sample in the presence of magnesium oxide, followed by measurement of phosphorus as a blue phosphomolybdic acid complex at 830 nm with spectrophotometer.

In this study firstly, acid degumming and enzymatic degumming process that all reactants were added at reaction temperature were compared. After the acid treatment at 80°C, the phosphorus content in the oil was reduced from 845.6 ppm to 357.3 ppm whereas it was reduced to 149.9 ppm by enzymatic degumming process in 3 hours. Acid degumming process could not achieve low phosphorus content for cottonseed oil. So it was observed that enzymatic degumming was more effective

than acid degumming. Then, the effect of stirring rate on enzymatic degumming process was investigated and suitable stirring rate was found as 1400 rpm. The phosphorus contents of cottonseed oils which are obtained from trials performed in 500 rpm and 1400 rpm were found 149.9 ppm and 128.2 ppm, respectively.

In order to find suitable enzymatic degumming method for cottonseed oil, enzymatic degumming that all reactants were added at reaction temperature and EnzyMax® processes were compared. In Enzymax® process, after pre-acid treatment at 80°C in 20 minutes, the temperature of the oil was reduced to reaction temperature and NaOH for adjusting pH, water and enzyme were added. In the other enzymatic degumming process, enzyme and other reactants were added in the same time at reaction temperature. In both processes by 2 mL of enzyme amount and 1400 rpm of stirring rate, the phosphorus contents of the cottonseed oils were measured as about 89 ppm after 3 hours. Basing on these results, enzymatic process that all reactants were added at reaction temperature was chosen as convenient enzymatic degumming process. Because there was no significant difference between two processes and enzymatic degumming process that all reactants were added at reaction temperature was easier to apply and also more economical than EnzyMax® process.

At the next stage of this study, to reduce the phosphorus content of cottonseed oil to less than 10 ppm, effects of the amounts of enzyme, water and acid, temperature and pH on the enzymatic degumming were investigated. To determine appropriate amount, experiments were carried out by using 6, 8 and 10 mL of enzymes amounts in the conditions which specified by literature (50°C, 1.5 mL water/75 g oil and 0.1 mL citric acid/75 g oil). The residual phosphorus content in the degummed oil decreased with increasing enzyme amount. After 3 hours of reaction, phosphorus levels of cottonseed oils with 8 mL and 10 mL of enzyme amounts, were almost the same, 37.1 ppm and 36.9 ppm, respectively. Therefore 8 mL of enzyme amount was chosen as appropriate enzyme amount. The level of water was chosen as second parameter investigated. To obtain suitable level of water, degumming experiments were carried out by 1.5, 3, 6 and 8 mL of water quantities. Results showed the negative effect of added water on residual phosphorus in the oil. This can be attributed to hydrolase nature of the used enzyme and direct contribution of water in the hydrolysis of phospholipids. When the level of water was increased to 8 mL from 6 mL, the residual phosphorus content in the oil did not significantly change at the end of 3 hours application, so convenient level of water was chosen as 6 mL. To analyze the effect of level of acid on direct enzymatic degumming, the trials were performed with 0.1, 0.3, 0.6 and 0.9 mL of levels of acid. By using 0.9 mL acid, the phosphorus content of cottonseed oil was reduced to 8.7 ppm in 1 hour and 8.1 ppm in 2 hours. Therefore the convenient acid amount was chosen as 0.9 mL. To observe the effect of temperature on the enzymatic degumming process, the trials were carried out at temperatures of 30, 50 and 60°C. Whereas the phosphorus content of oil increased at 30°C, it did not significantly change at 60°C, so suitable temperature was chosen as 50°C. This can be related to kinetics of enzyme activity. Lastly, to investigate the effect of pH on enzymatic degumming process, experiments were carried out at different values of pH (4, 4.5 and 5). For adjustment of pH, citric acid quantity was kept constant and NaOH volume was changed. The lowest phosphorus content of cottonseed oil was supplied at pH 5.5 and the suitable pH was chosen as 5.5.

Consequently, for crude cottonseed oil the proper operating conditions that supplied the lowest phosphorus content were found as enzyme amount of 8 mL / 75 g oil, added water of 6 mL / 75 g oil, added acid of 0.9 mL / 75 g oil, temperature of 50°C and pH of 5.5. At these conditions, the phosphorus content of cottonseed oil was reduced to 8.7 ppm in 1 hour and 8.1 ppm in 2 hours from 845.6 ppm by enzymatic degumming process.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Presleme ve çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen ham yağlar; fosfolipidler, serbest yağ asitleri, steroller, hidrokarbonlar, reçineler, renk, tat ve koku maddeleri gibi değişik miktarlarda yağ dışı safsızlıklar içerirler. Yağın kalitesini (tat, koku, görüntü) ve depolanmasını olumsuz etkileyen bu maddelerin uzaklaştırılması için ham yağların rafine edilmesi gereklidir [1,2].

Yağlarda rafinasyon işlemi kimyasal rafinasyon ve fiziksel rafinasyon olmak üzere iki yöntemle yapılabilmektedir. Kimyasal rafinasyonda yapışkan maddelerin giderilmesi, asitlik giderme, renk açma ve koku giderme kademeleri yer alırken; fiziksel rafinasyonun ilk kademesini yapışkan maddelerin giderilmesi, ikinci kademesini ise renk açma işlemi oluşturmakta, son kademedede ise asitlik giderme ve koku giderme işlemleri tek kademedede ve buhar distilasyonu ile gerçekleştirilmektedir [1].

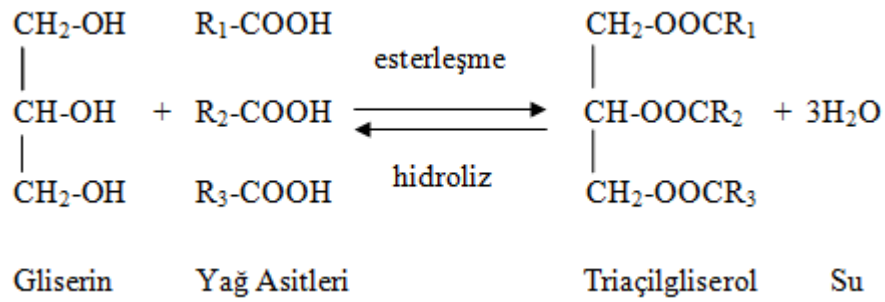
Yapışkan maddelerin giderilmesi aşamasında, yağda %0,05-3,0 miktarlarında bulunan fosfolipidler, reçineler, iz metaller değişik yöntemlerle yağdan uzaklaştırılır. Emülgatör yapıdaki fosfolipidlerin uzaklaştırılmasıyla, asitlik giderme aşamasında yağ kaybı önlenir ve atık su miktarı düşer. Ayrıca iz metaller ile oksidatif reaksiyonların oluşması ve yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen koku giderme aşamasında yağ renginin koyulaşması önlenir. Başarılı bir fiziksel rafinasyon için, ham yağın fosfor içeriğinin 10 ppm'in altına düşmesi istenir. Bu sebeple yapışkan madde giderme aşaması önem taşımaktadır. Sanayide oldukça yaygın olarak uygulanan hidratasyon ve asidik yöntem gibi proseslerin, yüksek fosfolipid içeren yağlar için kullanıldığında yağdaki fosfor miktarını fiziksel rafinasyon için istenen seviyeye düşüremediği görülmüş ve bu amaçla enzim katkılı yöntemler geliştirilmiştir. İlk olarak, 1992 yılında Alman Lurgi ve Röhm şirketleri tarafından "EnzyMax® Process" adıyla geliştirilen bu yöntemde, fosfolipidler fosfolipaz enzimi yardımıyla suda çözünebilen fosfolipidler haline getirilip, santrifüj ile yağdan uzaklaştırılmıştır [1,2,3].

Pamuk yağı, pamuk tohumlarından elde edilen %1-2,5 gibi yüksek miktarda fosfolipid içeren bir yağdır [4]. Bu çalışmada, ham pamuk yağından farklı yöntemlerle fosfolipidlerin uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, asidik ve enzimatik yöntemler karşılaştırılarak en uygun yöntem belirlenmiş ve belirlenen uygun yöntem üzerine etki edebileceği düşünülen karıştırma hızı, enzim, su ve asit miktarları, sıcaklık ve pH gibi parametreler incelenmiştir.

2. TEORİK ÇALIŞMA

2.1 Yağlar ve Genel Özellikleri

Yağlar, suda çözünmeyip birçok organik çözücünde (etil eter, petrol eteri, hekzan, kloroform, karbon sülfür, karbon tetraklorür) çözünen, yüksek viskoziteli, sudan daha düşük yoğunluğa sahip, oda sıcaklığında katı veya sıvı halde bulunabilen maddelerdir. Yağların temel kimyasal bileşeni, üç değerli bir alkol olan gliserin ile farklı uzunluktaki yağ asitlerinin esterleşmesi sonucu oluşan triaçilgliserollerdir (TAG). TAG'lerin oluşum reaksiyonu **Şekil 2.1**'de gösterilmiştir. Yemeklik yağ olarak kullanılan yağların %98-99'u saf triaçilgliserollerden meydana gelmiştir [5].



(R₁, R₂, R₃ = Radikaller, bir yağ asidindeki aktif grup dışında kalan tüm zincirleri gösterir.)

Şekil 2.1 : Triaçilgliserol oluşum reaksiyonu [5].

Bir triaçilgliserolde gliserine bağlı yağ asitleri tek tip ise, bu TAG basit triaçilgliserol, iki veya üç çeşit yağ asidinden oluşmuş ise karma triaçilgliseroldür. Örneğin, sadece stearik asitten oluşan TAG, basit tristearin; sırasıyla stearik asit, palmitik asit ve oleik asitten oluşan ise stearopalmitolein olarak adlandırılır [6].

Bir gliserin molekülüne iki yağ asidi bağlanmışsa diaçilgliserol, yalnızca bir tane yağ asidi bağlanmışsa monoaçilgliserol adı verilir. Mono ve diaçilgliseroller gıda ürünlerinde emülgatör olarak kullanılırlar. Eğer yağlarda bulunan bir yağ asidi, gliserin veya başka bir moleküle bağlı değilse serbest yağ asidi olarak adlandırılır. Ham yağların serbest yağ asidi değeri yüksektir. Rafinasyon sonrasında bu değer %0,05'in altına düşürülür [6].

Doğada yüzlerce yağ asidi tanımlanmıştır, ancak en fazla 25-50 tanesi önemlidir. Katı ve sıvı yağlarda en çok rastlanan yağ asitleri bütirik (4:0), laurik (12:0), palmitik (16:0), stearik (18:0), oleik (18:1), linoleik (18:2) ve linolenik (18:3) asitleridir. Yağların karakteristik özellikleri, içerdikleri yağ asitlerinin cinsine, yapısına, zincir uzunluğuna, içerdikleri çift bağ sayısına, sırasına ve karbon atomlarının pozisyonuna göre değişmektedir. Yağ asitleri içerdikleri çift bağ sayısına göre üç gruba ayrılırlar: doymuş yağ asitleri, tekli doymamış yağ asitleri ve çoklu doymamış yağ asitleri. Doymuş yağ asitleri çift bağ içermezler ve oda sıcaklığında genellikle katıdır. Tekli doymamış yağ asitleri tek çift bağ içerirken, çoklu doymamış yağ asitleri iki veya daha fazla çift bağ içerirler. Doymamış yağ asitleri oda sıcaklığında genellikle sıvıdır. Çoklu doymamış yağ asitleri de, zincirin metil ucuna en yakın çift bağın sırasına göre de omega 3, omega 6 ve omega 9 olarak sınıflandırılırlar [6,7].

Yağlar elde edildikleri kaynağa göre bitkisel ve hayvansal yağ kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Hayvansal yağ kaynakları; kara hayvanlarının iç yağları, deniz hayvanlarından elde edilen yağlar ve kara hayvanlarının sütünden elde edilen yağlar olmak üzere sınıflandırılırlar. Bitkisel yağlar ise, ya bitkilerin tohumlarından (pamuk, ayçiçeği, susam, kolza, palm çekirdeği, soya fasulyesi) ya da meyvelerinden (zeytin, badem, fındık, palm meyvesi) elde edilir. Bitkisel yağların yağ asidi kompozisyonu, bitkinin genetik çeşitliliği, yetiştirildiği mevsim, iklim şartları, toprak tipi gibi koşullara bağlı olarak değişmektedir [5,8].

Yağlar kullanım amacına göre ise yenebilen yağlar ve endüstriyel yağlar olmak üzere sınıflandırılırlar. Temel besin maddelerinden olan yağlar, yüksek enerji sağlamaları, içerdikleri temel yağ asitleri, vitaminler gibi yararlı bileşenler nedeniyle insan beslenmesi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Endüstriyel yağlar ise, erusik asit, konjuge yağ asitleri veya toksinler gibi insan vücuduna zararlı bileşikler içermeleri nedeni ile yemeklik yağ olarak kullanılamayan, farklı endüstri alanlarında hammadde olarak değerlendirilen yağlardır. Hint yağı, keten tohumu yağı, tung yağı gibi yağlar endüstriyel yağlara örnek olarak verilebilir [8].

Yağlarda triaçilgliserollerden başka %0,5-2 oranında değişen miktarlarda monoaçilgliseroller, diaçilgliseroller, fosfolipidler, serebrositler, steroller, serbest yağ asitleri, yağda eriyen vitaminler (A, D, E ve K), renk ve koku maddeleri gibi maddeler bulunur. Bütün bu madde grupları için, kimyada lipid terimi kullanılmaktadır [5].

Bitkilerdeki hücre membranlarının anahtar bileşeni olan fosfolipidler, çoğu yağda bulunur. Emülgatör yapıdaki fosfolipidler yağın kalitesine ve verimine olumsuz etki yaptıklarından dolayı rafinasyonun yapışkan madde giderme aşamasında yağdan uzaklaştırılır. Değerli bir yan ürün olan fosfolipidler, başta gıda olmak üzere birçok endüstriyel proseste kullanılmaktadır. Ham yağlar %0,02-3,5 oranında fosfolipid içerirler [4,9,10].

Steroller steran halkası içeren alkoller olup, kısmen serbest kısmense esterleşmiş steroller halinde hem bitkisel hem de hayvansal yağlarda bulunurlar. Genel olarak fitosteroller olarak adlandırılan bitkisel sterollerin büyük çoğunluğunu sitosterol oluştururken, hayvansal yağlarda bulunan en önemli sterol ise kolestroldür. Sterollerin, özellikle sitosterollerin, margarinlere katıldığında hem serum kolestrol hem de düşük yoğunluklu lipoprotein seviyesini düşürdüğü görülmüştür [4,5,9].

Tokoller ise, bitkisel yağlarda bulunan alfa (α), beta (β), gama (δ) ve delta (γ) olmak üzere 4'er adet izomeri olan tokoferol ve tokotrienol'den oluşan doğal antioksidanlardır. Bu antioksidanlar, hidroperoksi ve diğer serbest radikalleri stabilize ederek yağın doğal yapısının oksidatif yolla parçalanmasına ve bozulmasına engel olurlar. Tohum yağları zengin tokoferol kaynağıdır. Tokotrienoller ise ağırlıklı olarak palm yağında ve arpa, pirinç kepeği yağı gibi tahıl yağlarında bulunur [5,9].

Yağlarda bulunan pigmentler, yağa renk veren maddelerdir. Yağa sarı ve kırmızı renk veren karoten, yeşil renk veren klorofil, kahverengi renk veren parçalanmış protein ve karbonhidratlar, pamuk yağına kırmızı-kahverengi renk veren gossipol tanımlanmış renk verici maddelere örnek olarak verilebilir [9].

Yağa kendine has tat ve koku veren maddeler ise, doğal maddeler ve teknolojik işlemler veya oksidatif bozulmalar sonucu oluşan tat ve koku maddeleri olmak üzere iki grup altında incelenir. Doğal tat ve koku maddeleri polietilenik yapıda hidrokarbonlardır. Oksidatif reaksiyonlar sonucu oluşan aldehit, keton, alkol gibi maddeler ise yağın doğal aromasını bozan tat ve koku maddeleridir [5].

Yağın kalitesine ve insan sağlığına zararlı olan ayrıca rafinasyon prosesinin etkinliğini azaltan iz metaller ise, yetiştirme döneminde ve yağın elde edilmesi sırasında bitkiye ve yağa karışır. Bakır, demir, mangan, nikel gibi iz metaller yağın oksidatif stabilizitesini azaltırken, kalsiyum, sodyum ve magnezyum gibi iz metaller

ise asitlik giderme, yapışkan madde giderme, renk açma, hidrojenasyon gibi proseslerin verimini azaltır [9].

2.1.1 Pamuk bitkisi ve pamuk çekirdeği

Sıcak iklimlerde, suyun bol bulunduğu alanlarda verimli bir şekilde yetişen pamuk, *Malvales* takımından, *Malvaceae* (ebegümeciler) familyasından, *Gossypium* cinsinden bir bitkidir. **Şekil 2.2**'de pamuk bitkisi görülmektedir. Dünyada en yaygın olarak *Gossypium hirsutum* (dünya lif üretiminin %90'ı) ve *G. barbadense* (dünya lif üretiminin %8'i) türleri yetiştirilir. Türkiye'de tarımı yapılan pamukların hepsi, *G. hirsutum* türüne ait pamuk çeşitleridir [8,11,12,13].



Şekil 2.2 : Pamuk bitkisi.

Pamuğun anavatanı konusunda tam bir kesinlik bulunmamakla birlikte Asya, Amerika ve Afrika'nın sıcak bölgelerinden dünyaya yayıldığı tahmin edilmektedir. Arkeolojik kanıtlar gerek Hindistan gerek Güney Amerika'da birbirinden bağımsız olarak 6000 ila 7000 yıl önce pamuğun değişik türlerinin tarımının yapıldığını ve giyimde kullanıldığını göstermektedir [11].

Pamuk ürünü, küresel veya oval bir kapsüldür ve olgunluk döneminde kendiliğinden açılarak, tohumları kaplayan lifler dışarı sarkar. Her bir kapsülde 40-45 adet, 8-12 mm uzunluğunda, yumurta şeklinde, ince, sert kabuklu, lifli, kahverengi-siyah renkleri arasında tohum bulunur. Pamuk tohumu (çiğit), etrafındaki tüy veya liflerle beraber 'kütü' adını alır. Tohumlar; %40 lif ve %60 tohumdan oluşan kütlünün hasadı sırasında, liflerle birlikte kapsülden alınır. Kütlünün lifleri çırçır makinelerinde alındıktan sonra, ele geçen tohumlar üzerinde %6-8 oranında lint denilen kısa lifler bulunur. Pamuk tohumu %10-15 lint, %35-40 kabuk ve %50-55 iç

çekirdekten oluşur. **Şekil 2.3**'te pamuk tohumu ve iç çekirdeği görülmektedir [8,11,12,14].



Şekil 2.3 : Pamuk tohumu ve iç çekirdeği.

Çizelge 2.1'de görüldüğü gibi kabuklu halde tohum %17-26, iç halinde ise %33-42 arasında yağ içermektedir [1]. Ayrıca pamuk tohumu zengin vitamin ve mineral kaynağıdır. Tohumlar düşük miktarda sodyum, yüksek miktarda potasyum ve fosfor içerir. Fosforun büyük bir kısmı fitik asit şeklinde bulunur [12]. Pamuk çekirdeğinin mineral ve vitamin içeriği **Çizelge 2.2**'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 : Pamuk çekirdeğinin kompozisyonu [1].

Bileşenler (%)	Kabuklu çekirdek	Kabuksuz çekirdek
Nem	9,9	6,9
Yağ	17 – 26	33 – 42
Protein	19,4	30,3
Ham Lif	22,6	4,8
Kül	4,7	6,9

Çizelge 2.2 : Pamuk çekirdeğinin mineral ve vitamin içeriği [12].

Mineraller	(%)	Vitaminler	Mg/g
Kalsiyum	0,18	β-karoten	0,22
Fosfor	0,55	Tiyamin	19,5
Sodyum	0,14	Riboflavin	2,3
Potasyum	0,97	Niyasin	16,0
Magnezyum	0,33	Pantotenik asit	11,0
		Biyotin	9,8
		Folik asit	0,29
		İnositol	3,8
		Kolin	3,0

2.1.2 Pamuk yağı ve bileşimi

Pamuk yağı, *G. hirsutum* (Amerika) veya *G. barbadense* (Mısır) tohumlarından elde edilen, karakteristik tadı ve kokusu olan, oldukça koyu renkli (kırmızı-kahverengi) bir yağdır. Pamuk bitkisi bir lif bitkisi olduğundan, tarımı yağ üretimi için yapılmaz. Pamuk çekirdeği, kütlü pamuktan elde edilen bir yan üründür. Bu nedenle üretimi, pamuk üretimi ile yakından ilgilidir [13].

Pamuk yağı, pamuk tohumlarından ya mekanik presleme ile ya çözücü ekstraksiyonu ile ya da ikisinin kombinasyonu ile elde edilir. Kabuksuz çekirdeklerin mekanik preslenmesi ile küspede kalan yağ miktarı %33-42'den %3-4'e düşerken, ekstraksiyonla %1-2'lere düşer. İki yöntemin kombinasyonunda ise, ilk olarak çekirdekler ortalama basınç altında pres edilerek yağ oranı %18-20'lere düşürüldükten sonra kalan küspe çözücü ile muamele edilerek yağ oranı %1'in altına düşürülür [15].

Pamuk yağının karakteristik özellikleri; pamuğun cinsine, yetiştiği coğrafi bölgeye, toprak şartlarına, iklime, gübreye, çekirdeklerin toplanması ve hasat sonrası depolama gibi şartlara bağlıdır. Genel olarak çekirdek gelişimi sırasında yüksek sıcaklıklar doymuş yağ asidi gelişimini etkiler. Ilık ve nemli koşullarda yetişen pamuklarda serbest yağ asitleri ve kırmızı renk daha yüksektir. Ayrıca toplanırken çekirdeklerin zarar görmesi de serbest yağ içeriğini yükselterek daha koyu renge sebep olur [9,16].

