

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OMEGA-3 ve OMEGA-6 YAĞ ASİTLERİNİN ÜRE FRAKSİYONLAMA VE
ENZİMATİK YÖNTEMLER İLE KONSANTRASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özlem ÖZMEN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

EYLÜL 2013

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OMEGA-3 ve OMEGA-6 YAĞ ASİTLERİNİN ÜRE FRAKSİYONLAMA VE
ENZİMATİK YÖNTEMLER İLE KONSANTRASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Özlem ÖZMEN
(506101529)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Gıda Mühendisliği Programı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK

EYLÜL 2013

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 506101529 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Özlem ÖZMEN**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı '**OMEGA-3 ve OMEGA-6 YAĞ ASİTLERİNİN ÜRE FRAKSİYONLAMA VE ENZİMATİK YÖNTEM İLE KONSANTRE EDİLMESİ**' başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Yrd. Doç. Dr. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Yrd. Doç. Dr. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Dilara Nilüfer ERDİL
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Murat TAŞAN
Namık Kemal Üniversitesi

Teslim Tarihi : **10 Eylül 2013**
Savunma Tarihi: **17 Eylül 2013**

Sevgili aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, birikimleri ile beni yönlendiren tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Neşe Şahin Yeşilçubuk'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez aşamamda engin bilgisine ve yardımına ihtiyaç duyduğumda beni hiç geri çevirmeyen değerli hocam Prof. Dr. Güldem Üstün'e çok teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi tez aşamamda da dualarını, ilgilerini ve desteklerini esirgemeyerek her türlü maddi ve manevi yardımları sunan güzel aileme, annem Ayşe Özmen, babam Ali Özmen'e, abim Özer ÖZMEN'e ve her daim yanımda olan sevgili nişanlım Fatih YILMAZ'a sonsuz teşekkürler.

Eylül 2013

Özlem ÖZMEN
(Araştırma Görevlisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	ix
KISALTMALAR	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Çoklu Doymamış Yağ Asitleri	3
2.1.1 Omega-3 Yağ Asitleri	4
2.1.1.1 Stearidonik asit.....	5
2.1.2 Omega-6 Yağ Asitleri	8
2.1.2.1 Gamma linolenik asit	9
2.2 Omega-3 ve Omega-6 Yağ Asitlerinin Sağlık Üzerine Etkileri	11
2.3 <i>Echium vulgare</i> (Engerek Otu)	13
2.4 Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin Konsantrasyonu	15
2.4.1 Üre fraksiyonlama yöntemi	15
2.4.2 Süper kritik akışkan ile ekstraksiyon yöntemi	18
2.4.3 Düşük sıcaklıkta kristalizasyon	21
2.4.4 Moleküler distilasyon yöntemi.....	22
2.4.5 Kromatografik yöntem	24
2.4.6 Enzimatik yöntem	25
3. MATERYAL ve METOT.....	33
3.1 Malzeme.....	33
3.2 Yöntemler.....	33
3.2.1 <i>Echium vulgare</i> tohumlarından yağ eldesi.....	33
3.2.2 Yağın karakterizasyonu	34
3.2.3 Asitlik tayini	34
3.2.4 Kırılma indisi tayini.....	34
3.2.5 Sabunlaşma sayısı tayini	34
3.3 <i>Echium vulgare</i> Tohum Yağından Yağ Asitlerinin Eldesi.....	35
3.4 Üre Fraksiyonlama Yöntemi ile Yağ asidi Konsantrasyonu Eldesi	35
3.5. Enzimatik Yöntemle Yağ Asidi Konsantrasyonu Eldesi	35
3.5.1 Enzimatik hidroliz.....	36
3.5.2 <i>E.vulgare</i> tohum yağı serbest yağ asitlerinin seçici esterifikasyonu	36
3.5.3 Serbest yağ asitlerinin fraksiyonasyonu	37
3.6 Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması	37
3.7 Yağ Asitlerinin Gaz-Sıvı Kromatografisi ile Analizi	37
3.8 Tepki Yüzey Yöntemi ile Deneysel Tasarımı.....	38
3.9 İstatiksel Analiz.....	39