Pamuk yağının yağ asidi ve triaçilgliserol bileşimi **Çizelge 2.3**'te verilmiştir. %14,7-21,7 oleik asit ve %46,7-58,2 linoleik asit içeriği ile oleik-lineoleik grubu yağlar arasında yer alan pamuk yağının en önemli doymuş yağ asidi ise %21,4-26,4 gibi yüksek miktarda bulunan palmitik asittir. Pamuk yağı ayrıca %0,5'e kadar Malvalik (18-1) ve Sterkülük (19-1) asit içerir. Yağ asidi zincirinin merkezinde bulunan siklopropan halkadan dolayı bu asitler siklopropanoid asit olarak da adlandırılmaktadır. Bu asitlerin reaktanlarla meydana getirdikleri renk reaksiyonları pamuk yağını ayırt etmekte kullanılmaktadır. Siklopropanoid asit içeren yiyeceklerle beslenen tavuklarda yumurta üretiminin düştüğü, sıçanlarda ise kanserojen etki gösterdiği, büyümenin ve cinsel gelişiminin azaldığı görülmüştür. Ayrıca kızartmalarda siklopropanoid asidin okside olması rengi ve tadı etkilemektedir, bu

asitlerin miktarları koku gidermeden sonra %0,5'ten %0,04'lere kadar düşürülmektedir [9].

Çizelge 2.3 : Pamuk yağının yağ asidi ve triaçilgliserol bileşimi [9].

Yağ asitleri	Miktar (%ağırlık)
Miristik (14:0)	0,6-1,0
Palmitik (16:0)	21,4-26,4
Palmitoleik (16:1)	0-1,2
Stearik (18:0)	2,1-3,3
Oleik (18:1)	14,7-21,7
Linoleik (18:2)	46,7-58,2
Linolenik (18:3)	0-1,0
Araşidik (20:0)	0,2-0,5
Gadoleik (20:1)	0-0,1
Behenik (22:0)	0- 0,6
Erusik (22:1)	0-0,3
Lignoserik (24:0)	0-0,1
Triaçilgliserol Bileşimi	
SSS	0 – 0,1
SSU	14,0
SUU	50,0 – 58,0
UUU	28,0 – 36,0

S: Doymuş yağ asidi, U: Doymamış yağ asidi

Pamuk yağının bazı karakteristik özellikleri **Çizelge 2.4**'te görülmektedir. Pamuk yağı kendine has ağır kokusuna ve koyu kırmızı-kahverengi rengine de etki eden az miktarda gliserit olmayan moleküller de içerir. Sabunlaşmayan madde olarak da adlandırılan bu moleküller; gossipol, fosfolipidler, tokoferoller, steroller, reçineler, karbonhidratlar ve kimi pigmentlerdir [9,16].

Çizelge 2.4 : Pamuk yağının bazı karakteristik özellikleri [9].

Analizler	Değerler
Özgül ağırlık, 25/25 °C	0,916 – 0,918
Kırılma indisi, 25 °C	1,468 – 1,472
İyot sayısı	98 – 118
Sabunlaşma Sayısı	189 – 198
Sabunlaşmayan madde (%)	<1,5
Erime noktası (°C)	10-16

Bitkisel kaynaklı yağların sabunlaşmayan maddeleri arasında yer alan en önemli bileşenler, antioksidan etkisi nedeniyle tokoferollerdir. Ham pamuk yağı doğal

tokoferollerce oldukça zengin bir yağdır. Ancak doğal tokoferoller rafinasyon işlemi sırasında tahrip oldukları için ham pamuk yağının, rafine pamuk yağı ile karşılaştırıldığında oksidasyon stabilitesi daha yüksektir. Ham pamuk yağı toplam %0,110 oranında tokoferol içerirken, rafine pamuk yağı %0,086-0,095 oranında tokoferol içermektedir. Yağların sabunlaşmayan bileşenlerinden bir diğeri olan sterollerin ham pamuk yağındaki miktarı ise 0,574 mg/100 mg yağ olarak belirtilmektedir. Bu miktar rafinasyon işlemi ile 0,397 mg/ 100 mg yağ değerine düşürülmektedir [1].

Rengi esmer sarıdan koyu kırmızıya değişen pamuk yağı, toksik etkide ve polifenolik yapıda gossipol denen antioksidan özellikte bir pigment içerir. Pamuk tohumundaki gözeneklerde bulunan gossipolun büyük bir kısmı, yağ ekstrakte edildiğinde proteine bağlanırken, küçük bir kısmı da yağa karışarak koyu kırmızı-kahverengi rengi oluşturur. Bu ise rafinasyon sırasında özellikle asitlik giderme ve ağartmadan sonra uzaklaştırılarak; çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen yağlarda %0,05-0,42'den, presleme ile elde edilmiş yağlarda ise %0,25-0,47'den, güvenli seviyelere (<1 ppm) düşürülmektedir. Rafine yağdaki sarımsı amber rengi bu kalan gossipolden kaynaklanmaktadır. Erkeklerde kısırlığa yol açtığı bilinen gossipol, doğum kontrol ajanı olarak kullanılmaktadır [7,14,16].

Ham pamuk yağı %1-2,5 arası fosfolipid içerir. Fakat pamuk lesitininin oldukça koyu olan rengi, tüketimini olumsuz etkilemektedir [4,12].

Serbest yağ asit değeri, yağın kalitesini belirleyen önemli bir parametredir. Özellikle yağın tadı ve kokusu üzerinde olumsuz etki yapar. Uygun iklim koşullarında yetişmiş pamuk tohumundan elde edilen pamuk yağının asit değeri %1'den daha azdır ancak olumsuz iklim koşullarında yetişen tohumlardan elde edilen yağın asit değeri %5'in de üzerine çıkabilmektedir. Çok nemli ve kötü depolama koşullarında ise bu değer %15-25 aralığında değişmektedir [16].

2.1.3 Pamuk yağının Türkiye'deki ve dünyadaki durumu

2010 yılı verilerine göre, dünya toplam yağlı tohumlar üretimi yaklaşık 441 milyon tondur. Dünya yağlı tohum üretimi **Çizelge 2.5'**te gösterilmiştir. Soya tohumu 256 milyon tonluk üretimle ilk sırada gelmektedir. 2006-2010 yılları arasında 40-45 milyon ton değerlerinde üretilen pamuk tohumu ise, 2010 yılında üretilen 44 milyon tonla dünya yağlı tohumlar üretiminde %10'luk bir paya sahiptir [17].

Çizelge 2.5 : Dünya yağlı tohum üretimi (milyon ton) [17].

Yıllar	2006	2007	2008	2009	2010*
Soya tohumu	240	220	212	248	256
Kolza tohumu	50	50	58	58	58
Pamuk tohumu	45	45,3	40	40	44
Ayçiçeği tohumu	30	30,2	33	31	30
Diğer tohumlar	35	40	48	46	53
TOPLAM	400	385,5	391	423	441

Kaynak: USDA Şubat 2011 Raporu * Tahmin

Çizelge 2.6'daki dünya bitkisel ham yağ üretimi değerlerine baktığımızda ise, toplam 145 milyon ton ham yağ üretilen 2010 yılında 47 milyon tonla palm yağı ilk sırada yer almaktadır. Pamuk yağı ise yaklaşık 5 milyon ton üretimle palm, soya, kolza ve ayçiçeği yağından sonra gelmektedir [17]. **Çizelge 2.7**'de dünya pamuk ekim alanları görülmektedir.

Çizelge 2.6 : Dünya bitkisel ham yağ üretimi (milyon ton) [17].

Yıllar	2006	2007	2008	2009	2010*
Palm yağı	39	42	45	46	47
Soya yağı	36	40	36	42	41
Kolza yağı	18	19	21	21	23
Ayçiçeği yağı	11	10	12	11	11
Pamuk yağı	5	5	5	5	5
Diğer yağlar	16	15	19	17	18
TOPLAM	124	130	138	142	145

Kaynak: USDA Şubat 2011 Raporu * Tahmin

Çizelge 2.7 : Dünya pamuk ekim alanları (bin ha) [18].

Ülkeler	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09*	2009/10**	2010/11**
Hindistan	8.677	9.144	9.439	9.373	10.120	10.575
Çin	5.698	6.199	6.317	6.317	5.419	5.527
ABD	5.586	5.152	4.245	3.063	3.112	3.863
Pakistan	3.100	3.075	3.055	2.850	3.110	3.265
Özbekistan	1.432	1.432	1.450	1.391	1.317	1.330
Brezilya	856	1.097	1.077	840	836	961
Türkmenistan	600	600	642	674	607	667
Burkina Faso	646	716	407	466	420	462
Arjantin	305	400	304	285	430	452
Zimbabve	320	400	308	375	340	391
Tanzanya	245	409	450	400	348	366
Türkiye	600	630	500	365	280	364
Myanmar	284	310	310	310	310	310
Diğer	5.988	5.126	4.332	3.947	3.644	4.147
DÜNYA	34.337	34.690	32.836	30.656	30.293	32.680

Kaynak: ICAC - (*) Tahmin, (**) Projeksiyon

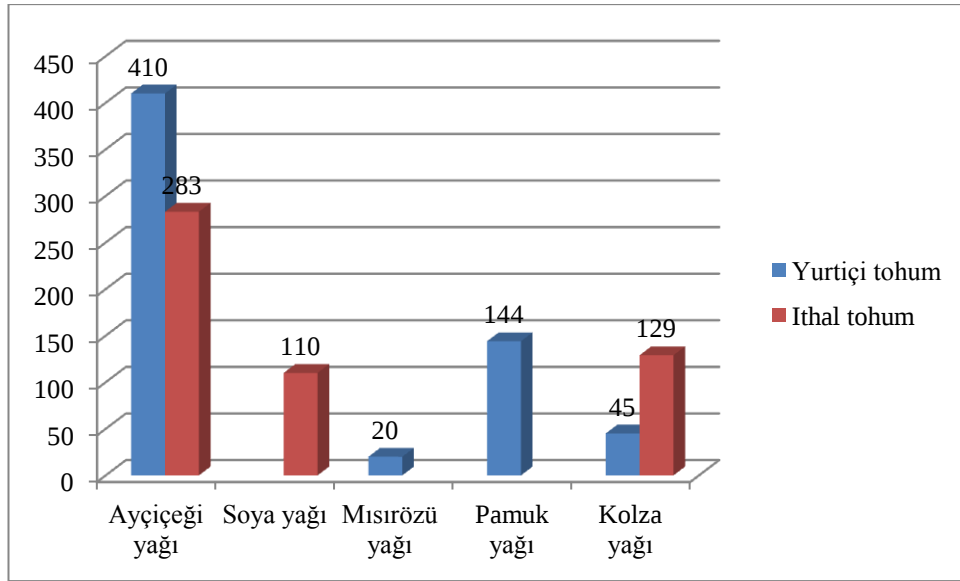
Pamuk tarımı yoğun olarak Orta ve Güney Amerika’da, Asya ve Afrika kıtalarında, Ortadoğu’da ve Türkiye’de yapılmaktadır. **Çizelge 2.7’**de görüldüğü gibi, dünyada 2010-2011 verilerine göre toplam 32.680.000 ha alanda pamuk ekimi yapılmıştır. Pamuk üretim alanlarının en geniş olduğu ülke Hindistan’dır. Ardından sırasıyla Çin, ABD, Pakistan, Özbekistan ve Brezilya gelmektedir. Ortalama değerlere göre pamuk ekim alanı yönünden dünyada 8. sırada olan Türkiye, 2009/10 sezonunda 280 bin hektarla 13. sıraya gerilerken, 2010/11 sezonunda ise 364 bin hektarla 12. sırada yer almıştır [13,18].

Ülkemizde pamuk Ege, Çukurova, Antalya ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde yetiştirilmektedir. İlk üç bölgede pamuk tarımının geçmişi oldukça eskidir. Son yıllarda Güneydoğu Anadolu Bölgesinde GAP projesi ile sulanan alanların artması sonucunda, bu bölge Türkiye’nin en önemli pamuk üretim bölgesi konumuna gelmiştir [18]. **Çizelge 2.8’**de Türkiye yağlı tohumlar üretimi görülmektedir.

Çizelge 2.8 : Türkiye yağlı tohumlar üretimi (bin ton) [17].

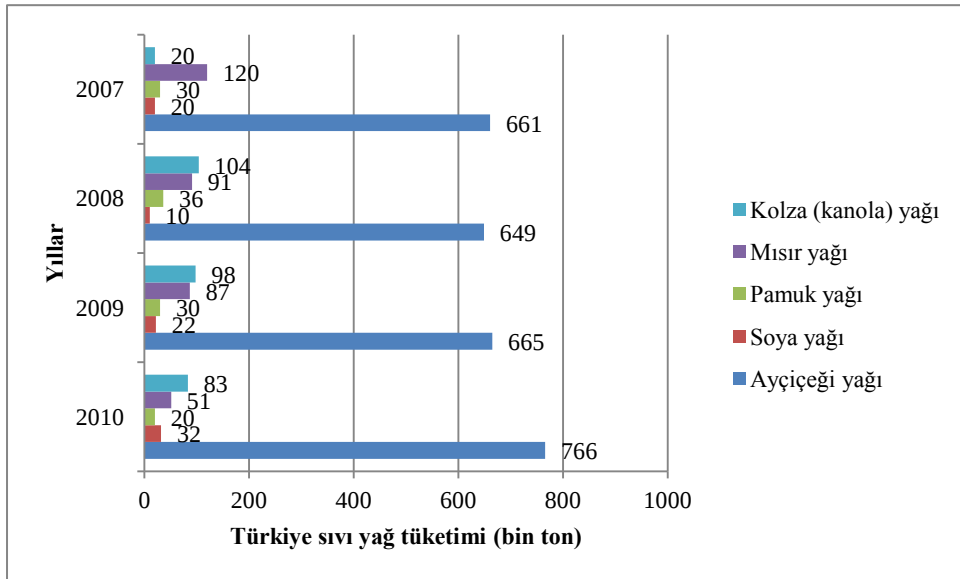
Yıllar	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Pamuk tohumu	1350	1300	1300	1400	1300	1200	850	1150
Ayçiçeği tohumu	660	760	930	950	700	900	800	1000
Soya fasulyesi	85	50	45	35	36	34	39	55
Kolza (kanola)	7	5	2	5	28	82	112	110
TOPLAM	2102	2115	2277	2390	2064	2216	1801	2315

Çizelge 2.8’deki ülkemizdeki yağlı tohum üretimine baktığımızda 2010 yılında toplam 2.315.000 ton yağlı tohum üretildiğini görmekteyiz. Pamuk 1.150.000 tonla ilk sırada yer almaktadır. Ülkemizde bitkisel yağ üretiminde ise ayçiçeği içerdiği yüksek yağ oranı nedeniyle ilk sırada yer almakta, onu kolza ve pamuk yağı takip etmektedir. **Şekil 2.4’**te ülkemizde 2010 yılında yerli ve ithal tohumlar karşılığında elde edilen ham yağ miktarları görülmektedir. Ayçiçeği yağı üretiminde yerli yağlı tohum payı %59, kolza yağı üretiminde %26 iken, bu oran ham pamuk yağı üretiminde hemen hemen %100 seviyelerine yükselmektedir. 2010 yılı verilerine göre ülkemizde yaklaşık 1.150.000 ton pamuk çekirdeğinden 144.000 ton pamuk yağı elde edilmiş, 5.000 ton pamuk yağı ise dışarıdan ithal edilmiştir. Bu yağın 20.000 tonu sıvı yağ olarak, 25.000 tonu margarin yapımında, 91.000 tonu ise diğer (yem, boya ve sabun yapımında) alanlarda kullanılmıştır. 8.000 ton pamuk yağı ise dışarıya ihraç edilmiştir [17,19].



Şekil 2.4 : 2010 yılı Türkiye bitkisel ham yağ üretimi (bin ton) [19].

Şekil 2.5'te Türkiye'deki sıvı yağ tüketimi görülmektedir. Görüldüğü gibi ülkemizde 2010 yılında tüketilen toplam 952 bin ton sıvı yağın %2.1'ini 20 bin tonla pamuk yağı oluşturmaktadır.



Şekil 2.5 : Türkiye sıvı yağ tüketimi (bin ton) [17].

2.1.4 Pamuk yağının kullanım alanları

Pamuk bitkisi, yaygın ve zorunlu kullanım alanlarıyla insanlık açısından, yarattığı katma değer ve istihdam olanaklarıyla da üretici ülkeler açısından büyük ekonomik öneme sahip bir üründür. Pamuk işlenmesi açısından çırçır sanayisinin, lifi ile tekstil sanayisinin, çekirdeği ile yağ ve yem sanayisinin, linteri ile de kağıt sanayisinin

hammaddesi durumundadır. Petrole alternatif olarak pamuğun çekirdeğinden elde edilen yağ, giderek artan miktarda biyodizel üretiminde de hammadde olarak kullanılmaktadır. Bu sebeplerin yanında nüfus artışı ve yaşam standardının yükselmesi, pamuk bitkisine olan talebi de arttırmaktadır [18].

Pamuk yağı yüksek linoleik-oleik asit içeriği ile margarin yapımında, fırıncılık yağı, kızartma ve salata yağı olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde üretilen pamuk yağı ise, önemli ölçüde margarin üretiminde ham yağ olarak kullanılmaktadır. Pamuk yağının sıvı yağ olarak tüketimi sadece Çukurova ve Batı Karadeniz’de bölgesel olarak, giderek azalan miktarlarda devam etmektedir. Rafine pamuk yağı, kızartma amacıyla kullanıldığında diğer yağlara göre daha kaliteli sonuç verdiği için dolayı, lokantacılar tarafından tercih edilmektedir [20].

Pamuk yağı gıda dışında sabun, gres yağı, sülfonlu yağ, ilaç, koruyucu kaplama, lastik yapımında, daha az miktarda ise deri, tekstil, baskı mürekkebi, parlaticı, sentetik plastik ve reçine yapımında da kullanılmaktadır [16].

2.2 Bitkisel Yağ Rafinasyonu

Presleme ve çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen ham yağlar, değişik miktarlarda yağ dışı safsızlıklar içerirler. Bu maddeler; serbest yağ asitleri, mono- ve diaçilgliseroller, fosfolipidler, steroller, tokoferoller, hidrokarbonlar, reçineler, renk maddeleri (klorofil, ksantofil, karoten, gossipol), iz metaller, uçucu aldehit ve ketonlar, tat ve koku maddeleridir. Ham yağlardaki bu maddelerin miktarı, yağın kaynağına, coğrafi kökenine, mevsime ve ekstraksiyon prosesine göre değişir. Aynı zamanda bu maddeler yağın besinsel, fonksiyonel ve duyusal özelliklerine de etki etmektedirler [1,4,9].

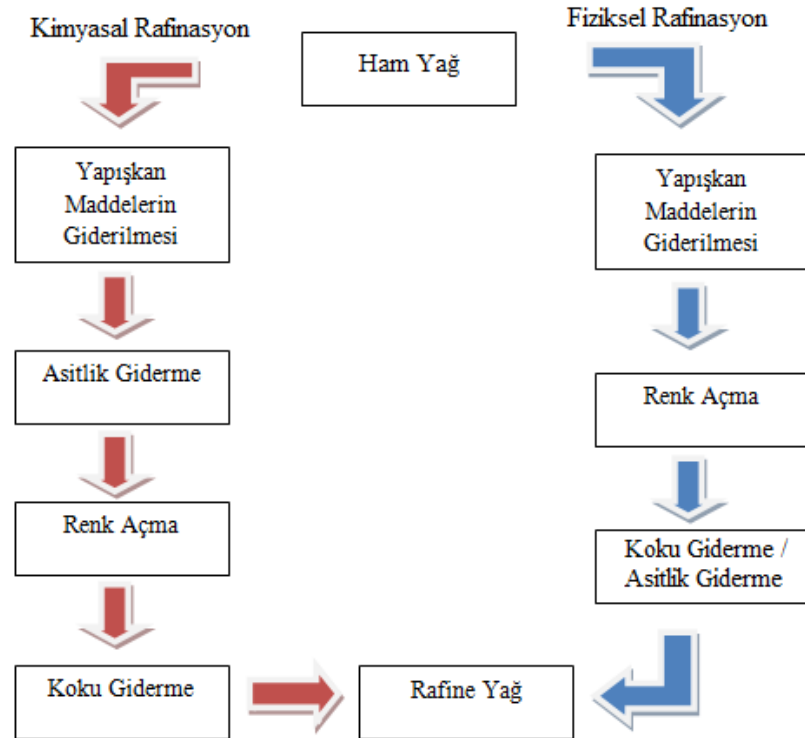
Rafinasyon işlemindeki amaç, yağın kalitesini olumsuz etkileyen yağ dışı safsızlıkların, yağın triaçilgliserol yapısına ve tokoferollere en az zarar verecek şekilde yağdan uzaklaştırılarak, yağa tüketilebilir özellik kazandırmaktır. İstenmeyen bu bileşenler, ileriki proses aşamalarında ortaya çıkarak, yağın kararmasına, bulanıklaşmasına, köpürmesine, çökmesine neden olabilir ve yağın rengini, tadını, kokusunu ve raf ömrünü olumsuz etkileyebilirler. Ayrıca rafinasyon proseslerinde uzaklaştırılan kimi safsızlıklar değerli yan ürünlerdir ve geri dönüştürülerek başka

alanlarda kullanılabilirler [1,7,9]. **Çizelge 2.9**'da her rafinasyon basamağında yağdan ayrılan maddeler gösterilmiştir.

Çizelge 2.9 : Rafinasyon basamakları ve yağdan ayrılan maddeler [5].

Basamaklar	Ayrılan maddeler
1. Yapışkan maddelerin giderilmesi	Fosfolipidler, şekerler, reçineler, proteinli bileşikler, iz metaller
2. Asitlik giderme	Serbest yağ asitleri, renk maddeleri, vitaminler ve soapstock
3. Renk açma	Renk maddeleri, vitaminler ve antioksidanlar
4. Koku giderme	Aldehitler, ketonlar, yağ alkolleri, sülfür bileşikleri
5. Vinterizasyon	Stearinler ve mumsu maddeler

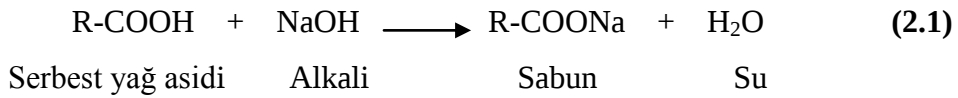
Yağlarda rafinasyon işlemi kimyasal rafinasyon ve fiziksel rafinasyon olmak üzere iki yöntemle yapılabilmektedir. Kimyasal rafinasyonda yapışkan maddelerin giderilmesi (degumming), asitlik giderme (nötralizasyon), renk açma ve koku giderme (deoderizasyon) kademeleri yer almaktadır. Fiziksel rafinasyonun birinci kademesini yapışkan maddelerin giderilmesi, ikinci kademesini ise renk açma işlemi oluşturmakta, son kademedeki ise asitlik giderme ve koku giderme işlemleri tek kademedeki ve buhar distilasyonu ile gerçekleştirilmektedir. **Şekil 2.6**'da fiziksel ve kimyasal rafinasyonun aşamaları gösterilmiştir. [1].



Şekil 2.6 : Kimyasal ve fiziksel rafinasyon basamakları [4].

2.2.1 Kimyasal rafinasyon

Konvansiyonel rafinasyon olarak da tanımlanan kimyasal rafinasyonun ilk kademesini oluşturan yapışkan maddelerin giderilmesi işleminde fosfolipidlerin yağdan uzaklaştırılması için su ve zayıf asit çözeltileri (fosforik asit, sitrik asit vb.) kullanılmaktadır. Kimyasal rafinasyonun en önemli aşaması asitlik gidermedir (nötralizasyon). Bu aşamada serbest yağ asitleri, sodyum hidroksit, potasyum hidroksit, sodyum bikarbonat gibi alkali çözeltilerle sabunlaştırılır; oluşan sabun dekantasyon veya santrifüjle yağdan uzaklaştırılır. Gerçekleşen sabunlaşma reaksiyonu **denklem 2.1**'de verilmiştir [1,4,21].



Asitlik giderme aşamasında serbest yağ asitleri ile birlikte asidik karakterde olan başka maddeler, fosfolipidler, parçalanmış karbonhidrat ve protein ürünleri, sterollerin, ağır metallerin ve pigmentlerin büyük bir kısmı da yağdan ayrılır. Sorunsuz bir asitlik giderme aşaması için ham yağın fosfor içeriği 250 ppm'i aşmamalıdır. Bu sebeple asitlik gidermeden önce yapışkan maddeler uzaklaştırılır. Asitlik giderme işleminde, önce ham yağ optimum proses sıcaklığına ısıtılır. Soya, kolza, ayçiçeği gibi birçok yağ için bu sıcaklık yaklaşık 90°C'dir. Ancak daha hassas yağlar için, örneğin pamuk ve pirinç kepeği yağı, renk değişimlerinden korumak için 65°C'nin üzerine ısıtılmamalıdır. Yağın cinsine ve serbest yağ içeriğine göre NaOH konsantrasyonu %8 ile 24 arasında değişmektedir. Daha yüksek serbest yağ içeriğine sahip yağlar için daha konsantre NaOH kullanılmaktadır. Kimyasal rafinasyon sonrasında yağdaki serbest yağ içeriği %0,1'in, fosfolipid içeriği ise 10 ppm'in altına düşürülür. Asitliği giderilmiş yağ iz miktarda da olsa sabun kalıntısı içerir. Bu sebeple ilk önce nötr yağ 90°C sıcaklıktaki su ile yıkanıp, ardından 70-80°C sıcaklıkta 50-70 mmHg basınçta kurutulur [1,4,5].

Kimyasal rafinasyonun üçüncü aşaması renk açmadır. Bu aşamada ham yağlarda doğal olarak bulunan (alfa ve beta karoten, ksantofil, klorofil) veya diğer tepkimeler sonucu oluşan renk maddeleri adsorbsiyonla yağdan uzaklaştırılır. Renk açma işleminde kullanılan adsorbantlar, doğal ağartma toprakları, aktifleştirilmiş ağartma toprakları ve aktif kömür olmak üzere üç grup altında toplanırlar. En önemli adsorban maddesi, ağartma toprağı olarak adlandırılan diatome toprağı veya fuller

toprağı yani kildir (hidrate olmuş alüminyum silikat). Genellikle açık renkli katı ve sıvı yağların renklerini açmada kullanılan doğal topraklar, günümüzde sülfirik veya hidroklorik asitle muamele edilerek iyon değiştirme özellikleri arttırılmaktadır. Özellikle yeşil, kırmızı ve mavi renklerin alınmasında etkili olan aktif karbon ise, pahalı olması ve fazla yağ emmesi nedeniyle çoğunlukla doğal ağartma toprağına karıştırılarak kullanılır (10-20 kısım doğal ağartma toprağına 1 kısım aktif karbon). Renk açma işlemi ile yağda iz miktarda kalmış fosfolipidler, nötralizasyon artığı sabunlar, metaller ve okside olmuş maddeler de yağdan uzaklaştırılır [1,5].

Kimyasal rafinasyonun son aşamasını oluşturan koku giderme (deoderizasyon) işlemi, yağa istenmeyen tat ve koku veren uçucu yapıdaki bileşiklerin, yüksek sıcaklık (200-260°C) ve düşük basınç altında su buharının da sürükleyici etkisi ile yağdan uzaklaştırılmasıdır. Koku giderme işlemi sırasında yağdan uzaklaştırılan maddeler sabunlaşan maddeler (serbest yağ asitleri, kısmi gliseritler, metilik esterler, mumsu maddeler), sabunlaşmayan maddeler (parafinik hidrokarbonlar, olefinik ve poliolefinik maddeler, steroller, triterpenik alkoller, tokoferoller) ve oksidatif tepkimeler sonucu oluşan ürünler (aldehitler, ketonlar, peroksitler) olmak üzere üç grup altında incelenir. Koku alma işleminden sonra yağdaki serbest yağ asidi miktarı %0.015-0.030'a kadar düşürülür [1,5].

Rafinasyon işleminden sonra özellikle ayçiçeğı, pamuk ve mısırözü gibi yağlara soğuklatma (vinterizasyon) işlemi uygulanır. Bu işlemin uygulanmasındaki amaç, yağlarda bulunan doymuş trigliseritlerin özellikle stearinlerin 8-10°C'de donarak yağı bulandırmasını önlemektir. Bu amaçla, yağ kristalizatöre alınıp, kristalizasyon sıcaklığına kadar (0-10°C) soğutulur. Kristalleşen kısım sıvı yağdan ayrılmaya başlayınca, soğutulmuş yağ soğuk filtrelerden geçirilerek berrak kısmı ayrılır. Bulanıklık yapan stearinler ve vakslar filtrede tutulur. Bazı işletmelerde vinterizasyon aşaması, renk açma ve koku giderme aşamaları arasında yer almaktadır. Böylece renk açma ve vinterizasyon işlemi sırasında yağa geçebilecek koku, koku giderme aşamasında giderilir. [5].

2.2.2 Fiziksel rafinasyon

Kimyasal rafinasyonda serbest yağ asitleri, NaOH gibi alkali çözeltisiyle sabuna dönüştürülerek uzaklaştırılmaktadır. Özellikle yüksek asitli yağlarda oluşan bu madde emülgatör görevi yaparak rafinasyon kaybının artmasına sebep olmaktadır.

Ayrıca nötralizasyon sıcaklığına, süresine ve baz çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olarak nötr yağlar da sabunlaşmaktadır. Fiziksel rafinasyonda ise bunun önüne geçebilmek için ayrı bir nötralizasyon işlemi yapılmamakta, asitlik giderme ve koku giderme işlemleri aynı kademede su buharı distilasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Bu işlem 1 mbar basınçta, 250°C sıcaklıkta 40-50 kg/ton yağ oranında su buharı kullanılarak yapılır. Çoklu doymamış yağ asitleri içeren ve yüksek fosfolipidli yağlar için, yapışkan maddeleri giderme ve renk açma aşamaları da oldukça dikkat edilmesi gereken aşamalardır. Özellikle yapışkan maddeleri giderme basamağının daha etkili olması için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu konu bir sonraki başlıkta daha detaylı olarak incelenecektir [5,22].

Fiziksel rafinasyon, yüksek yağ verimi, daha az kimyasal (fosforik asit, sülfirik asit, kostik soda vb) ve su kullanımı, daha ekonomik olması, daha az atık su ortaya çıkararak çevreye daha az zarar vermesi gibi birçok önemli avantajı yüzünden kimyasal rafinasyona tercih edilmektedir. Diğer taraftan fiziksel rafinasyon hassas bir proses olduğundan tüm ham yağlar için uygun değildir. Düşük kalitedeki yağlar, yani daha çok miktarda ve çeşitte safsızlık içeren yağlar alkali çözeltisiyle daha kolay temizlenirler. Ayrıca, kimyasal rafinasyonda yağdaki renk maddelerinin bir kısmı nötralizasyon sırasında oluşan sabunun sürükleyici etkisi nedeniyle yağdan uzaklaştırılırken, fiziksel rafinasyonda bu aşama buhar distilasyonundan önce uygulandığı için gerekli ağartma toprağı miktarı daha yüksek olmaktadır. Hangi rafinasyon yönteminin uygun olduğunun belirlenmesi, ham yağın kalitesine, serbest yağ asidi değerine, bölgesel çevre kanunlarına bağlıdır [1,4].

2.3 Yapışkan Maddelerin Giderilmesi

Ham yağlar, yapışkan madde (gum) olarak bilinen fosfolipidleri, reçineleri, iz metalleri içerirler. Kimyasal ve fiziksel rafinasyonun ilk kademesini oluşturan yapışkan maddelerin giderilmesi (degumming) işlemi, çeşitli yöntemlerle yağdan bu maddelerin uzaklaştırılmasıdır [1].

Yapışkan maddelerin yağdan giderilmesinin nedenleri şu şekilde sıralanabilir [1,10,23]:

- Emülgatör yapıdaki fosfolipidler özellikle asitlik giderme aşamasında yağ kaybının artmasına neden olurlar.

- Yapışkan maddelerin giderilmesi ve yağ kaybının azalması ile rafinasyon sırasında oluşan atık su miktarı da azalır.
- Yapışkan maddeler özellikle yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilen koku giderme aşamasında koyu renkli maddeler oluşturarak yağın renginin koyulaşmasına neden olurlar.
- İz metaller ile prooksidan yapıda bileşik oluşturarak oksidatif reaksiyonları hızlandırırlar, böylece yağın tadını ve rengini olumsuz etkilerler.
- Nem çekici fosfolipidler havanın nemiyle hidrate olup çamurumsu bir hal alarak depolama ve nakliyat sırasında problem oluştururlar. Bu sebeple presleme veya ekstraksiyonla yağ elde edilmesinden hemen sonra yapışkan madde giderme işlemi yapılmalıdır.
- Yapışkan maddelerin giderilmesi sonucu elde edilen lesitin gibi bazı fosfolipidler gıda, tekstil, kozmetik ve boya sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

Yapışkan maddelerin önemli bir kısmını fosfolipidler oluşturmaktadır. Ham yağların fosfolipid içerikleri, tohum türlerine, hatta aynı türün farklı çeşitlerine göre bile değişebilmektedir. Fosfatid olarak da adlandırılan bu maddelerin bazı ham yağlardaki miktarları **Çizelge 2.10**'da verilmiştir. Yağın fosfolipid içeriğini belirlemek için ilk önce yağdaki fosfor miktarı analiz edilir, sonra bu değer, fosforun fosfolipidler içerisindeki ağırlıkça oranından türetilen yaklaşık 25-30 gibi bir faktörle çarpılarak fosfolipid miktarına dönüştürülür [4,10].

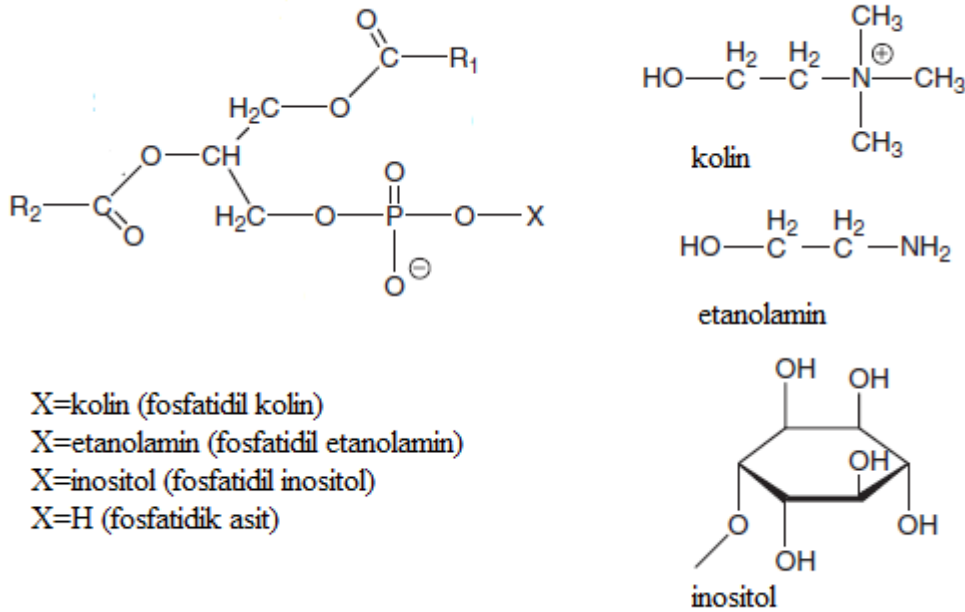
Çizelge 2.10 : Bazı ham yağların fosfolipid içerikleri [4].

Yağlar	Fosfolipid (%)	Fosfor (ppm)
Kolza yağı	0,5-3,5	200-1400
Soya yağı	1,0-3,0	400-1200
Pamuk yağı	1,0-2,5	400-1000
Mısır yağı	0,7-2,0	250-800
Ayçiçeği yağı	0,5-1,3	200-500
Aspir yağı	0,4-0,6	150-250
Yer fıstığı yağı	0,3-0,7	100-300
Palm yağı	0,03-0,1	15-30
Hindistan cevizi yağı	0,02-0,05	10-20

Carelli ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri bir çalışmada, yağlardaki fosfor miktarını fosfolipid miktarına dönüştürmek için kullanılan deneysel ve teorik dönüşüm

faktörleri karşılaştırılmıştır. Bunun için ham ve yapışkan maddeleri giderilmiş ayçiçeği yağlarının fosfor içeriği ve fosfolipid bileşimi ölçülmüş ve ortalama teorik dönüşüm faktörleri sırasıyla, 24,7 ve 23,0 olarak bulunmuştur. Yapışkan maddeleri giderilmiş yağlar için bulunan deneysel dönüşüm faktörü, teorik değer ile iyi uyum gösterirken, ham yağlarda önemli ölçüde teorik değer altında kalmıştır. Bu farkın, fosfolipid dışındaki safsızlıklardan kaynaklanan fosfordan ve kromatografik analizle saptanamayan minör fosfolipidlerden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Ayrıca çalışmada, ekstrakte edilmiş yağlarda presleme ile elde edilmiş yağlara kıyasla daha yüksek miktarda fosfolipid bulunduğu belirtilmiştir [24].

Fosfolipidlerin genel kimyasal yapısı **Şekil 2.7**'de gösterilmiştir. Gliserin molekülünün 1 ve 2. pozisyonundaki hidroksil grubu biri doymuş diğeri doymamış iki yağ asidi ile esterleşirken, 3. pozisyonundaki hidroksil grubu ise fosfolipidin türüne göre değişen bir grupla (X) birleşmiş olan H_3PO_4 ile esterleşmiştir [25].



Şekil 2.7 : Fosfolipidin genel kimyasal yapısı ve bazı önemli fosfolipidler [26].

Ham bitkisel yağlarda en yaygın olarak bulunan fosfolipidler, fosfatidil kolin (PC), fosfatidil etanolamin (PE), fosfatidik asit (PA), fosfatidil inositol (PI) ve fosfatidil serindir (PS) [4].

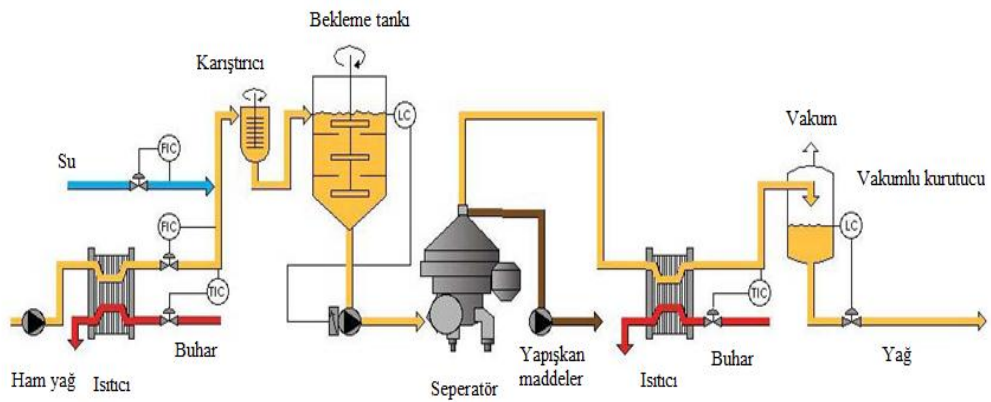
Yapışkan madde giderme prosesi ile yağdan uzaklaştırılan fosfolipidler, geri dönüştürülerek, gıda ve diğer endüstriyel proseslerde emülgatör ajanı olarak

kullanılmaktadır. Günümüzde sadece soya yağından elde edilen fosfolipidler ticari olarak işlenmektedir. İlk olarak yumurta sarısında keşfedilen fosfatidil kolinin ticari ismi olan ‘lesitin’ terimi soya yağından elde edilen tüm fosfolipidler için kullanılmaktadır [10].

Ham yağlardaki fosfolipidler hidrate olabilenler (HP) ve hidrate olamayanlar (NHP) olmak üzere sınıflandırılırlar. Fosfatidil kolin (PC), fosfatidil inositol (PI) ve fosfatidil etanolamin (PE) oldukça yüksek hidrate olma özelliğine sahiptirler. Hidrate olamayan fosfolipidler ise fosfatidil etanolamin (PE) ve fosfatidik asit (PA)’in kalsiyum ve magnezyum tuzlarıdır. Yağlarda hidrate olamayan fosfolipidlerin içeriği, yetiştirme ve depolama şartlarının etkilediği tohumun kalitesine ve ekstraksiyon koşullarına göre değişebilmektedir [10].

2.3.1 Hidratasyon yöntemiyle yapışkan maddelerin giderilmesi

Hidrate olabilen fosfolipidlerin ham yağdan uzaklaştırılmasında hidratasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde çözücü ekstraksiyonu veya presleme ile elde edilen ham yağ, 70-80°C’ye ısıtılıp hacimce %1-3 oranında su ile karıştırılır. Kesikli sistemlerde 30-60 dakika, sürekli sistemlerde ise 10-15 dakika karıştırılmalı tankta bekledikten sonra bünyelerine su alarak topaklanan yapışkan maddeler santrifüjleme işlemi ile yağdan ayrılırlar. Eğer sürekli sistemlerde yüksek hızda bir karıştırıcı kullanılırsa bu süre 1 dakika veya daha altına inebilir. Hidrate olabilen safsızlıklarından ayrılan yağ ise kurutucuya gönderilir [1,10]. Hidratasyon yöntemiyle yağdan yapışkan maddeleri giderme prosesi **Şekil 2.8**’de gösterilmiştir.



Şekil 2.8 : Hidratasyon yöntemi ile yapışkan maddelerin yağdan giderilmesi [27].

Hidratasyon yönteminde eklenen su miktarı ve sıcaklık önemli parametrelerdir. Az su kullanımı, koyu renkli, yoğun yapışkan madde ve bulanık bir yağ oluşmasına neden olurken, fazla su kullanımında ise hidrolizden dolayı yağ kaybı artar. Diğer taraftan, yüksek sıcaklıklarda fosfolipidlerin çözünürlüğünün artmasından dolayı işlem yavaşlarken, düşük sıcaklıklarda fosfolipidlerin viskozitesi artacağından ayrılma zorlaşacaktır [23].

Hidratasyon yöntemi hidrate olabilen fosfolipidleri uzaklaştırmak için kolay ve hızlı bir yöntemdir. Asidik yöntem lesitin kararmasına neden olduğu için, özellikle soya yağından lesitin elde edebilmek için bu yöntem uygulanmaktadır. Ancak hidratlanamayan fosfolipidler, özellikle fosfatidik asitin ve lizofosfatidik asitin kalsiyum ve magnezyum tuzları, gliserofosfatlar ve inorganik fosfatlar suda çözünemediklerinden yağda kalarak bu yöntemle ayrılamazlar. Hidratasyon yöntemi ile ham yağın tipi ve kalitesine, içerdiği hidrate olamayan fosfolipid içeriğine göre, yağdaki fosfor miktarı 80-200 ppm seviyelerine düşer [22,23,24,28].

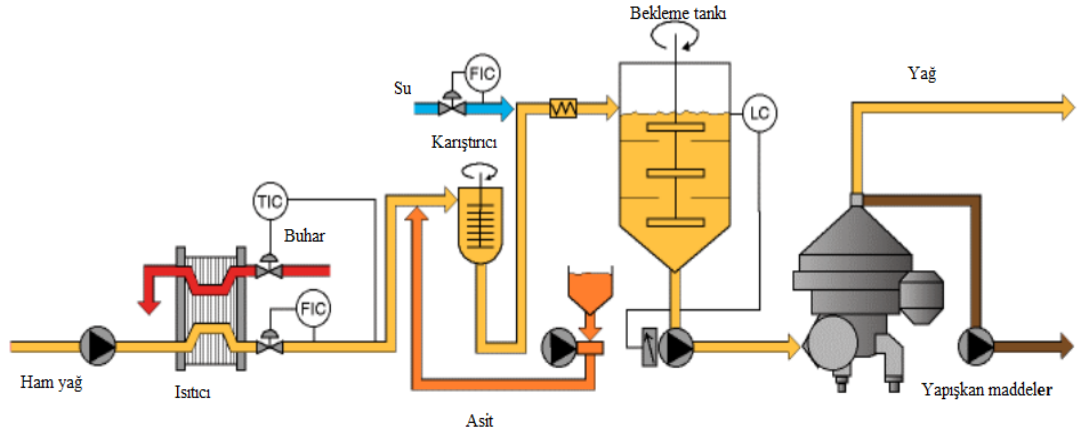
2.3.2 Asidik yöntemle yapışkan maddelerin giderilmesi

Asidik yöntemle yapışkan madde giderme prosesinde, hidrate olamayan maddelerin hidrate hale getirilerek yağdan uzaklaştırılması amaçlanmaktadır. Asidik yöntem, asit ve suyun birlikte kullanılmasıyla, hidratasyon yönteminin bir çeşidi olarak da kabul edilebilir. Bu yöntemle, kalsiyum ve magnezyum tuzları halinde bulunan fosfatidik asit ve fosfatidil etanolamin gibi hidratlanamayan fosfolipidler, hidratlanabilir hale getirilirler. Kullanılan asit ile fosfatidik asit ve fosfatidil etanolaminde bulunan iki değerlikli kalsiyum ve magnezyum iyonları serbest hale geçerek sulu faz ile yağdan ayrılırlar. Bunun için gıdalarda kullanılabilir, iki değerlikli metal iyonları ile bağlanabilen ve yeteri kadar güçlü asitler olan fosforik asit ve sitrik asit kullanılmaktadır. Fosforik asit ham yağın fosfor içeriğini arttırabildiği için daha pahalı olmasına karşın sitrik asit daha çok tercih edilmektedir [29,30].