4. BULGULAR ve TARTIŞMA	41
4.1 <i>Echium vulgare</i> Tohum Yağının Karakterizasyonu.....	41
4.2 <i>Echium vulgare</i> Tohumunun Yağ Asidi Bileşimi.....	41
4.3 Omega-3 ve Omega-6 Yağ Asitlerinin Üre fraksiyonlama ve Enzimatik Yöntemler ile Konsantrasyonu.....	42
4.3.1 Üre fraksiyonlama yöntemi.....	42
4.3.1.1 Reaksiyon koşullarının Tepki Yüzey Yöntemi ile optimizasyonu....	42
4.3.1.2 GLA ve SDA konsantresi üretimine reaksiyon koşullarının etkilerinin istatistiksel açıdan yorumlanması.....	42
4.3.1.3 Sonuçların Tepki-Yüzey İzdüşüm grafikleri ile yorumlanması.....	45
4.3.1.4 Modelin doğrulanması.....	48
4.3.2 Enzimatik Yöntem.....	49
4.3.2.1 Reaksiyon koşullarının Tepki Yüzey Yöntemi ile optimizasyonu....	50
4.3.2.2 GLA ve SDA konsantresi üretimine reaksiyon koşullarının etkilerinin istatistiksel açıdan yorumlanması.....	50
4.3.2.3 Sonuçların Tepki-Yüzey İzdüşüm grafikleri ile yorumlanması.....	54
4.3.2.4 Modelin doğrulanması.....	57
5. SONUÇ	59
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	71

KISALTMALAR

AA	: Araşidonik Asit
ALA	: Alfa-Linolenik asit
ÇDYA	: Çoklu Doymamış Yağ Asidi
DAG	: Diaçilgliserol
DGLA	: Di homo γ -Linolenik asit
DHA	: Dokosahekzaenoik Asit
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
GLA	: Gama-Linolenik Asit
LA	: Linoleik Asit
RSM	: Response Surface Methodology
SDA	: Stearidonik Asit
PCB	: Poliklora Bisfenil
SCF	: Supercritical Fluid
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemist

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Çoklu doymamış yağ asitlerinin sınıflandırılması	4
Çizelge 2.2 : Omega-3 ve omega-6 yağ asitleri kaynakları.....	12
Çizelge 2.3 : <i>Echium</i> türlerinin yağ asidi bileşimi.....	14
Çizelge 2.4 : Edirne'nin farklı bölgelerindeki doğal ortamlardan toplanan <i>Echium vulgare</i> tohum yağının yağ asidi bileşimi.....	15
Çizelge 2.5 : SCF yöntemi ile çeşitli yağlar kullanılarak GLA konsantresi eldesi ...	21
Çizelge 2.6 : Farklı kaynaklardan elde edilen triaçilgliserol lipazların seçicilikleri .	27
Çizelge 2.7: Enzimatik yöntemler ile ÇDYA konsantresi üretimi literatür özeti.....	32
Çizelge 3.1 : Gaz kromatografisi cihazında uygulanan koşullar ve kolon özellikleri.....	38
Çizelge 3.2 : Üre fraksiyonlama yöntemi için Merkezil Kompozit Tasarımına ait değişkenler (faktörler) ve seviyeleri	38
Çizelge 3.3 : Enzimatik yöntem için kullanılan Merkezil Kompozit Tasarımına ait değişkenler (faktörler) ve seviyeleri	39
Çizelge 4.1 : <i>Echium vulgare</i> tohum yağının özellikleri	41
Çizelge 4.2 : <i>Echium vulgare</i> tohum yağının yağ asidi bileşimi.....	42
Çizelge 4.3 : Tepki Yüzey Yöntemi ile geliştirilen deney tasarımı ve gözlenen tepkiler	43
Çizelge 4.4 : Modelin GLA ve SDA konsantresi üretimi için regresyon katsayıları ve önem dereceleri	43
Çizelge 4.5 : GLA ve SDA konsantresi üretimi için ANOVA analizi sonuçları	44
Çizelge 4.6 : GLA ve SDA konsantrasyonun maksimum olduğu koşullardaki yağ asidi bileşimi (%mol)	48
Çizelge 4.7 : Optimum koşullarda elde edilen ürünün yağ asidi bileşimi (% mol)...	49
Çizelge 4.8 : <i>E.vulgare</i> tohum yağının Novozyme 435 enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizi sonucu yağ asidi bileşimi (%mol)	49
Çizelge 4.9 : Tepki Yüzey Yöntemi ile geliştirilen deney tasarımı ve gözlenen tepkiler ile verim ve esterifikasyon dereceleri.....	51
Çizelge 4.10 : Modelin GLA ve SDA konsantresi üretimi için regresyon katsayıları ve önem dereceleri	51
Çizelge 4.11 :GLA ve SDA konsantresi üretimi için ANOVA analizi sonuçları	52
Çizelge 4.12: GLA ve SDA konsantrasyonun maksimum olduğu koşullardaki yağ asidi bileşimi (%mol)	54
Çizelge 4.13: Optimum koşullarda elde edilen ürünün yağ asidi bileşimi (% mol)..	58
Çizelge 4.14: Optimum koşullarda elde edilen ürüne uygulanan üre fraksiyonlama reaksiyonu sonuçları.....	58