Bazı asidik yöntem proselerinde ise, asit uygulanarak serbest kalan fosfolipidleri suda çözünen sodyum tuzlarına dönüştürmek için NaOH çözeltisi eklenir. Böylece yağın fosfor içeriği daha da azaltılır [4].

Sitrik asit ve fosforik asitten başka, PA'nın iki değerlikli metal iyonlarıyla daha güçlü bağlanarak, hidrate olabilir hale getiren etilen diamin tetra asidik asit (EDTA) de yapışkan madde giderme proselerinde kullanılmaktadır [26].

Asidik yöntem ile yağdan yapışkan maddeleri giderme prosesi **Şekil 2.9**'da gösterilmiştir. 60-80°C sıcaklığa ısıtılan ham yağa %85'lik fosforik asit veya %45'lik sitrik asit çözeltisinden genellikle yağın ağırlıkça %0.01-0.4'ü oranında ilave edilir. Yağ, asit çözeltisi ile 5000 devir/dak gibi yüksek bir hızda 1 dakikadan daha kısa bir süre karıştırılır. Su ilave edilerek 30 dakika tankta bekletilen yağ, santrifüjlenerek, hidrate olmayan yapışkan maddelerinden ayrılır [1,27].



Şekil 2.9 : Asidik yöntem ile yapışkan maddelerin yağdan giderilmesi [27].

Bu prosesle elde edilen yağ içindeki fosfor miktarı, ham yağdaki hidratlanmayan fosfolipidlerin miktarına bağlıdır. Ayçiçeği gibi düşük hidratlanmayan fosfolipid içeren yağlarda 5-30 ppm arası fosfor kalırken, daha yüksek miktarda içeren yağlarda 30 ppm'den daha yüksek miktarda fosfor kalır [10].

2.3.3 Enzimatik yöntemle yapışkan maddelerin giderilmesi

Son yıllarda biyoteknolojik gelişmelerin artmasına paralel olarak yağ sanayisinde de enzimlerin kullanıldığı çalışmalar giderek yaygınlaşmaktadır. Özellikle fiziksel rafinasyon için geçerli olan ve enzimatik degumming olarak adlandırılan yöntemde yapışkan maddelerin giderilmesi için fosfolipaz enzimlerinden yararlanılmaktadır. Bu yöntemde fosfolipidler fosfolipaz enzimi yardımıyla suda çözünebilen fosfolipidler haline getirilip, santrifüj ile yağdan uzaklaştırılmaktadır. [21].

Ham yağdaki yapışkan maddeleri uzaklaştırmak için hidrasyon, asidik, superdegumming, total degumming, ultrafiltrasyon prosesi gibi birçok yöntem geliştirilmiştir. Sanayide yaygın olarak kullanılan hidrasyon ve asidik yöntemlerle yüksek fosfolipid içeren yağlardaki fosfor miktarı istenen seviyeye

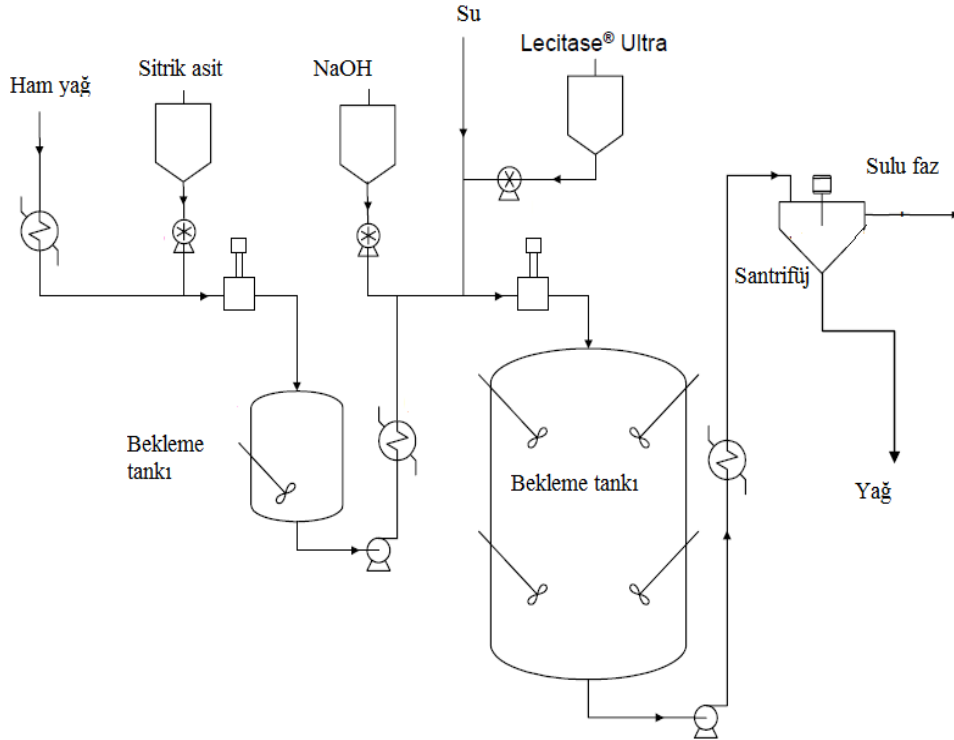
düşürülememektedir. Superdegumming ve total degumming prosesleri ise her türlü yağa uygulama güvenilirliği olmadığından dolayı sanayide nadir olarak kullanılmaktadır. Yeni bir metot olan ultrafiltrasyon prosesi ise pahalı bir yöntemdir. Ancak 1992 yılından beri geliştirilmekte olan enzimatik yöntemde ise, bitkisel yağların fosfor içeriği 10 ppm'in altına, kimi yağlarda ise 5 ppm'in altına kadar düşürülebilmektedir [3, 31].

Enzimatik yolla yapışkan maddeleri giderme prosesi ilk olarak 1992 yılında fiziksel rafinasyona uygun olarak, Alman Lurgi ve Röhm şirketleri tarafından "EnzyMax® Process" adıyla geliştirilmiştir [2].

Enzimatik yöntemlerin öncüsü olan EnzyMax® prosesi 3 önemli adımdan oluşur [32]:

- Enzim reaksiyonu için optimum şartların ayarlanması (optimum sıcaklık ve tampon çözeltiyle optimum pH ayarlaması)
- Enzim çözeltisinin eklenmesi ve enzim reaksiyonunun gerçekleşmesi
- Yapışkan maddelerin yağdan ayrılması

EnzyMax® yöntemi ile yapışkan madde giderme prosesi **Şekil 2.10**'da görülmektedir.



Şekil 2.10 : EnzyMax yöntemi ile yapışkan maddeleri yağdan giderme prosesi [33].

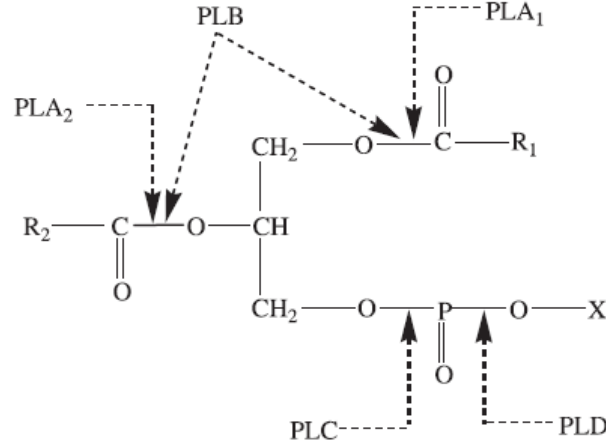
Şekil 2.10'da da görüldüğü gibi EnzyMax® yöntemi ile yapışkan maddeleri giderme prosesinde ilk aşama, ham yağa 70-80°C sıcaklıkta sitrik asit çözeltisi eklenmesidir. Sitrik asit ve yağ, karıştırıcı ile dağıtılarak, reaksiyonun tamamlanması için 15-30 dakika bekleme tankında bekletilir. Sitrik asit metal iyonlarını yakalayarak, enzimlerin fosfolipidlere ulaşmasını kolaylaştırır. Enzim reaksiyonunun gerçekleşmesi için gerekli sıcaklığa ısıtılan yağa, pH ayarlaması için uygun miktarda NaOH ilave edilir. Bu miktar her mol sitrik aside karşılık 1,5-2 mol NaOH olacak şekildedir. Enzim, yağın kalitesine göre değişmekle birlikte yağ miktarının yaklaşık %1-3'ü kadar suyla birlikte, yağa ilave edilir. Yağda çözünen fosfolipid ve suda çözünen enzim arasındaki reaksiyon, yağ-su ara fazında meydana gelir ve fosfolipidler suda çözünen fosfolipidlere dönüştürülür. Bu sebeple gerekli yüksek yüzey alanını sağlamak, tüm bileşenler arasında emülsiyon oluşturmak için yüksek parçalayıcı karıştırıcı kullanılır. Enzim reaksiyonun tamamlanması için bekleme tankında 3-6 saat bekletilen yağ-su karışımı son aşamada santrifüje gönderilir, yağ ve sulu faz birbirinden ayrılır [32,33].

Enzimatik yöntemin diğer yöntemlere göre tercih edilmesindeki başlıca sebepler şunlardır [24,34]:

- Ham yağdaki fosfor seviyesini 0-5 ppm seviyelerine düşürerek, özellikle fiziksel rafinasyon işlemine tabi tutulacak yağlar için en uygun yöntemdir.
- Daha az asit, baz ve su kullanımıyla diğer yöntemlere göre daha ekonomiktir.
- Mevcut yöntemlere göre daha yüksek yağ verimi sağlar.
- Enzimler yüksek seçicidirler ve reaksiyon için küçük miktarda enzimler yeterli olabilmektedir.
- Her tür yağa uygulanabilir, daha kalitesiz yağlarda bile düşük fosfor ve demir içeriği sağlanabilir.
- Basit bir yöntemdir ve mevcut rafinelere uyarlanabilir.
- Yağ asitlerine ve yararlı bileşiklere daha az zarar verir.
- Düşük fosfor sağlamasıyla, renk açma ve mum giderme aşamalarının daha etkili olması sağlanır.

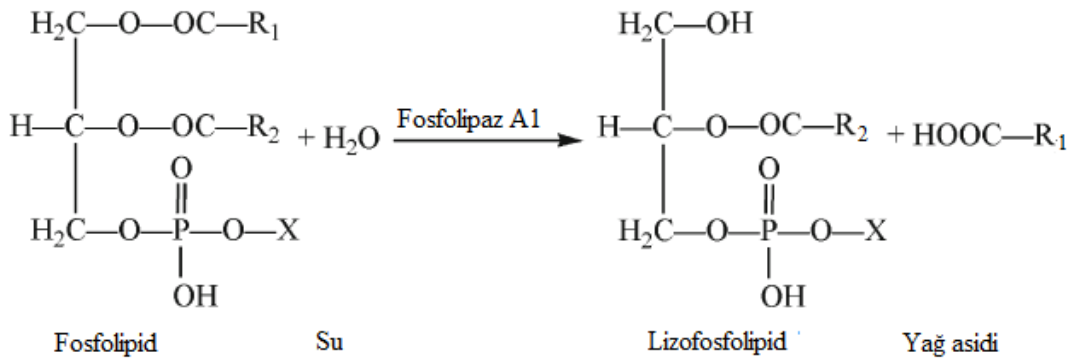
Enzimatik yöntem yukarıda saydığımız birçok avantajı nedeniyle, fiziksel rafinasyonun yapışkan maddeleri giderme aşamasında son yıllarda tercih edilen ve üzerinde çok fazla çalışmanın yapıldığı bir yöntemdir.

Enzimatik yapışkan madde giderme proseslerinde kullanılan fosfolipazlar, fosfolipidlerin ester bağlarını hidroliz edebilen, hidrolitik enzimlerin bir sınıfıdır. **Şekil 2.11**'de görüldüğü gibi, fosfolipazlar (PL), fosfolipidin etki ettikleri bölgesine göre, fosfolipaz A1, A2, B, C ve D olarak sınıflandırılırlar [31].



Şekil 2.11 : Fosfolipazların çalışma mekanizması [31].

Örneğin, fosfolipaz A1 enzimi, fosfolipidin gliserin kısmının 1. pozisyonundaki hidroksil grup ile yağ asidi arasındaki ester bağının hidrolizini katalizleyip, bir yağ asidi molekülü çıkararak fosfolipidi suda çözünen lizofosfolipide dönüştürür. Bu reaksiyon **Şekil 2.12**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.12 : Fosfolipidin enzimatik hidrolizi [34,35].

Enzimatik yolla yapışkan maddeleri giderme yönteminde kullanılan başlıca enzimler fosfolipaz A1 (Lecitase® Novo ve Ultra), fosfolipaz A2 (Lecitase® 10L, Rohalase MPL, LysoMax®), fosfolipaz C (Purifine®) enzimleridir [36].

EnzyMax® prosesinde ilk kullanılan enzim domuz pankreasından elde edilen fosfolipaz A2 (Lecitase® 10L) enzimidir. Ancak enzim kaynağının sınırlı olması,

optimum pH değerinin yüksek olması, kofaktör olarak kalsiyum iyonlarının gerekmesi, dini olarak helal/koşer kabul edilmemesi gibi nedenlerle yerini mikrobiyal enzimlere bırakmıştır. *Fusarium oxysporum*'den elde edilen Lecitase® Novo ve *Thermomyces lanuginosus*/*F. oxysporum*'den elde edilen Lecitase® Ultra sırasıyla EnzyMax® prosesinde kullanılan mikrobiyal enzimlerdir [26].

Fosfolipaz A1 ve A2'ye alternatif olarak geliştirilen bir diğer enzim ise, Diversa/Verenium şirketi tarafından Purifine® adı ile 2007 yılında piyasaya sürülen fosfolipaz C (PLC) enzimidir. PLC, fosfatidilkolin ve fosfatidil etanolamindeki fosfat-gliserin bağının hidrolizini katalizleyerek, yağda çözünen diaçilgliserol ve suda çözünen kolin ve etanolaminin fosfat esterlerine dönüştürür. PLA1 ve A2 enzimlerinin fosfolipidleri hidrolizi sonucu oluşan serbest yağ asitleri ileriki rafinasyon basamaklarında özellikle koku giderme aşamasında kaybolurken, diaçilgliseroller yağda kalarak yağ verimini artırır. PLC'nin dezavantajı ise, tüm fosfolipidler üzerinde etkili olmayıp, yalnız fosfatidil kolin ve fosfatidil etanolamin üzerinde etkili olması, fosfatidil inositol, fosfatidik asit ve onun suda çözünmeyen tuzlarının hidrolizini katalizlememesidir. Bu sebeple, bu enzim fiziksel rafinasyona tabi tutulabilecek kadar düşük miktarda fosfor ve metal içeren yağ elde etmek için yeterli değildir. Bunu aşmanın bir yolu ise iki enzimi birlikte kullanarak, enzimlerin performansını arttırmaktır. Dayton'un bu konuda yaptığı bir çalışmada PLA1 ve PLC'yi birlikte kullanarak ham yağın fosfor içeriğini 500 ppm'den 2 ppm'e düşürürken, tek başına PLA1 kullanıldığında %97,4 olan yağ verimini de %98,3'e yükseltmiştir [36,37,38,39].

Bitkisel yağlardan yapışkan maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılan bir diğer enzim ise, Danisco A/S tarafından LysoMax® adı ile üretilen, PLA2 aktiviteli lipid açıl transferaz (LAT) enzimidir. Bu enzim fosfolipid molekülünün 2. pozisyonundaki bir yağ asidinin, yağda bulunan serbest sterol veya stanole transferini katalizler. Eğer ortamda yeterli miktarda serbest sterol veya stanol yoksa serbest yağ asitleri oluşur. PLA1 ve PLA2 enziminde olduğu gibi, LAT enzimi de yağda bulunan bütün fosfolipidlere etki eder ve onları lizofosfolipidlere dönüştürür. Böylece düşük fosfor içeriği sağlanırken, yağ kaybı da azalır. Ayrıca serbest yağ asitlerinin sterollere tutunarak yağda kalmasıyla, daha yüksek yağ verimi sağlanırken koku giderme aşamasında serbest sterollerin kaybı da azaltılır [37,38].

2.3.3.1 Literatürde enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi üzerine yapılmış çalışmalar

Enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi üzerine yapılan çalışmalar genellikle, yeni enzimlerin geliştirilmesi ve yağdaki fosfor içeriğini azaltmak için optimum proses şartlarının bulunması üzerine yoğunlaşmıştır [40].

Clausen'ın 2001'de yaptığı çalışmada Lecitase® Novo ve Lecitase® 10L enzimleri varlığında kolza yağından yapışkan maddelerin giderilmesi üzerine deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, fosfolipaz A1 tipi olan Lecitase® Novo enziminin optimum çalışma pH'nın 5 olduğu, optimum sıcaklığının da 40-45°C aralığında olduğu bulunmuştur. Yapılan deneyler mikrobiyal Lecitase® Novo'nun domuz pankreasından elde edilen Lecitase® 10L ve diğer fosfolipazlardan daha etkili olduğunu, daha az suda, daha düşük pH ve sıcaklıklarda çalışabildiğini göstermiştir. Çalışmada ayrıca HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) ile yapılan analizlerde Lecitase® Novo'nun daha çok yağ fazındaki fosfolipidleri hidrolizlediği görülürken, Lecitase® 10L'nin sulu fazdaki fosfolipidleri tercih ettiği belirtilmiştir [2].

Roy ve arkadaşları 2002 yılında Lecitase® Novo enzimi varlığında, ham ve ön hidrasyon yöntemi uygulanmış pirinç kepeği yağlarından fosfolipidlerin giderilmesi üzerine çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. 4 saat süren fosfolipid giderme işleminden sonra yağlara ağartma toprağı ile renk açma işlemi uygulanmıştır. Ham yağdaki (403 ppm) ve ön hidrasyon yöntemi uygulanmış yağdaki (60 ppm) fosfor değerleri, sırasıyla 16 ve 15 ppm'e düşmüştür. Renk açma işleminden sonra ise fosfor seviyesi her iki yağda da yaklaşık 2 ppm civarında bulunmuştur [41].

Yang ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada ise yeni bir mikrobiyal enzim olan Lecitase® Ultra'nın fosfolipid giderimi üzerine etkisi incelenmiştir. Asidik ortamda oldukça aktif olan Lecitase® Ultra en yüksek aktiviteyi pH 5'te göstermiştir. Hem fosfolipidlere hem de triağılgiserollere etki gösteren enzimin, sıcaklık 40°C'nin altında iken lipaz aktivitesinin, 40°C'nin üzerinde iken fosfolipaz aktivitesinin baskın olduğu görülmüştür. 50°C sıcaklıkta kolza ve soya yağlarına uygulanan enzimatik yapışkan madde giderme işlemiyle içerdikleri fosfor miktarları 5 saat sonunda sırasıyla 123,1 ve 150,4 ppm'den, 8 ve 6 ppm'e düşmüştür [32].

Yang ve arkadaşları tarafından aynı yıl yapılan diğer bir çalışmada ise kolza yağına Lecitase® Ultra enzimi kullanılarak yapışkan madde giderme işlemi uygulanmıştır. Yapışkan madde giderme prosesinde etkili olan enzim miktarı, sıcaklık ve pH gibi parametrelerin optimizasyonu tepki yüzey yöntemi kullanılarak yapılmıştır. En uygun enzim miktarı 39,6 mg/kg, sıcaklık 48,3°C, pH ise 4,9 olarak bulunmuş, bu koşullar altında, kolza yağının fosfor miktarının 3,1 mg/kg'a düşebileceği hesaplanmıştır. Bu tahmini değeri doğrulamak için, aynı koşullar altında gerçekleştirilen deney sonucunda da elde edilen kolza yağının fosfor içeriği 3,3 mg/kg elde edilmiştir. Ayrıca çalışmada, yapışkan madde gidermede pH'ın önemli bir etken olduğu, 4,6-5,1 pH aralığında kolza yağının fosfor miktarının fiziksel rafinasyon için istenen 10 mg/kg'ın altına inebileceği belirtilmiştir [42].

Jahani ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada ise tepki yüzey yöntemi kullanılarak, pirinç kepeği yağı için enzimatik yapışkan madde giderme prosesinin optimizasyonu yapılmıştır. Optimum çalışma şartlarını bulmak için reaksiyon süresi, enzim miktarı, eklenen su miktarı ve sıcaklığın prosese etkisi incelenmiştir. Yapılan hesaplama sonunda optimum reaksiyon süresi 4,07 saat, enzim miktarı 50 mg/kg, eklenen su miktarı 1,5 mL/100 g, sıcaklık ise 49,2°C olarak bulunmuştur. Bu optimum koşullarda pirinç kepeği yağının fosfor miktarı 8,86 mg/kg, serbest yağ asidi değeri ise oleik asit cinsinden 2,01 g/100 g olarak hesaplanmıştır [43].

Yang ve arkadaşları 2008 yılında yürüttükleri bir diğer çalışmada, mikrobiyal fosfolipaz A1 enzimi varlığında, günlük 400 ton kapasitesi olan soya yağı rafinasyon prosesi için uygun koşulları belirlemişlerdir. Tank içerisindeki ham soya yağı önce 30 dakika sitrik asit ile karıştırılmıştır. Bu aşamada yağın fosfor içeriği 121,5 mg/kg'dan 61,2 mg/kg'a düşmüştür. Daha sonra uygun miktarda enzim ilave edilmiştir. 4,8-5,1 pH aralığında 6 saat süren enzimatik reaksiyondan sonra yağın fosfor içeriği 10 mg/kg'ın altına inmiştir. Bu değer renk açma işleminden sonra 3 mg/kg seviyelerine, koku giderme işleminden sonra ise 1-2 mg/kg seviyelerine düşmüştür. Diğer taraftan santrifüjle yağ ve yapışkan maddeler kolayca birbirinden ayrılmış ve yağ kaybı asidik yönteme göre oldukça azalmıştır. Asidik yöntemde elde edilen yapışkan maddeler kırmızı-siyah renginde ve viskoz bir yapıda iken, enzimatik yöntemde elde edilen yapışkan maddelerin açık sarı renkte ve iyi kalitede olduğu görülmüştür. Ayrıca çalışmada, elde edilen yapışkan madde fazındaki

fosfolipid bileşikleri Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometresi ile analiz edilmiş, elde edilen fosfolipidlerin %54,3'ünün lizofosfolipid, %45,7'sinin ise gliserofosfolipidden oluştuğu görülmüştür. Gliserofosfolipidlerin daha hidrofilik yapıda olmasının, yağ ve su fazının kolayca ayrılmasını ve yağ kaybının daha az olmasını sağladığı, bu sebeple başarılı bir yapışkan madde giderme prosesinin gliserofosfolipid üretimi ile yakından ilgili olduğu çalışmada belirtilmiştir [40].

Sheelu ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada, jelatin hidrojel içinde immobilize edilmiş Lecitase (fosfolipaz A1) enziminin, pirinç kepeği yağından yapışkan maddelerin giderilmesi üzerine etkisi incelenmiştir. Serbest enzimin aktif olduğu pH aralığı 6,5-8 iken, immobilize edilmiş enzimin optimum pH'ı 7,5 olarak bulunmuştur. Serbest halde iken optimum sıcaklık aralığı 37°C iken bu değerin immobilize enzimde 50°C'ye yükseldiği belirlenmiştir. Bioreaktörde pirinç kepeği yağına uygulanan yapışkan madde giderme işlemi sonunda, immobilize enzim, aktivitesini kaybetmeden 6 kez geri dönüşümlü olarak kullanılmış ve her seferinde yağın fosfor içeriği 400 ppm'den 2 saat sonunda 50-70 ppm aralığına indirilebilmiştir. Renk açma işleminden sonra ise fosfor miktarı 5 ppm'in altına düşürülmüştür. Ekonomik olarak bakıldığında, immobilizasyon işleminin maliyetli olarak görüldüğü ancak enzimin tekrar kullanılabilir olmasının bu maliyeti telafi ettiği, ayrıca daha etkili reaktör tasarımı ve proses kontrolü ile, toplam proses süresinin azalabileceği ve böylece bu yöntemin daha ekonomik olacağı çalışmada belirtilmiştir [44].

Sarode ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada, 3. jenerasyon olan fosfolipaz A1 (Lecitase® Ultra) enzimini, farklı kalitedeki ham pirinç kepeği yağlarından yapışkan madde giderme işleminde kullanmışlardır. Önceden hidrasyon yöntemi uygulanmış pirinç kepeği yağına yapışkan madde giderme işlemi uygulandığında, 5 saat sonunda fosfor miktarı 8,9 mg/kg seviyelerine düşerken, önceden asidik yöntem uygulanmış pirinç kepeği yağına aynı işlem uygulandığında ise, fazla gelen asit fosfolipaz enzimini inhibite ettiğinden, fosfor miktarı 31 mg/kg'da kalmıştır. Çalışmada ayrıca, enzimatik yapışkan madde giderme işlemi çözücü fazında da gerçekleştirilmiştir. Çözücü ekstraksiyonu sonunda elde edilen çözücü-yag karışımı direkt olarak yapışkan madde giderme işlemine tabi tutulduğunda yağ kaybı azalacak, verim artacaktır. Hekzan ve petrol eterinin çözücü olarak kullanıldığı çalışmalarda, düşük su seviyelerinde (%2) nonpolar çözücü ile su

fazı arasında yeterli temas kurulamadığından fosfolipid miktarında bir azalma görülmemiştir. Su seviyesi %20'ye arttırıldığında fosfor miktarı 71 mg/kg'a düşmüş ancak yağ fazında gerçekleştirilen yapışkan madde giderme işleminin performansına ulaşılammıştır [45].

Jiang ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada, bir bitkisel yağ fabrikasının yakınındaki topraktan ayrıştırılmış *Pseudomonas fluorescent* BIT-18'den elde edilen fosfolipaz B'nin (PLB) farklı yağlardaki yapışkan madde giderme işlemindeki etkisini araştırmışlardır. PLB, fosfolipazdaki her iki açıl grubunun hidrolizini katalizleyerek, lizofosfolipidlerden daha hidrofilik ve santrifüjle daha kolay bir şekilde ayrılabilen fosfogliseratları oluşturur. 40°C'de yapılan deneyler sonucunda ham soya, kolza ve yerfıstığı yağlarının fosfor içerikleri 4 saat sonunda 10 mg/kg'ın, 5 saat sonunda ise 5 mg/kg'ın altına inmiştir. Çalışmada ayrıca PLB enziminin lipaz aktivite göstermediği ve bu sebeple serbest yağ asitlerinin oluşumunun sadece fosfolipidlerin hidrolizinden kaynaklandığı belirtilmiştir [31].

Jiang ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise *Pseudomonas fluorescens* BIT-18'den elde edilen PLB enzimi varlığında soya yağı için enzimatik yapışkan madde giderme işleminin optimizasyonu yapılmıştır. En uygun sıcaklık, pH ve PLB miktarı gibi parametrelerin bulunması için merkezi birleşik tasarım ve regresyon analizi ile birleştirilmiş tepki yüzey yöntemi kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda bulunan optimum sıcaklık değeri 40°C, pH değeri 4,7, PLB miktarı ise 500 U/kg bulunmuş, bu optimum koşullar uygulandığında kalan fosfor içeriğinin ise 5,3 mg/kg olacağı hesaplanmıştır. Aynı optimum koşullar altında soya yağına yapışkan madde giderme işlemi uygulanmış ve fosfor seviyesi 4,9 mg/kg bulunarak, tahmin edilen değerle uyumlu olduğu gösterilmiştir [3].

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda ham pamuk yağından enzimatik yöntemle fosfolipid giderilmesi üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu çalışmada, ham pamuk yağından farklı yöntemlerle fosfolipidlerin giderilmesi amacıyla deneyler gerçekleştirilmiş, en uygun yöntem ve en uygun reaksiyon parametreleri belirlenmiştir.

3.1 Kullanılan Malzemeler

Çalışmada kullanılan ham pamuk yağı Emeksizler Nebati Yağ San. Tic. Ltd. Şirketi (Adana), Lecitase® Ultra A1 enzimi Novozymes A/S (Bagsvaerd, Danimarka), çözücüler ve diğer kimyasal maddeler ise Merck (Darmstadt, Almanya), Sigma Aldrich (Taufkirchen, Almanya) ve Riedel-de Haen (Seelze, Almanya) firmalarından temin edilmiştir. Kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Lecitase® Ultra A1 enzimi, *Aspergillus oryzae* adlı mantarın fermantasyonu ile üretilen *Thermomyces lanuginosus/Fusarium oxysporum*'den üretilmiş olup aktivitesi 10 KLU/g olarak bildirilmiştir. Kahverengi ve sıvı haldedir [46].

3.2 Kullanılan Yöntemler

3.2.1 Pamuk yağının yağ asidi bileşiminin belirlenmesi

Deneysel çalışmada kullanılan ham pamuk yağının yağ asidi bileşimi, kapiler gaz kromatografi (GC) cihazı ile belirlenmiştir. Bu amaçla, AOCS (American Oil Chemists' Society) Ce 2.66 metoduna göre ham pamuk yağının metil esterleri hazırlanmış ve Hewlett-Packard 5890 Seri II (Hewlett-Packard, Waldron, Almanya) gaz kromatografi cihazı yardımıyla bileşimi belirlenmiştir [47].

Kromatogramlarda oluşan pikler, piklere ait alıkonma zamanlarının aynı cihaz ve koşullarda analiz edilen standart yağ asitlerinin metil ester karışımının alıkonma zamanları ile karşılaştırılmasıyla, tespit edilmiştir. Her yağ asidine ait pik alanının, toplam pik alanına bağlı yüzdesinden, pamuk yağının yağ asidi bileşimi hesaplanmıştır. Uygulanan kromatografik analiz koşulları **Çizelge 3.1**'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 : Gaz kromatografisi analiz koşulları.

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

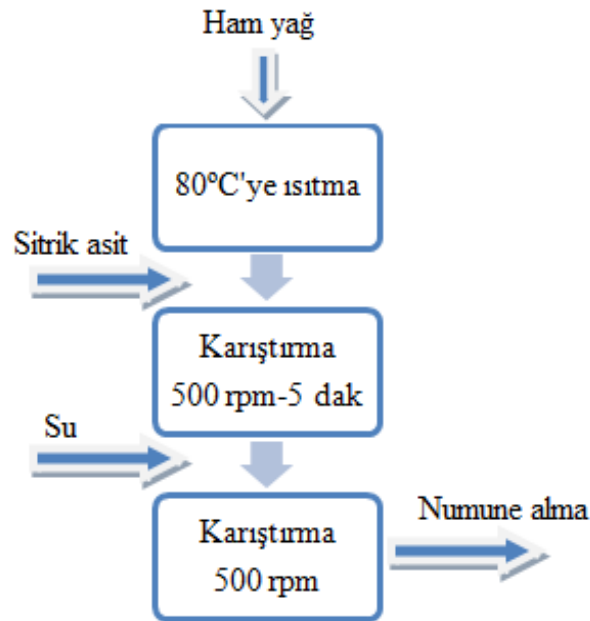
(1) Alev iyonizasyon dedektörü

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

3.2.2 Ham pamuk yağından fosfolipidlerin giderilmesi

3.2.2.1 Asidik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi

Ham pamuk yağından fosfolipidlerin uzaklaştırılması amacıyla önce asidik yöntem ile deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 250 mL’lik dibi düz bir balon içerisine 75 gram ham pamuk yağı tartılmış; balon, sıcaklık ve karıştırıcı hızı kontrol edilen manyetik karıştırıcılı ısıtıcı üzerine yerleştirilmiş su banyosuna konulmuştur. **Şekil 3.1**’de uygulanan asidik yöntemin akım şeması görülmektedir.



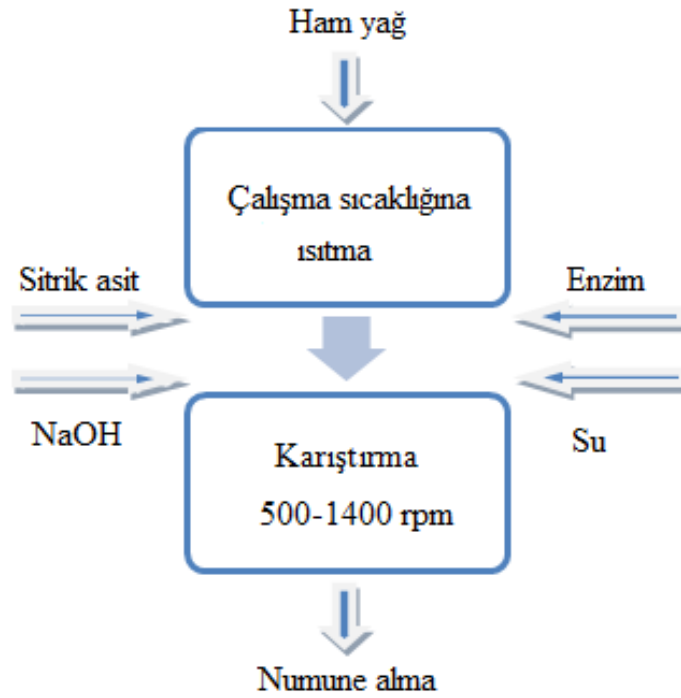
Şekil 3.1 : Asidik yöntemle fosfolipid gideriminin akım şeması.

Reaksiyon sıcaklığı 80°C’de sabitlenerek, balonun içine yağın %0,3’ü oranında sitrik asit çözeltisi (45 gram/100 mL) eklenmiştir. 500 rpm karıştırma hızında 5 dakika karıştırıldıktan sonra reaksiyon balonuna yağın %2’si oranında su eklenmiş, aynı karıştırma hızında reaksiyon devam ettirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında, reaksiyon balonundan 5’er mL numuneler santrifüj tüpüne alınmış, 4000 rpm’de 1 saat süreyle santrifüj edildikten sonra ayrılan üst faz analiz için ayrı bir deney tüpüne alınmıştır.

3.2.2.2 Enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi

Ham pamuk yağından fosfolipidlerin uzaklaştırılması amacıyla, Lecitase® Ultra A1 enzimi yardımıyla deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla yapılan literatür araştırmaları sonucunda, enzimatik olarak fosfolipidlerin uzaklaştırılmasında uygulanmış iki yöntemle karşılaşılmıştır. Bu çalışmada bu iki yöntem de uygulanıp karşılaştırılarak en uygun yöntem belirlenmiştir.

Ham pamuk yağından enzim kullanımıyla fosfolipidlerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan yöntemlerden ilki, Carelli ve arkadaşlarının uyguladıkları, enzim ve diğer tüm reaktanların aynı çalışma sıcaklığında ilave edildiği yöntemdir [24]. **Şekil 3.2**’de uygulanan enzimatik yöntemin akım şeması verilmiştir.

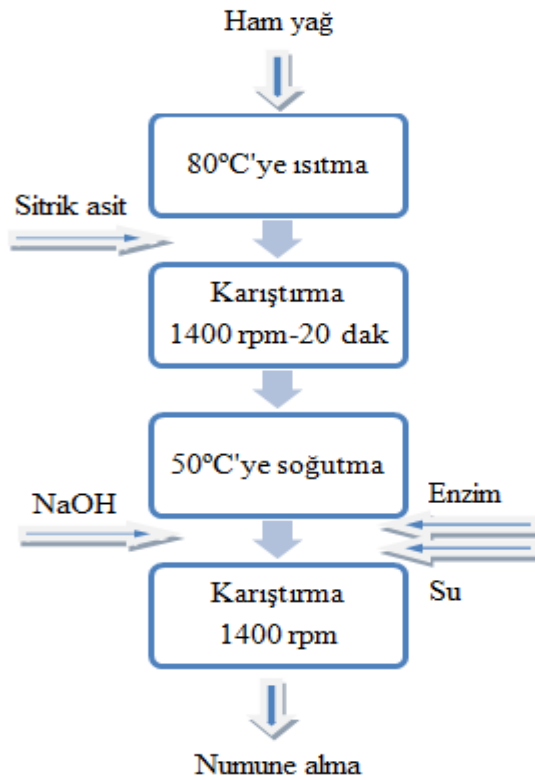


Şekil 3.2 : Enzimatik yöntemle fosfolipid gideriminin akım şeması.

Bu amaçla, 250 mL'lik dibi düz bir balon içerisine 75 gram ham pamuk yağı tartılmış, balon sıcaklık ve karıştırıcı hızı kontrol edilen manyetik karıştırıcılı ısıtıcı üzerine yerleştirilmiş su banyosuna konulmuştur. Yağın sıcaklığı, çalışma sıcaklığında sabitlenerek, içine sırasıyla sitrik asit çözeltisi (45 g/100 mL), pH'ını ayarlamak için uygun miktarda NaOH çözeltisi (4 g/100 mL), enzim ve su konulmuştur. Karıştırma hızı tüm reaksiyon boyunca sabit tutularak, reaksiyon 3 saat devam ettirilmiş ve belirli zaman aralıklarında santrifüj tüplerine 5'er mL numuneler alınmıştır. Numuneler, enzimi inaktif etmek için 90°C'deki su banyosunda 10 dakika tutulmuş, enzim ve fosfolipidleri içeren su fazını, yağ fazından ayırmak için 4000 rpm'de 1 saat süreyle santrifüj edilmiştir. Faz ayırımından sonra üst yağ fazı ayrı bir tüpe alınmıştır.

3.2.2.3 EnzyMax® yöntemi ile fosfolipidlerin giderilmesi

Enzimatik yolla yağdaki fosfolipidleri uzaklaştırmak amacıyla ilk geliştirilen yöntem Alman Lurgi firması tarafından geliştirilen EnzyMax® yöntemidir. Çalışmada ham pamuk yağından fosfolipidleri enzimatik olarak uzaklaştırmak amacıyla EnzyMax® yöntemine göre de deneyler yürütülmüştür. **Şekil 3.3**'de uygulanan EnzyMax® yönteminin akım şeması verilmiştir.



Şekil 3.3 : EnzyMax® yöntemi ile fosfolipid giderimi akım şeması.

Bu amaçla, 75 gram ham pamuk yağı 250 mL’lik dibi düz bir balon içine tartılıp, sıcaklık ve karıştırıcı hızı kontrol edilen manyetik karıştırıcılı ısıtıcı üzerine yerleştirilmiş 80°C’deki su banyosuna konulmuştur. Reaksiyon balonuna literatür değerleri temel alınarak yağın kütlece %0,15’i oranında sitrik asit çözeltisi (45 gram/100 mL) eklenmiş, reaksiyon 1400 rpm’de 20 dakika devam ettirilmiştir. Reaksiyon sıcaklığı, istenen çalışma sıcaklığına (50°C) düşürülerek reaksiyon karışımına pH’ı ayarlamak için uygun miktarda NaOH (4 gram/100 mL), uygun miktarda enzim ve yağın kütlece %2’si oranında su ilave edilmiştir. Karıştırma hızı 1400 rpm’de sabit tutularak reaksiyon 3 saat süre ile devam ettirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında alınan numuneler, enzimi inaktif etmek için 90°C’deki su banyosunda 10 dakika tutulup, 4000 rpm’de 1 saat süreyle santrifüj edilmiş, üst yağ fazı ayrı bir deney tüpüne alınmıştır.

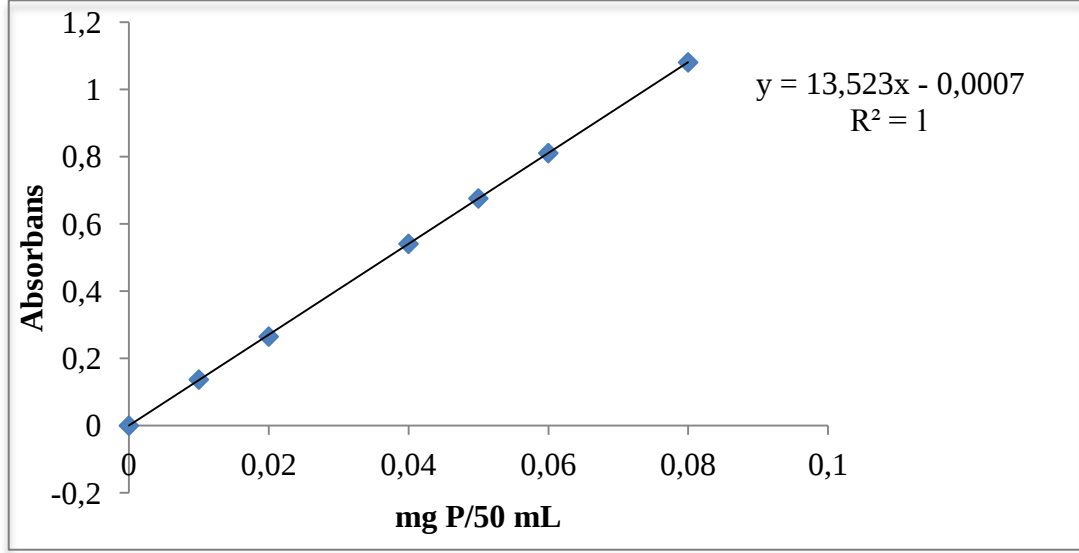
pH belirleme: Enzimle yürütülen çalışmalarda ortamın pH’ını belirlemek için 25 mL reaksiyon karışımı santrifüj tüpüne alınmış, üzerine 25 mL distile su ilave edilmiştir. 4000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiş, faz ayrımı gerçekleştikten sonra üst faz atılarak, alttaki su fazının pH’ı, pH metre ile ölçülmüştür. **Denklem 3.1**’de verildiği gibi ölçülen değerden seyreltme faktörü çıkarılarak, reaksiyonun gerçek pH’ı bulunmuştur. Seyreltme faktörü pamuk yağı için 0,5 olarak bulunmuştur [43].

$$pH_{\text{gerçek}} = pH_{\text{ölçülen}} - 0.5 \quad (3.1)$$

3.2.3 Pamuk yağının fosfor içeriğinin belirlenmesi

Deneysel çalışmada kullanılan ham pamuk yağının ve reaksiyon ürünlerinin fosfor içerikleri AOCS Ca 12-55 metoduna göre belirlenmiştir. Bu metot, numunelerin magnezyum oksit varlığında yakılması ve mavi fosfomolibdik kompleks haline getirilen fosforun spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır. Oluşan çözeltinin mavi rengi, yağın içerdiği fosfor miktarıyla orantılı olarak değişmektedir. Bu amaçla, yüksek ısıya dayanıklı kroze içerisinde, 0,1 gram magnezyum oksit bek alevinde 5-10 dakika ısıtıldıktan sonra içine 0,5-2 gram yağ eklenmiş, yağ kömür haline gelene kadar bek alevinde yakıldıktan sonra, muffle fırında 875°C’de 2 saat yakılarak beyaz kül haline getirilmiştir. Külün fosfor içeriğini belirlemek için AOCS Ca 12-55 metoduna göre hazırlanan çözelti küvete alınarak, Jenway 6700 model spektrofotometre’de, en yüksek pikin gözlemlendiği 830 nm’de absorbands değeri okunmuştur. Okunan absorbands değerine karşılık gelen fosfor miktarını bulabilmek

için öncelikle standart zelteler hazırlanıp aynı metoda göre aynı dalga boyunda absorbanları okunmuştur. Her standardın mg olarak içerdiği fosfor miktarına karşı absorban grafiğı çizilerek, kalibrasyon eğırisi oluşturulmuştur [48]. **Şekil 3.4**'te standart zeltelerin absorbanlarına göre oluşturulan kalibrasyon eğırisi görülmektedir.



Şekil 3.4 : Yağların fosfor içeriğini belirlemek için kullanılan kalibrasyon eğırisi.

Yağın ve şahit numunenin absorbanlarına karşılık kalibrasyon eğırisinden fosfor miktarları bulunmuş, **denklem 3.2**'deki denkleme göre, yağ numunesinin fosfor miktarı mg/kg (ppm) olarak hesaplanmıştır:

$$\text{Fosfor miktarı, mg/kg} = (A-B) \cdot 10^4 / M \quad (3.2)$$

A = Yağ numunesinin fosfor miktarı, mg,

B = Şahit numunenin fosfor miktarı, mg,

M = Yağ numunesinin ağırlığı, g.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Ham Pamuk Yağının Karakterizasyonu

Deneysel çalışmada önce ham pamuk yağının yağ asidi bileşimi ve fosfor içeriği belirlenmiştir. Gaz kromatografi cihazı ile AOCS Ce 2.66 metoduna göre analiz edilen ham pamuk yağının yağ asidi bileşimi **Çizelge 4.1**'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : Ham pamuk yağının yağ asidi bileşimi.

Yağ asidi	Bileşimi (% ağırlık)
Miristik asit (14:0)	0,82
Palmitik asit (16:0)	24,41
Palmitoleik asit (16:1)	0,59
Stearik asit (18:0)	3,01
Oleik asit (18:1)	18,13
Linoleik asit (18:2)	52,08
Linolenik asit (18:3)	0,35
Araşidik asit (20:0)	0,43
Gadoleik asit (20:1)	0,18

Çizelge 4.1'den de görüldüğü gibi ham pamuk yağı yüksek miktarda linoleik asit (%52,08), oleik asit (%18,13) ve palmitik asit (%24,41) içerir. AOCS Ca 12-55 metoduna göre yapılan analiz sonucunda ham pamuk yağının fosfor içeriği ise 845,58 ppm olarak bulunmuştur. Deneysel çalışmada kullanılan ham pamuk yağının yağ asidi bileşimi ve fosfor içeriği, literatürde verilen değerlerle uyumluluk göstermektedir.

4.2 Asidik Yöntemle Ham Pamuk Yağından Fosfolipidlerin Giderilmesi

Ham pamuk yağından fosfolipidleri uzaklaştırmak amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda önce asidik yöntem uygulanmıştır. 80°C'de yağın kütlece %0,3 oranında sitrik asit ilavesiyle başlatılan reaksiyon ortamından belirli zaman aralıklarında alınan yağ numunelerinin fosfor içerikleri **Çizelge 4.2**'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 : Ham pamuk yağından asidik yöntemle fosfolipid giderilmesinde, yağın fosfor içeriğinin zamana göre değişimi (Karıştırma hızı: 500 rpm, Asit miktarı: 0,2 mL, Su miktarı: 1,5 mL, Reaksiyon sıcaklığı: 80°C).

Zaman (dakika)	Fosfor Miktarı (ppm)
0	845,58
10	284,16
30	221,00
60	214,80
120	265,88
180	357,35

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi 10. dakikada pamuk yağının fosfor içeriği, 845,58 ppm’den 284,16 ppm’e düşmüştür. En düşük değere 1 saat sonunda (214,80 ppm) ulaşılmış ancak 1 saatten sonra fosfor miktarında tekrar artma görülmüştür. Bunun işlem sırasında ortam pH’nın düşmesi ve bu nedenle hidrate olamayan fosfatidik asidin yeniden oluşması ile ortamın fosfor içeriğinin artmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür [26]. Sitrik asit yöntemi ile pamuk yağının fosfor içeriği yemeklik yağlar için istenen değerin oldukça üstünde kalmıştır.

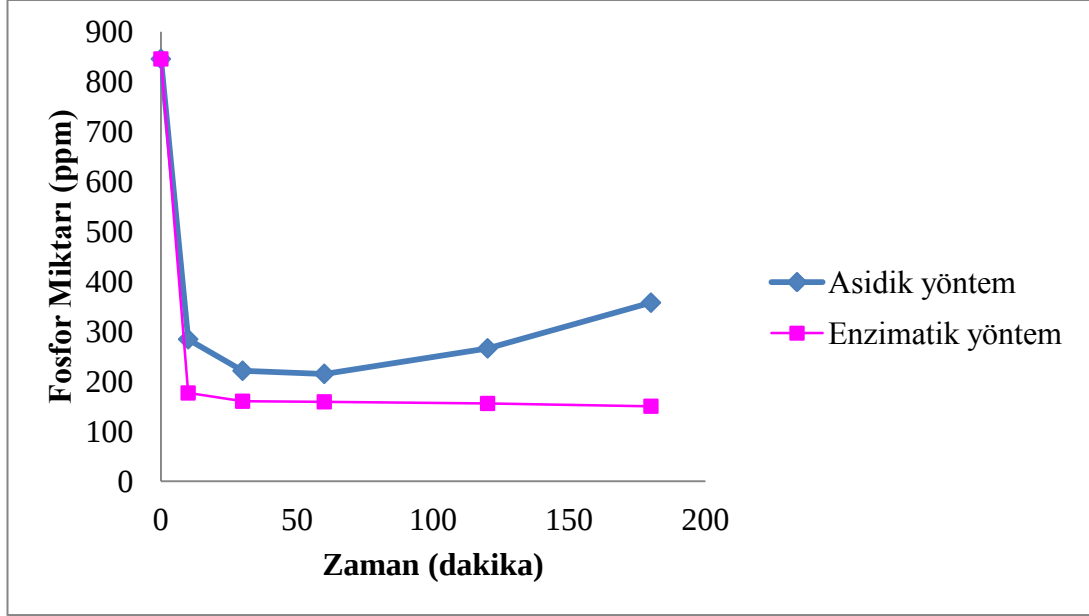
4.3 Enzimatik Yöntem ile Ham Pamuk Yağından Fosfolipidlerin Giderilmesi

Çalışmada ham pamuk yağından fosfolipidleri gidermek amacıyla asidik yöntemden sonra enzim ve diğer reaktanların aynı çalışma sıcaklığında sırasıyla katıldığı enzimatik yöntemle deneyler yürütülmüştür. 0,5 mL enzim kullanılarak 500 rpm karıştırma hızında enzimatik deneyler başlatılmıştır. Sıcaklık, asit miktarı, su miktarı gibi parametreler ise daha önce yapılmış çalışmalara uygun olarak seçilmiştir [42]. Belirli zaman aralıklarında alınan numunelerin fosfor içerikleri Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.3 : Ham pamuk yağından enzimatik yöntemle fosfolipid giderilmesinde yağın fosfor içeriğinin zamana göre değişimi (Karıştırma hızı: 500 rpm, Enzim miktarı: 0,5 mL, Su miktarı: 1,5 mL, Asit miktarı: 0,1 mL, Reaksiyon sıcaklığı: 50°C, pH:5,5).

Zaman (dakika)	Fosfor Miktarı (ppm)
0	845,58
10	176,48
30	159,89
60	158,70
120	155,44
180	149,92

3 saat sürdürülen enzimatik yöntemle, ham pamuk yağının fosfor içeriği, 10 dakika içinde 845,58 ppm'den 176,48 ppm'e düşmüş, sonra yavaş azalışlarla 149,92 ppm'e ulaşmıştır. Asidik ve enzimatik yöntemler sonucunda elde edilen pamuk yağlarının fosfor içerikleri **Şekil 4.1**'de karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.1 : Ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesinde kullanılan asidik ve enzimatik yöntemlerin zamana bağlı olarak fosfor içeriklerini karşılaştırılması.

Şekil 4.1'de de görüldüğü gibi asidik yöntemle 1 saat sonunda elde edilen pamuk yağındaki fosfor miktarı 214,80 ppm'e ulaşırken, enzimatik yöntemde 158,70 ppm'e düşmüştür ve asidik yöntemde olduğu gibi zamanla artış gözlemlenmemiş, 3 saat sonunda 149,92 ppm'e ulaşılmıştır. Enzimatik yöntem ile daha düşük fosfor içeriği elde edildiğinden, enzimatik yöntemin asidik yönteme göre daha uygun bir yöntem olduğu söylenebilir. Enzimatik yöntemle yapılan çalışmalarda pamuk yağının fosfor içeriği olması gereken sınır değerin (10 ppm) oldukça üzerinde çıktığından işlem parametrelerinin fosfor miktarı üzerine etkileri incelenmeye başlanmıştır.

4.4 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine Karıştırma Hızının Etkisi

Asidik yönteme göre daha iyi sonuç veren enzimatik yöntemde, fosfor miktarı istenen seviyelere inmemiştir. Bu nedenle yapılan literatür araştırmalarına dayanılarak karıştırma hızının da yağlardan fosfolipidlerin uzaklaştırılmasında etkili

olabileceği düşünülerek, aynı koşullar altında karıştırma hızı arttırılarak deneyler gerçekleştirilmiştir. 500 rpm ve 1400 rpm karıştırma hızlarında 0,5 mL enzim kullanılarak yürütülen çalışmalardan elde edilen sonuçlar **Çizelge 4.4**'te ve **Ek-A.1'de Şekil A.1**'de verilmiştir.

Çizelge 4.4 : Ham pamuk yağından enzimatik yöntemle fosfolipid giderilmesine karıştırma hızının etkisi (Enzim miktarı: 0,5 mL, Su miktarı: 1,5 mL, Asit miktarı: 0,1 mL, Reaksiyon sıcaklığı: 50°C, pH:5,5).

Zaman (dakika)	Fosfor Miktarı (ppm)	
	500 rpm	1400 rpm
0	845,58	845,58
10	176,48	157,12
30	159,89	155,91
60	158,70	151,81
120	155,44	136,57
180	149,92	128,19

Karıştırma hızı 500 rpm'den 1400 rpm'e çıkartıldığında ilk 10 dakika sonunda elde edilen pamuk yağının içerdiği fosfor miktarı 500 rpm'e göre yaklaşık 20 ppm'lik bir azalış sağlayarak, 176,48 ppm'den 157,12 ppm'e düşmüştür. Aynı şekilde 500 rpm karıştırma hızında 3 saat sonunda 149,92 ppm olan fosfor içeriği, 1400 rpm karıştırma hızında 128,19 ppm'e düşmüştür. Karıştırma hızının artması reaksiyon boyunca enzim içeren sulu fazın yağ faz içinde yayılmasını arttırmıştır. Böylece fosfolipidlerle enzim arasındaki temas artarak daha düşük fosfor içeriği sağlanmıştır [36]. Bu sebeple bundan sonraki çalışmalar 1400 rpm karıştırma hızıyla devam ettirilmiştir.

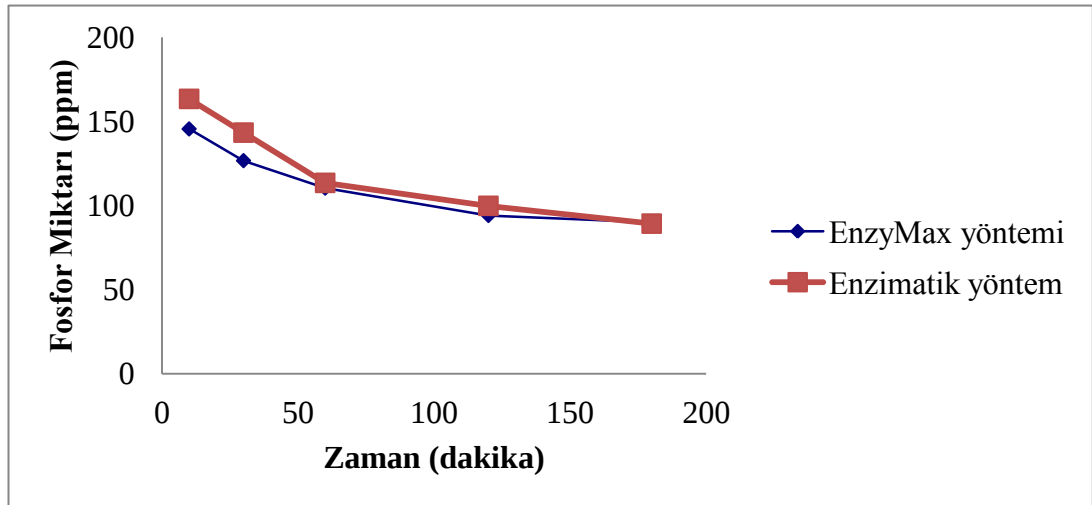
4.5 Ham Pamuk Yağından Fosfolipidlerin Giderilmesinde Kullanılacak Uygun Enzimatik Yöntemin Belirlenmesi

Ham pamuk yağından enzimatik olarak fosfolipidlerin giderilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda, farklı enzimatik yöntemlerin etkisini görmek amacıyla deneyler yapılmıştır. Enzimin etkisini daha iyi gözlemleyebilmek ve daha düşük fosfor içeriği sağlayabilmek için enzim miktarı 2 mL'ye çıkarılmıştır. Tüm reaktanların aynı çalışma sıcaklığında eklendiği enzimatik ve EnzyMax® yöntemleriyle yürütülen bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar **Çizelge 4.5**'te verilmiştir.

Çizelge 4.5 : Farklı enzimatik yöntemler sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi (Karıştırma hızı: 1400 rpm, Enzim miktarı: 2 mL, Su miktarı: 1,5 mL, Asit miktarı: 0,1 mL, Reaksiyon sıcaklığı: 50°C, pH:5,5).

Zaman (dakika)	Fosfor Miktarı (ppm)	
	Enzimatik yöntem	EnzyMax®
0	845,58	845,58
10	163,38	145,52
30	143,33	126,66
60	113,45	110,34
120	99,79	94,07
180	89,24	89,95

Ham pamuk yağından fosfolipidlerin giderilmesi amacıyla uygulanan enzimatik ve EnzyMax® yöntemlerinden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, ilk yarım saatlik sürede EnzyMax® yönteminin daha düşük fosfor içeriği sağladığı görülmüştür. EnzyMax® yönteminde asitle 20 dakikalık ön uygulama yapıldığından bu beklenen bir durumdur. Ancak 1 saat sonunda iki yöntem arasında çok önemli farklılıklar görülmemiş ve 3 saat sonunda iki yöntemde de yağın fosfor içeriği 89 ppm'e düşmüştür. **Şekil 4.2**'de enzimatik ve EnzyMax® yöntemleri karşılaştırılmıştır. Elde edilen bu sonuçlara dayanılarak, bütün reaktanların aynı sıcaklıkta prosese eklendiği enzimatik yöntem, hem daha basit, hem de enerji ve zaman bakımından daha ekonomik olduğundan, uygun yöntem olarak seçilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında ham pamuk yağının fosfor içeriğini 10 ppm'in altına düşürebilmek amacıyla, sırasıyla enzim, su, sitrik asit miktarları, sıcaklık ve pH gibi parametrelerin fosfor içeriğine etkileri incelenmiştir.



Şekil 4.2 : Farklı enzimatik yöntemlerle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi.

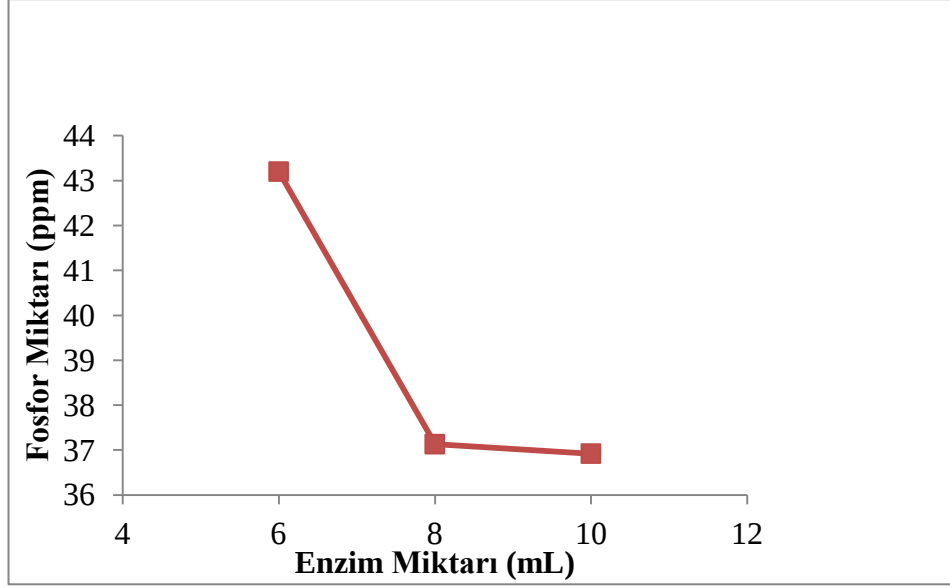
4.6 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine Enzim Miktarının Etkisi

Ham pamuk yağından enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesine enzim miktarının etkisini görmek amacıyla deneyler yapılmıştır. Bu amaçla, daha önceki deneylerde 1,5 mL su ve 2 mL enzim miktarı ile oldukça yüksek fosfor içerikleri elde edildiğinden ve yapılan birkaç ön deneme ile elde edilen fosfor içeriklerinin çok yüksek olmasından dolayı su miktarı 3 mL alınarak farklı enzim miktarlarında deneyler gerçekleştirilmiştir. 6, 8 ve 10 mL enzim miktarlarında gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar **Çizelge 4.6**'da ve **Ek-A.1**'de **Şekil A.2**'de verilmiştir.

Çizelge 4.6 : Farklı enzim miktarlarında gerçekleştirilen enzimatik yöntem sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi (Karıştırma hızı: 1400 rpm, Su miktarı: 3 mL, Asit miktarı: 0,1 mL, Reaksiyon sıcaklığı: 50°C, pH: 5,5).

Zaman (dakika)	Fosfor Miktarı (ppm)		
	6 mL	8 mL	10 mL
0	845,58	845,58	845,58
10	124,31	97,68	72,72
30	65,99	59,48	44,06
60	43,50	39,91	42,19
120	45,66	40,92	39,63
180	43,20	37,13	36,92

Çizelge 4.6 incelendiğinde, enzim miktarı arttıkça yağdaki fosfor miktarının düştüğü görülmektedir. 3 saatlik enzimatik uygulama sonucunda 6 mL enzim kullanıldığında 43,20 ppm fosfor içeren pamuk yağı elde edilirken, 8 mL enzim kullanıldığında 37,13 ppm, 10 mL enzim kullanıldığında ise 36,92 ppm fosfor içeren pamuk yağları elde edilmiştir. En düşük fosfor içeriği 10 mL enzim kullanıldığında elde edilmiştir. Ancak enzimler pahalı katalizörler olduğundan ve 8 mL ve 10 mL enzim kullanıldığında elde edilen yağların fosfor içerikleri birbirine yakın olduğundan bundan sonraki deneylerde uygun enzim miktarı 8 mL olarak alınmıştır. Farklı enzim miktarlarına göre 3 saatlik enzimatik uygulama sonucunda elde edilen yağların fosfor içerikleri **Şekil 4.3**'te gösterilmiştir.



Şekil 4.3 : Farklı enzim miktarlarına göre ham pamuk yağının fosfor içeriğinin değişimi (Enzimatik yöntem süresi: 3 saat).

4.7 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine Su Miktarının Etkisi

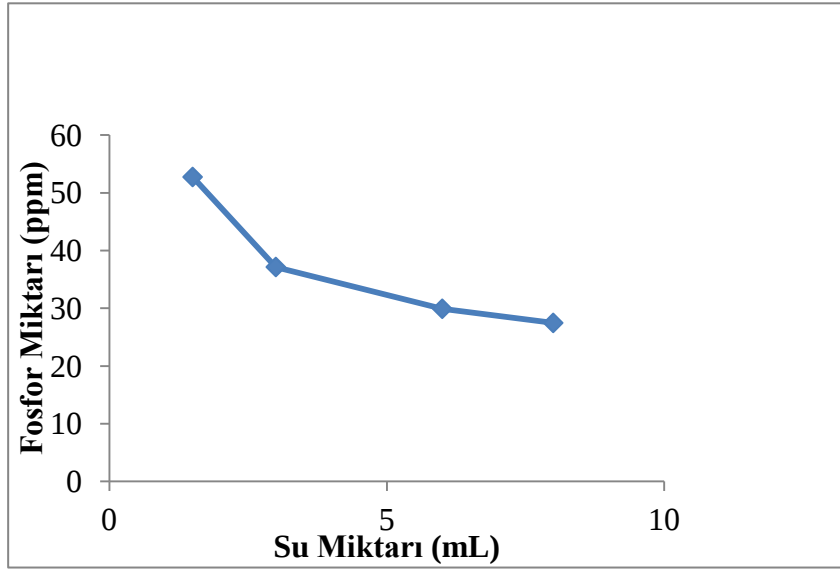
Ham pamuk yağında enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda, su miktarının etkisini görmek amacıyla deneyler yürütülmüştür. 8 mL enzim miktarında, 1,5, 3, 6 ve 8 mL su miktarlarında yürütülen çalışmalardan elde edilen sonuçlar **EK A.1’de Şekil A.3’de ve Çizelge 4.7’de** verilmiştir.

Çizelge 4.7 : Farklı su miktarlarında gerçekleştirilen enzimatik yöntem sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi (Karıştırma hızı: 1400 rpm, Enzim miktarı: 8 mL, Asit miktarı: 0,1 mL, Reaksiyon sıcaklığı: 50°C, pH:5,5).

Zaman (dakika)	Fosfor Miktarı (ppm)			
	1,5 mL	3 mL	6 mL	8 mL
0	845,58	845,58	845,58	845,58
10	132,85	97,68	98,00	103,62
30	75,25	59,48	62,29	58,19
60	61,72	39,91	39,78	39,29
120	61,20	40,92	32,03	32,98
180	52,72	37,13	29,89	27,44

Çizelge 4.7’den görüldüğü gibi pamuk yağının fosfor içeriği, su miktarının artışı ile ters orantılı olarak düşmüştür. Bunun nedeni fosfolipaz enziminin hidrolitik yapıda olması ve fosfolipidlerin hidrolizine suyun direkt olarak katılmasıdır [43]. Ayrıca

hidrate olabilen fosfolipidler yağdan su ile uzaklaştırıldığından, su miktarının artması ile daha çok hidrate olabilen fosfolipid yağdan giderilebilmiştir. 3 saat sonunda 1,5 mL su ile pamuk yağında kalan fosfor miktarı 52,72 ppm iken, su miktarı 6 mL'ye çıkartıldığında bu değer 29,89 ppm'e düşmüştür. Su miktarı 8 mL'ye arttırıldığında ise, kalan fosfor miktarlarında önemli bir değişiklik gözlemlenmediğinden en uygun su miktarı 6 mL olarak seçilmiştir. 6 mL su miktarı yağın %8'ine karşılık gelmektedir. Bu sonuç literatürde daha önce bulunmuş değerlere göre daha yüksek elde edilmiştir. Bu yağın fosfor içeriğinin çok yüksek olmasından ve yapısından kaynaklanıyor olabilir. Farklı su miktarlarına göre 3 saatlik enzimatik uygulama sonucunda elde edilen yağların fosfor içerikleri **Şekil 4.4**'te verilmiştir.



Şekil 4.4 : Farklı su miktarlarına göre ham pamuk yağının fosfor içeriğinin değişimi (Enzimatik yöntem süresi: 3 saat).

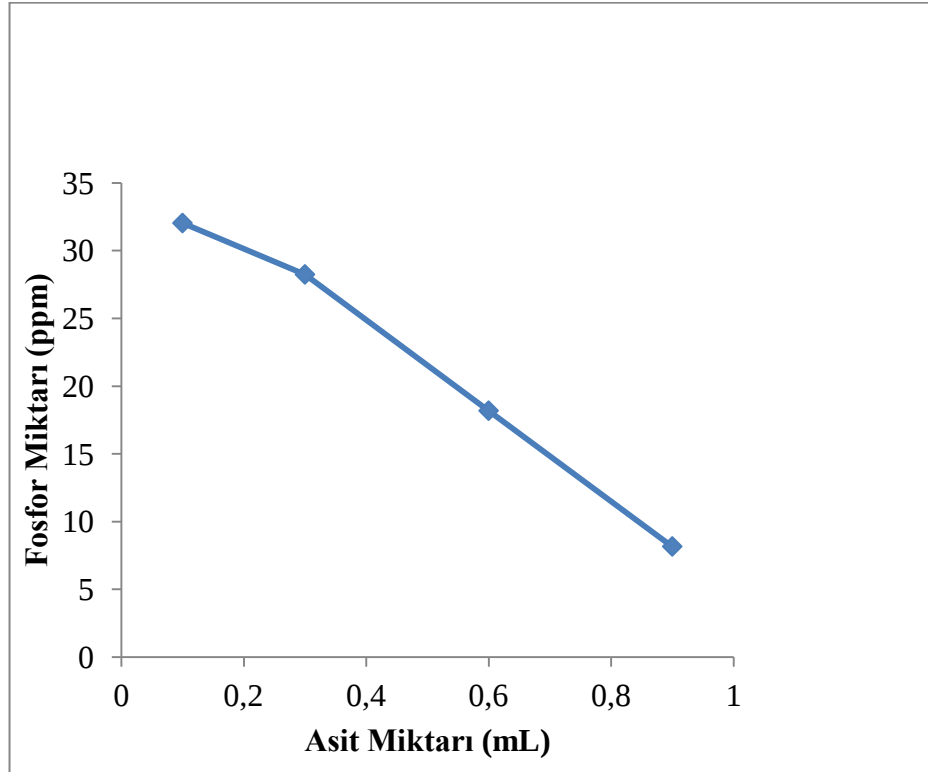
4.8 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine Asit Miktarının Etkisi

Ham pamuk yağından enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi amacıyla yapılan çalışmalarda literatürde önerilen 0,1 mL (yağın kütlece %0,15'i) sitrik asit kullanılarak deneyler yapılmıştır. Ancak 8 mL enzim, 6 mL su ile yapılan çalışmada elde edilen fosfor miktarı (29,89 ppm), yemeklik yağ için istenen değer üstünde kalmıştır. İşleme asit miktarının da etkisi olabileceği düşünülerek, asit miktarı 0.3, 0.6 ve 0.9 mL olarak değiştirilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar **EK A.1'de Şekil A.4'te ve Çizelge 4.8'de** verilmiştir.

Çizelge 4.8 : Farklı asit miktarlarında gerçekleştirilen enzimatik yöntem sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi (Karıştırma hızı: 1400 rpm, Enzim miktarı: 8 mL, Su miktarı: 6 mL, Reaksiyon sıcaklığı: 50°C, pH:5,5)

Zaman (dakika)	Fosfor Miktarı (ppm)			
	0,1 mL	0,3 mL	0,6 mL	0,9 mL
0	845,58	845,58	845,58	845,58
10	98,00	75,99	42,05	27,05
30	62,29	43,11	19,36	10,45
60	39,78	29,22	16,76	8,69
120	32,03	28,24	18,17	8,16
180	29,89	25,26	16,73	10,54

Çizelge 4.8’den görüldüğü gibi pamuk yağında kalan fosfor miktarı sitrik asit miktarı artışı ile ters orantılı olarak düşmüştür. 2. saat sonunda 0,1 mL sitrik asitle 32.03 ppm olan fosfor miktarı, asit değeri 0,9 mL’ye yükseltildiğinde 8,16 ppm’e düşmüştür. 3. saatte küçük bir yükselme göstermiştir. Sitrik asitteki artış yağdan daha fazla hidrate olamayan fosfolipidlerin Ca ve Mg tuzlarının uzaklaştırılmasını sağlayarak onların sulu faza geçirmesine sebep olmuştur [26]. Farklı asit miktarlarına göre 2 saatlik enzimatik uygulama sonucunda elde edilen yağların fosfor içerikleri Şekil 4.5’te verilmiştir.



Şekil 4.5 : Farklı asit miktarlarına göre ham pamuk yağının fosfor içeriğinin değişimi (Enzimatik yöntem süresi: 2 saat).

4.9 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine Sıcaklığın Etkisi

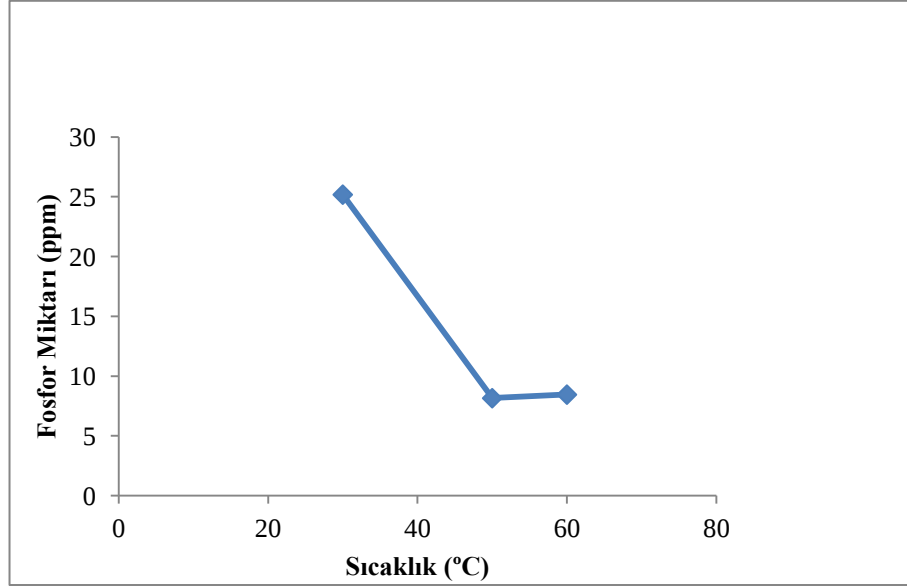
Proses sıcaklığı enzimatik işlemin maliyetini etkileyen önemli parametrelerden biridir. Ham pamuk yağında enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi amacıyla gerçekleştirilen deneylerde, en uygun sıcaklık değerini bulmak amacıyla 30, 50 ve 60°C sıcaklıklarda deneyler yürütülmüştür. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar **EK A.1’de Şekil A.5’de ve Çizelge 4.9’da** verilmiştir.

Çizelge 4.9 : Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen enzimatik yöntem sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi (Karıştırma hızı: 1400 rpm, Enzim miktarı: 8 mL, Su miktarı: 6 mL, Asit miktarı: 0,9 mL, pH:5,5).

Zaman (dakika)	Fosfor Miktarı (ppm)		
	30°C	50°C	60°C
0	845,58	845,58	845,58
10	27,15	27,05	23,88
30	15,52	10,45	14,28
60	16,26	8,69	9,70
120	25,18	8,16	8,45
180	32,62	10,54	9,94

Çizelge 4.9’dan görüldüğü gibi sıcaklık 30°C’ye düştüğünde, pamuk yağındaki fosfor miktarında 50°C’ye göre artma meydana gelmiştir. Bunun nedeni Yang ve arkadaşlarının bu konuda yaptıkları çalışmada da açıkladığı gibi, Lecitase Ultra® A1 enzimi hem fosfolipaz hem de lipaz aktivitesi gösteren bir enzimdir. Sıcaklık 40°C’nin üstünde iken fosfolipaz aktivitesi baskın iken, sıcaklık 40°C’nin altına indiğinde lipaz aktivitesi artarken, fosfolipaz aktivitesi düşmektedir. En yüksek aktiviteyi 50°C’de göstermektedir [32]. Ayrıca sıcaklığın düşmesi ile reaktan moleküllerinin kinetik enerjilerinin düşmesi, böylece çarpışma olasılıklarının azalıp reaksiyon hızının düşmesine de neden olabilmektedir [35]. Çalışmada sıcaklık 60°C’ye yükseltildiğinde enzim yapısının bozulmasından dolayı, fosfor miktarında 1. ve 2. saatlerde çok az bir miktarda artış görülmüş, ancak literatürdeki değerler kadar farklılıklar görülmemiştir. 50°C ve 60°C sıcaklıklarda 2 saat sonunda elde edilen sonuçlar hemen hemen aynı olduğundan enzimatik yöntem için uygun sıcaklık daha ekonomik olmasından dolayı 50°C olarak alınmıştır. Literatüre bakıldığında aynı enzim için Yang ve arkadaşlarının [42] kolza yağı üzerinde yaptıkları optimizasyon çalışmasında optimum sıcaklık 48,3°C, Jahani ve arkadaşlarının [43] pirinç kepeği

yağı üzerinde yaptıkları çalışmada ise optimum sıcaklık 49,2°C olarak bulunmuştur. Farklı sıcaklık değerlerine göre 2 saatlik enzimatik uygulama sonucunda elde edilen yağların fosfor içerikleri **Şekil 4.6**'da verilmiştir.



Şekil 4.6 : Farklı sıcaklık değerlerine göre ham pamuk yağının fosfor içeriğinin değişimi (Enzimatik yöntem süresi: 2 saat).

4.10 Ham Pamuk Yağından Enzimatik Yöntemle Fosfolipidlerin Giderilmesine pH'ın Etkisi

Ham pamuk yağından enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmada, pH'ın etkisini görmek amacıyla deneyler yürütülmüştür. Bu amaçla, sitrik asit değeri sabit tutulup, NaOH miktarı değiştirilerek 4,5, 5 ve 5,5 pH değerlerinde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar **EK A.1**'de **Şekil A.6**'da ve **Çizelge 4.10**'da verilmiştir.

Çizelge 4.10 : Farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen enzimatik yöntem sonucu elde edilen pamuk yağlarının fosfor içeriklerinin zamanla değişimi (Karıştırma hızı: 1400 rpm, Enzim miktarı: 8 mL, Su miktarı: 6 mL, Asit miktarı: 0,9 mL, Reaksiyon Sıcaklığı: 50°C).

Zaman (dakika)	Fosfor Miktarı (ppm)		
	4,5	5	5,5
0	845,58	845,58	845,58
10	19,06	16,07	27,05
30	18,80	14,46	10,45
60	19,94	14,42	8,69
120	21,40	15,13	8,16
180	21,54	18,89	10,54

Çalışmada kullanılan Lecitase Ultra® A1 enzimi asidik ortamda aktivite gösteren bir enzimdir [32]. **Çizelge 4.10**'dan görüldüğü gibi pamuk yağı için bu enzim en yüksek aktiviteyi pH 5,5'te göstermiştir. Literatürde de aynı enzimle yapılan fosfolipid giderilmesi çalışmalarına bakıldığında, Yang ve arkadaşlarının [32] kolza ve soya yağı üzerinde yaptıkları çalışmada en düşük fosfor içeriği pH 5'te elde edilirken, Sadeghi'nin [35] soya yağı üzerinde yaptığı çalışmada en düşük fosfor içeriği pH 4,6'da elde edilmiştir. Farklı pH değerlerine göre 2 saatlik enzimatik uygulama sonucunda elde edilen yağların fosfor içerikleri **EK A.1'de Şekil A.7**'de gösterilmiştir.

5. VARGILAR VE ÖNERİLER

Ham yağdaki yapışkan maddeleri uzaklaştırmak için hidrasyon, asidik, superdegumming, total degumming, ultrafiltrasyon prosesi gibi birçok yöntem geliştirilmiştir. Sanayide en yaygın olarak uygulanan hidrasyon ve asidik yöntem, yağdaki fosfor miktarını bazı yağlarda istenen fosfor seviyesine düşürememektedir. Superdegumming ve total degumming prosesleri ise her türlü yağa uygun olmamasından dolayı sanayide nadir olarak kullanılırken, yeni bir metot olan ultrafiltrasyon prosesi ise pahalı ve gelişmekte olan bir yöntem olduğundan tercih edilmemektedir. Enzimatik yöntemle fosfolipidlerin giderilmesinde ise bitkisel yağların fosfor içeriği 10 ppm'in altına, kimi yağlarda ise 5 ppm'in altına kadar düşürülebildiğinden özellikle fiziksel rafinasyon işlemine tabi tutulacak yağlar için oldukça uygun bir yöntemdir. Ayrıca, diğer yöntemlere göre daha az asit, baz ve su kullanımıyla daha ekonomiktir ve daha yüksek kalitede ve yüksek verimde yağ elde edilir.

Bu çalışmada, oldukça yüksek miktarda fosfolipid içeren ham pamuk yağından farklı yöntemlerle bu tür maddelerin uzaklaştırılmasında etkin olan uygun yöntem araştırılmış ve daha sonra belirlenen uygun yöntem üzerine etki edebileceği düşünülen karıştırma hızı, enzim, su ve asit miktarları, sıcaklık ve pH gibi parametreler incelenmiştir.

Başlangıçta fosfor içeriği 845,58 ppm olan ham pamuk yağının, asidik yöntemle fosfor içeriği en düşük 1 saat sonunda 214,80 ppm olarak bulunmuş, 3 saat sonunda ise artış göstererek 357,35 ppm'e ulaşmıştır. Enzimatik yöntemde ise ham pamuk yağının fosfor içeriği 3 saat sonunda 149,92 ppm olarak elde edilmiştir. Daha sonra karıştırma hızının bu yöntem üzerine etkisi incelenmiş ve en uygun karıştırma hızı 1400 rpm olarak belirlenmiştir. Literatür araştırmalarına göre tüm reaktanların aynı çalışma sıcaklığında ilave edildiği enzimatik yöntem ve EnzyMax® yöntemleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla 1400 rpm karıştırma hızında ve 2 mL enzim miktarında çalışmalar yapılmış ve 3 saat sonunda elde edilen yağların fosfor içerikleri 89 ppm olarak bulunmuştur. Bu nedenle hem uygulama kolaylığı hem de ekonomik olması

bakımından uygun yöntem olarak tüm reaktanların aynı çalışma sıcaklığında ilave edildiği enzimatik yöntem seçilmiştir. Enzimatik yöntemle en düşük fosfor içeriği (8,16 ppm) 75 gram yağ için, 8 mL enzim, 6 mL su, 0,9 mL sitrik asit miktarlarında, 50°C sıcaklık ve pH 5,5'te elde edilmiştir.

Pamuk yağı daha önce de belirtildiği gibi fenolik yapıda zehirli bir bileşik olan gossipol içermektedir. Pamuk tohumundaki gözeneklerde bulunan gossipolun büyük bir kısmı, yağ ekstrakte edildiğinde tohumdaki proteine bağlanırken, küçük bir kısmı da yağa karışır. Yağda kalan gossipolun büyük bir kısmı ise günümüzde nötralizasyon aşamasında alkali uygulamasıyla uzaklaştırılmaktadır. Bu çalışmada yağın gossipol içeriği belirlenmemiştir. Bundan sonraki çalışmalarda, kullanılan pamuk yağının gossipol içeriği belirlenerek, enzimatik yapışkan madde giderme yönteminin pamuk yağındaki gossipol içeriğine etkisi üzerine araştırmalar yapılabilir.

Pamuk yağının fosfor içeriği oldukça yüksek olduğundan, ön hidrasyon yöntemi uygulanarak enzimin yükü hafifletilebilir. Farklı enzim çeşitleri veya enzim karışımları ile çalışmalar gerçekleştirilerek reaksiyona etki eden parametreler optimize edilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Gümüşkesen, A.S.**, 1999: Bitkisel Yağ Teknolojisi, Bitkisel Yağ Sanayicileri Derneği, Yayın No. 5, İzmir.
- [2] **Clausen, K.**, 2001: Enzymatic Oil-Degumming by a Novel Microbial Phospholipase, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **103 (6)**, 333-340.
- [3] **Jiang, F., Wang, J., Ju, L., Kaleem, I., Dai, D., Li, C.**, 2011: Optimization of Degumming Process for Soybean Oil by Phospholipase B, *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, **86 (8)**, 1081-1087.
- [4] **Hamm, W.**, 1999: Edible Oil Processing, Sheffield Academic Press, UK. 5, 79-97.
- [5] **Başoğlu, F.**, 2006: Yemeklik Yağ Teknolojileri. Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- [6] **Lawson, H.**, 1995: Food Oils and Fats Technology, Utilization and Nutrition, ITP Company.
- [7] **Gunstone, F., D.**, 2004: The Chemistry of Oils and Fats: Sources, Composition, Properties and Uses, CRC Press, Oxford.
- [8] **Danışman, A.**, 2008: Bitkisel Yağlardan Değerli Kimyasallar ve Biyodizel Üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, Anadolu Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, Eskişehir.
- [9] **O'Brien, R.**, 2004: Fats and Oils : Formulating and Processing for Applications, 2nd ed., CRC Press.
- [10] **Xu., L., Diosady, L., L.**, 2004: Nutritionally Enhanced Edible Oil and Oilseed Processing, Chapter 7-Degumming, AOCS pres, USA.
- [11] **Saraç, M.**, 2011: Enzimatik Sulu Ekstraksiyon Yöntemi ile Pamuk Tohumundan Yağ Eldesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ, Kimya Mühendisliği, İstanbul.
- [12] **Salunkhe, D.K.**, 1992: World Oilseeds: Chemistry, Technology, and Utilizaion, New York: Van Nostrand Reinhold, 249-274.
- [13] **Anonim**, 2008: TBMM Zeytin ve Zeytinyağı ile Diğer Bitkisel Yağların Üretiminde ve Ticaretinde Yaşanan Sorunların Araştırılarak Alınması Gereken Önlemlerin Belirlenmesi Amacıyla Kurulan Meclis Araştırması Komisyonu Raporu.
- [14] **Kayahan, M.**, 2004: Yağlı Tohumlardan Ham Yağ ve Üretim Teknolojisi, Gıda Mühendisleri Odası, Ankara, 4-7.
- [15] **Erickson, D.R.**, 1990: Edible Fats and Oils Processing: Basic Principles and Modern Practices: World Conference Proceedings, AOCS Champaign, 299-312.

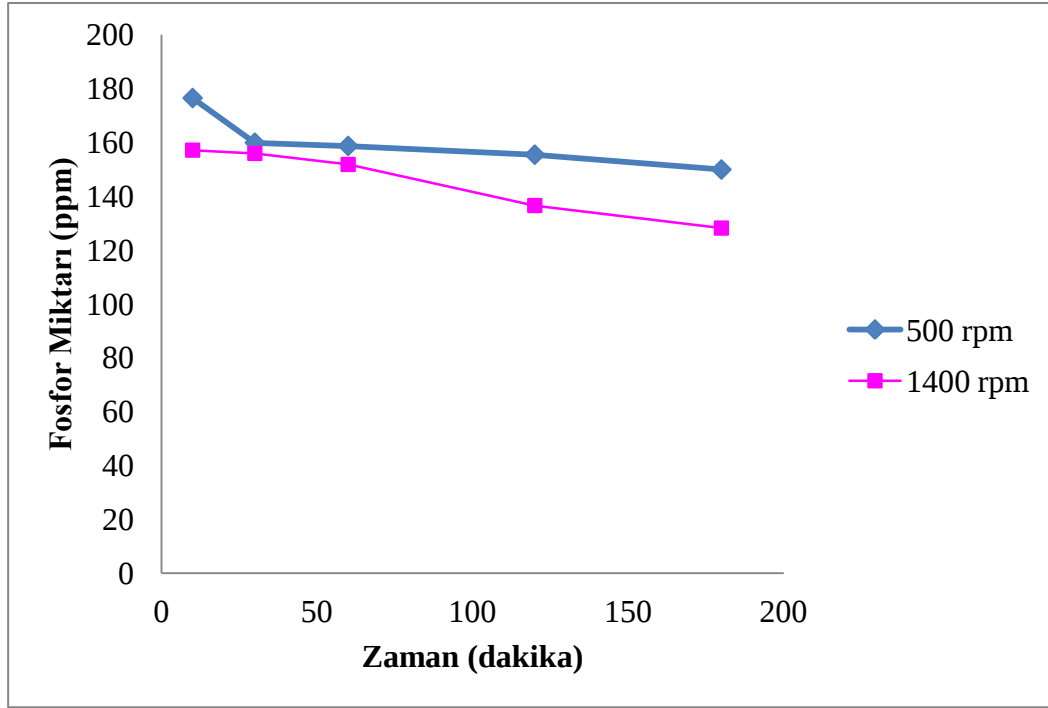
- [16] **Bailey, A., E.**, 2005: Bailey's Industrial Oil & Fat Products, 6th ed., Vol. 2, Edible Oil Processing, Cottonseed Oil.
- [17] **Url-1** <<http://www.bysd.org.tr/Istatistikler.aspx>>, alındığı tarih: 06.10.2011.
- [18] **Anonim, 2010**: 2010 Yılı Pamuk Raporu, T.C. Sanayi ve Ticaret Bakanlığı Teşkilatlandırma Genel Müdürlüğü.
- [19] **Bağcı, S.**, 2011: Bitkisel Yağ Sanayi ve Eysel Bitkisel Atık Yağların Toplanması, 3. Atık Teknolojileri Sempozyumu, Bitkisel Yağ Sanayicileri Derneği.
- [20] **Tosun, M.**, 2003: Bitkisel Sıvı Yağlar Sektör Araştırması, Türkiye Kalkınma Bankası A.Ş. Genel Araştırmalar, Ankara.
- [21] **Boynueğri, P.**, 2010; Membran Degumming İşleminde Polivinilidenflorid Membranların Kullanımı, *Yüksek Lisans Tezi*, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [22] **Cmolik, J.**, 2000: Physical Refining of Edible Oils, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **102 (7)**, 472-486.
- [23] **O'Brien, R., D.**, 2008. Soybeans - Chemistry, Production Processing, and Utilization, Soybean oil Purification, AOCS Press, Vol. 2, Section 12.
- [24] **Carelli, A. A., Ceci L. N. and Crapiste G. H.**, 2002. Phosphorus-to-Phospholipid Conversion Factors for Crude and Degummed Sunflower Oils, *Journal of The American Oil Chemist' Society*, **79 (12)**, 1177-1180.
- [25] **Altınışık, M.**, 2006: Lipidlerin Yapısal ve İşlevsel Özellikleri VI. Alındığı tarih: 10.10.2011, adres: www.mustafaaltinisik.org.uk/67-1-2-06.ppt
- [26] **Dijkstra, A.J.**, 2010: Enzymatic Degumming, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **112 (11)**, 1178-1189.
- [27] **Logan, A.**, 2004: Degumming and Centrifuge Selection, Optimization and Maintenance, IUPAC-AOCS Workshop on Fats, Oils and Oilseeds Analysis and Production, Tunisa, Alındığı tarih: 21.11.2011, adres: http://old.iupac.org/symposia/proceedings/Tunis04/logan_andrew.pdf.
- [28] **Chakrabarti, P.P., Rao, B.V.S.K., Roy, S.K.**, 2004. Process for the Pre-treatment of Vegetable Oils for Physical Refining. United States Patent Application, No: 20040005399.
- [29] **Applewhite, H. T.**, 1993: Proceedings of the World Conference on Oilseed Technology and Utilization, AOCS Press, 142-143.
- [30] **Ersungur, S.**, 2008: Üretim Yönteminin Kolza Yağının Özelliklerine Etkisinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, İstanbul.
- [31] **Jiang, F., Wang, J. Kaleem, I., Dai, D., Zhou, X., Li, C.**, 2011: Degumming of Vegetable Oils by a Novel Phospholipase B from *Pseudomonas fluorescens* BIT-18, *Bioresource Technology*, **102 (17)**, 8052-8056.
- [32] **Yang, J.G., Wang Y.H., Yang, B., Mainda, G., Guo, Y.**, 2005: Degumming of Vegetable Oil by a New Microbial Lipase, *Food Technology and Biotechnology*, **44 (1)**, 101-104.

- [33] **Münch, E.W.**, 2004: Enzymatic Degumming Process for Oils from Soya, Rape and Sun, 2004. Alındığı tarih: 22.10.2011, adres: http://www.lipproconsulting.de/docs/20040907_-_LipPro_-_Enzymatic_Degumming_Processes.pdf.
- [34] **Prasad, B.N**, 2006: Refining of Rice Bran Oil, *Lipid Technology*, **18 (12)**, 275-279.
- [35] **Sadeghi, M.**, 2010: Purification of Soybean Oil with Phospholipase A1, *Theoretical and Experimental Chemistry*, **46 (2)**, 132-133.
- [36] **Dijkstra, A.,J.**, 2011: Enzymatic Degumming, *Lipid Technology*, **23 (2)**, 36-38.
- [37] **Dijkstra, A.J**, 2009: Recent Developments in Edible Oil Processing, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **111 (9)**, 857-864.
- [38] **Dijkstra, A., J.**, 2010: Degumming Revisited, Inform July 2010, **21 (7)**.
- [39] **Cowan, D.**, 2008: Enzymes in Lipid Production and Modification-Current Knowledge and Future Perspectives, *Lipid Technology*, **20 (10)**, 225-228.
- [40] **Yang, B., Zhou, R., Yang, J.G., Wang, Y.H, Wang, W.F**, 2008: Insight into the Enzymatic Degumming Process of Soybean Oil, *Journal of The American Oil Chemist' Society*, **85 (5)**, 421-425.
- [41] **Roy S.K., Rao B.V.S.K., Prasad R.B.N.**, 2002: Enzymatic Degumming of Rice Bran Oil, *Journal of The American Oil Chemist' Society*, **79 (8)**, 845,846.
- [42] **Yang, B., Wang, Y., Yang, J.**, 2006: Optimization of Enzymatic Degumming Process for Rapeseed Oil, *Journal of The American Oil Chemist' Society*, **83 (7)**, 653-658.
- [43] **Jahani, M., Alizadeh, M. Pirozifard, M.**, 2007: Optimization of Enzymatic Degumming Process for Rice Bran Oil Using Response Surface Methodology, *LWT-Food Science and Technology*, **41 (10)**, 1892-1898.
- [44] **Sheelu, G., Kavitha, G., Fadnavis N. W.**, 2008: Efficient Immobilization of Lecitase in Gelatin Hydrogel and Degumming of Rice Bran Oil Using a Spinning Basket Reactor, *Journal of The American Oil Chemist' Society*, **85 (8)**, 739-748.
- [45] **Manjula, S., Jose, A., Divakar, S., Subramanian, R.**, 2011: Degumming Rice Bran Oil Using Phospholipase-A1, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 1-7.
- [46] **Novozymes**, 2007: Product Data Sheet, Lecitase® Ultra, Valid from: 11.07.2007.
- [47] **AOCS, Method Ce 2.66**, 1990: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, 4th ed., AOCS, Champaign.
- [48] **AOCS, Method Ca 12-55**, 1990: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, 4th ed., AOCS, Champaign.

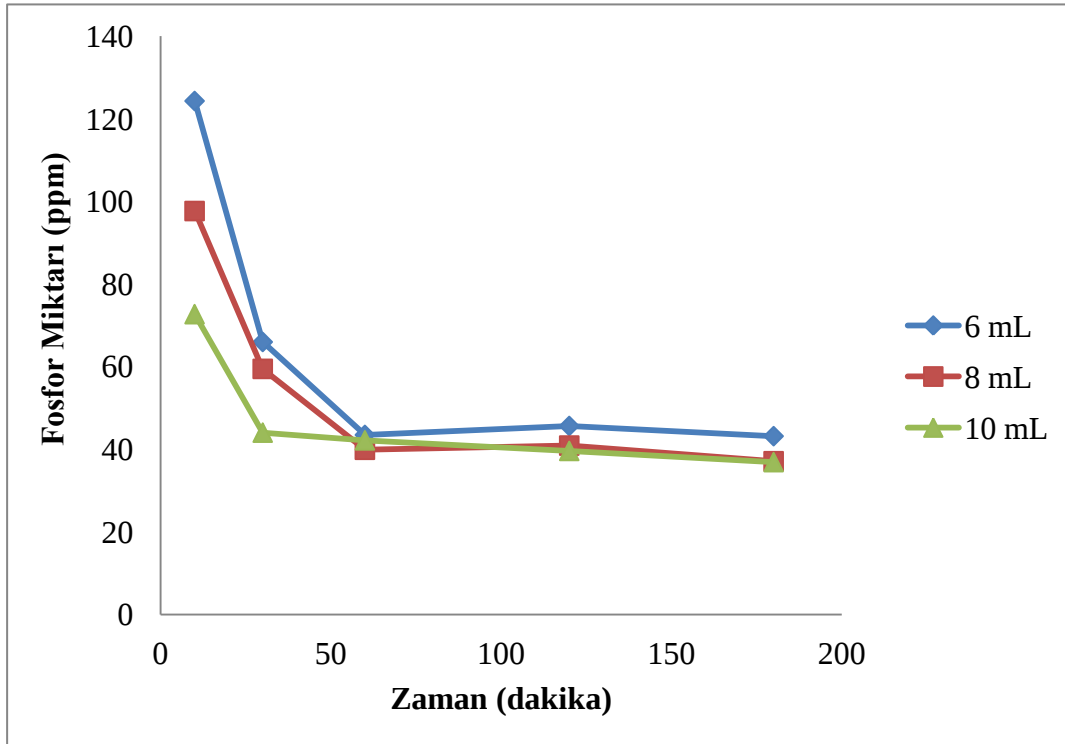
EKLER

EK A.1 : Deneysel sonuç grafikleri

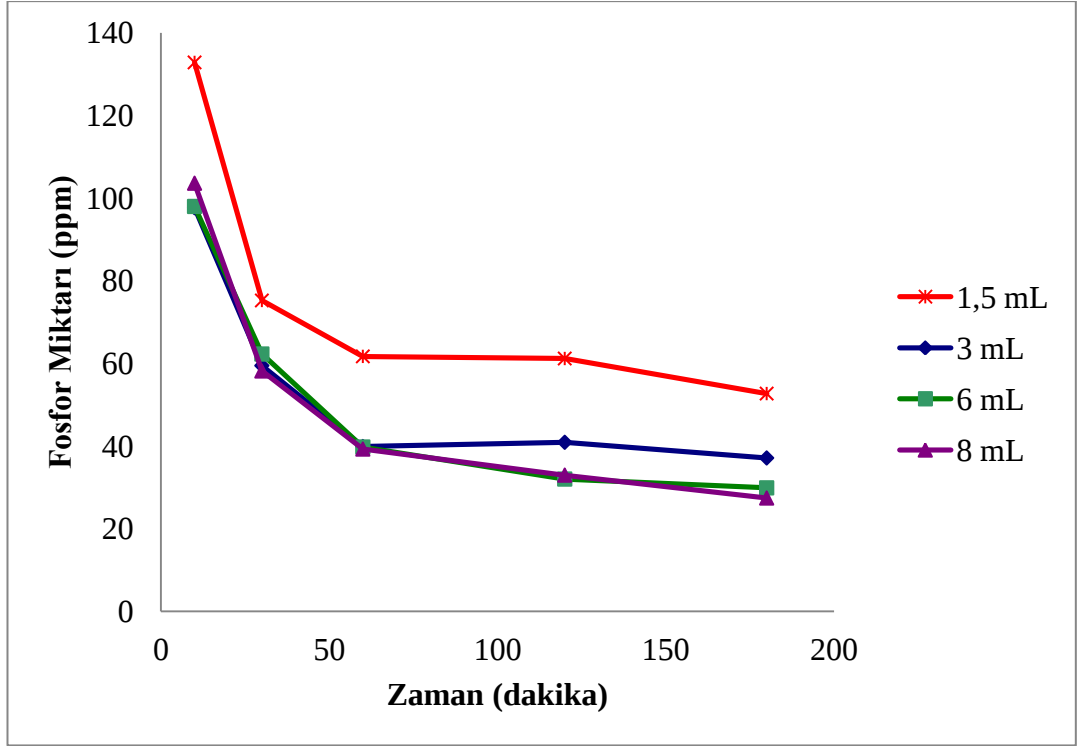
EK A.1



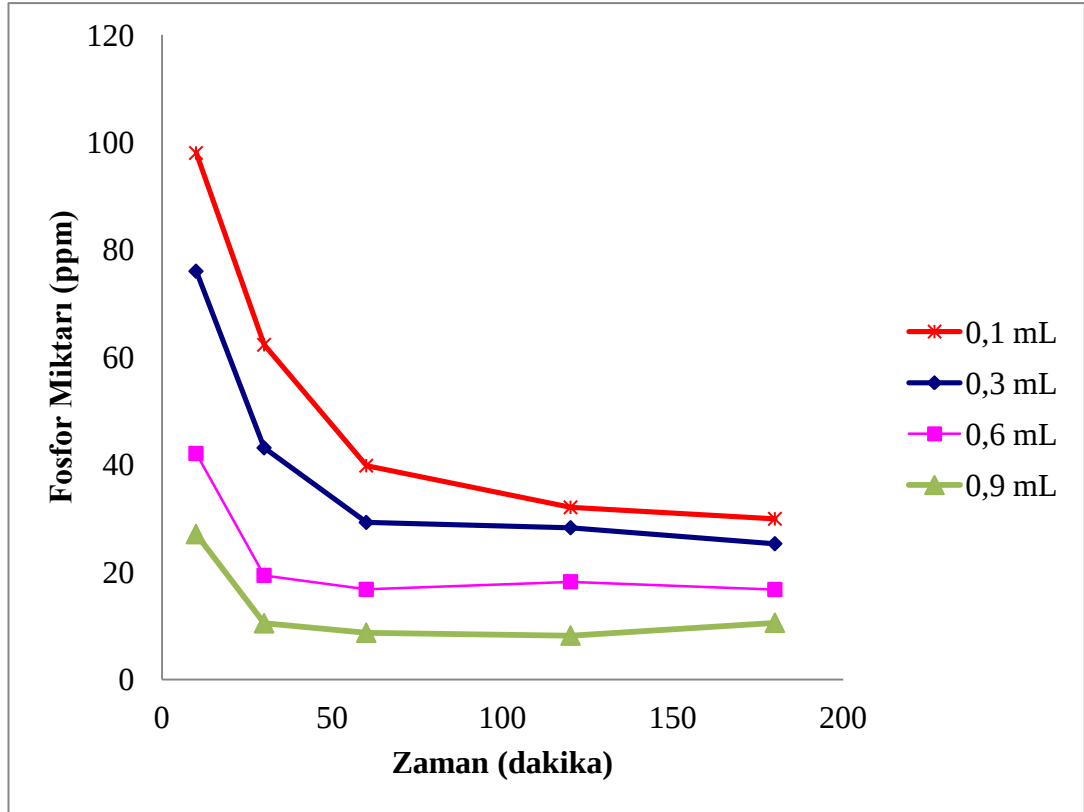
Şekil A.1 : Farklı karıştırma hızlarında enzimatik yöntemle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi.



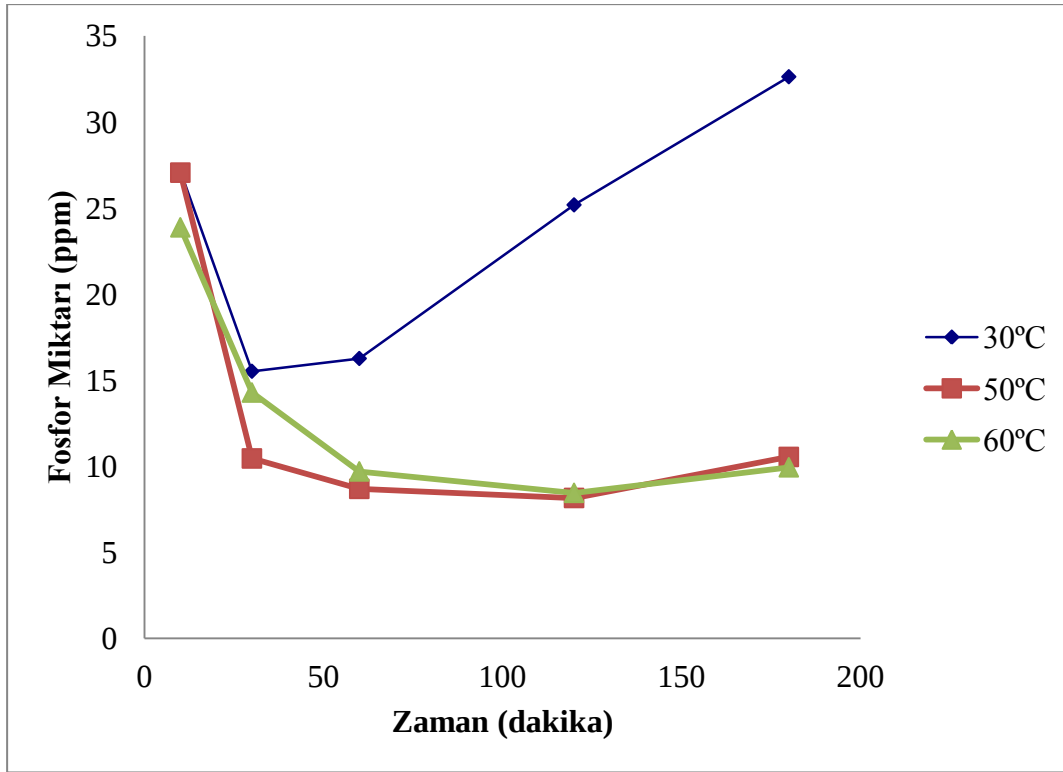
Şekil A.2 : Farklı enzim miktarlarında enzimatik yöntemle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi.



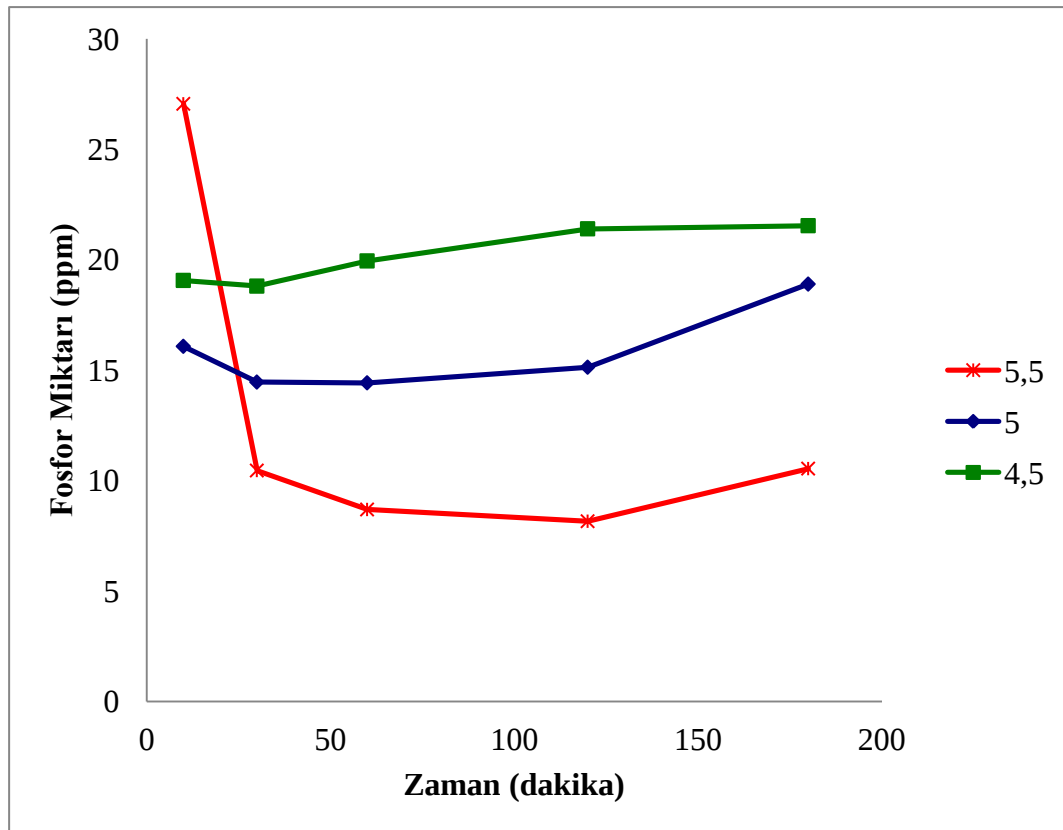
Şekil A.3 : Farklı su miktarlarında enzimatik yöntemle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi.



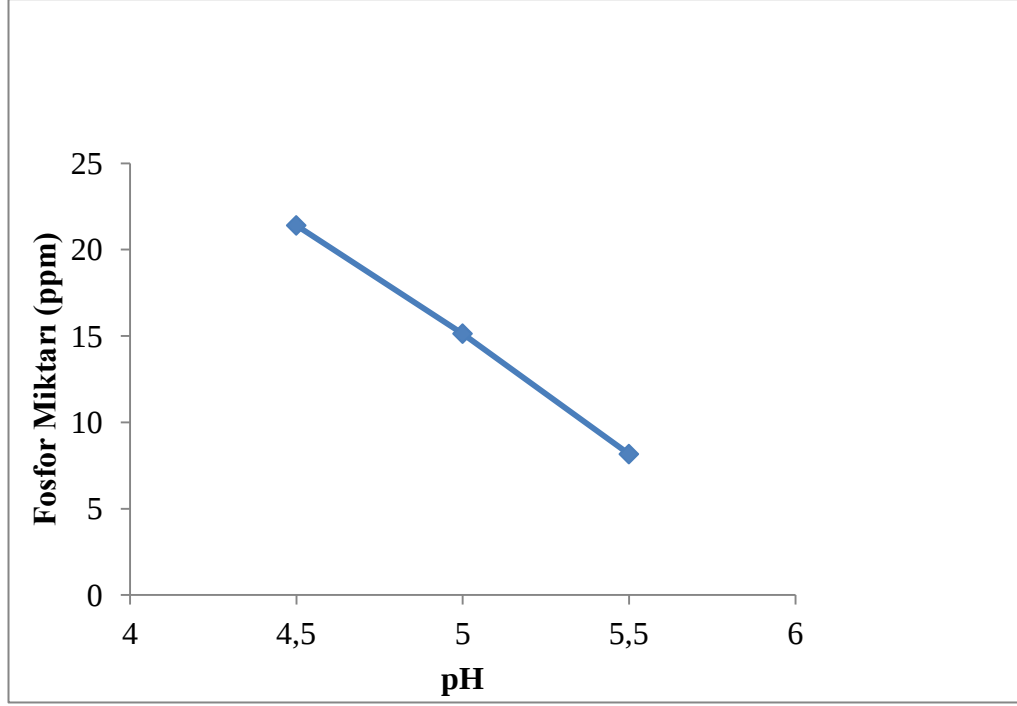
Şekil A.4 : Farklı asit miktarlarında enzimatik yöntemle ham pamuk yağından fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi.



Şekil A.5 : Farklı sıcaklık değerlerinde enzimatik yöntemle ham pamuk yağında fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi.



Şekil A.6 : Farklı pH değerlerinde enzimatik yöntemle ham pamuk yağında fosfolipid giderilmesi sırasında fosfor miktarının zamanla değişimi.



Şekil A.7 : Farklı pH değerlerine göre ham pamuk yağının fosfor içeriğinin değişimi (Enzimatik yöntem süresi: 2 saat).

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Seval KARAHASAN

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul-12.05.1984

Adres : Esenkent Mah. Enver Paşa Cad. Menekşe Evleri E-13 D:4
Esenyurt/İSTANBUL

E-posta : sevalkarahasan@gmail.com

Lisans : Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Mühendisliği

Lise : Pertevniyal Anadolu Lisesi