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : IUPAC standardına göre Δ ve ω isimlendirilmesi	3
Şekil 2.2 : Stearidonik asidin kimyasal yapısı	5
Şekil 2.3 : Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol.....	8
Şekil 2.4 : Uzun zincirli yağ asitlerinin yokluğunda ve varlığında üre kristali oluşumu.....	16
Şekil 2.5 : CO ₂ 'nin sıcaklık ve basınç diyagramı	19
Şekil 2.6 : GLA'nın büyük ölçekte saflaştırılması için hidroliz/esterifikasyon metodu proses basamakları	30
Şekil 4.1 : Reaksiyon sonuçları ile GLA ve SDA konsantresi üretimine ait modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki.....	45
Şekil 4.2 : GLA ve SDA konsantresi üretimine üre: yağ asidi oranının ve kristalizasyon süresinin etkisini gösteren izdüşüm grafiği.....	46
Şekil 4.3 : GLA ve SDA konsantresi üretimine üre: yağ asidi oranının ve kristalizasyon süresinin etkisini gösteren tepki-yüzey grafiği	46
Şekil 4.4 : Reaksiyon sonuçları ile GLA ve SDA konsantresi üretimine ait modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki.....	53
Şekil 4.5 : GLA ve SDA konsantresi üretimine lauril alkol:yağ asidi oranının (mol/mol) ve enzimatik esterifikasyon süresinin etkisini gösteren izdüşüm grafiği.....	54
Şekil 4.6 : GLA ve SDA konsantresi üretimine reaksiyon süresinin ve reaksiyon sıcaklığının etkisini gösteren izdüşüm grafiği	55
Şekil 4.7 : GLA ve SDA konsantresi üretimine lauril alkol:yağ asidi oranının (mol/mol) ve reaksiyon sıcaklığının etkisini gösteren izdüşüm grafiği ...	55

OMEGA-3 ve OMEGA-6 YAĞ ASİTLERİNİN ÜRE FRAKSİYONLAMA VE ENZİMATİK YÖNTEMLER İLE KONSANTRASYONU

ÖZET

Sağlıklı yaşam bilincinin arttığı son günlerde, sağlık üzerine olumlu etkileri olan çoklu doymamış yağ asitlerini (ÇDYA) içeren yağlara olan talep artmaktadır. Bu yağ asitleri içerisinde en önemlileri omega-3 ve omega-6 yağ asitleridir. Başlıca önemli omega-3 yağ asitleri arasında alfa linolenik asit (ALA, 18:3n-3), eikosapentaenoik asit (EPA, 20:5n-3) dokosaheksanoik asit (DHA, 22:6n-3) ve stearidonik asit (SDA, 18:4n-3) bulunmaktadır. Linoleik asit (LA, 18:2n-6), araşidonik asit (AA, 20:4n-6) ve gamma linolenik asit (GLA, 18:3n-6) başlıca omega-6 yağ asitleridir. Omega-3 ve omega-6 ÇDYA'lar eikosanoidler olarak bilinen hormon benzeri bileşiklerin öncü maddeleridir ve bu bileşikler insan vücudunda bazı önemli biyolojik reaksiyonlarda yer almaktadırlar. Soya, mısır, ayçiçek, aspir tohum yağları omega-6 yağ asitleri bakımından zengin iken, omega-3 yağ asitleri açısından en zengin kaynaklar balık ve alglerdir. Günümüzde omega-3 kaynağı olarak balıklarla ilgili sorunlar artmaktadır. Balık ve balık yağı tüketimi azalmakta olup, omega-3 yağ asitleri bakımından zengin bitkisel kaynaklara eğilim artmaktadır.

Bitkisel kaynaklardan *Echium vulgare* (engerek otu) SDA, GLA, ALA gibi uzun zincirli yağ asitlerini oldukça yüksek oranlarda içermektedir. Bu yağ asitleri içinde SDA, vücutta ALA'ya göre daha kolay ve daha yüksek oranda EPA ve DHA'ya dönüşmektedir. LA'nın desatürasyonu sonucu oluşan GLA ise ardışık desatürasyon reaksiyonları sonucu AA'ya dönüşmektedir. *E. vulgare* tohum yağı sahip olduğu yağ asidi kompozisyonu ve omega-3, omega-6 yağ asidi oranıyla diğer bitki yağlarına göre benzersiz bir yağdır. *E. vulgare* tohum yağı, ilaç sanayiinde egzema, akne gibi cilt hastalıklarının tedavisinde ve diğer bazı cilt rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılma potansiyeline sahiptir.

Bu çalışma ile omega-3 ve omega-6 yağ asitleri içeriği bakımından zengin *Echium vulgare* tohum yağından üre fraksiyonlama yöntemi ve enzimatik yöntem ile ÇDYA konsantrasyonu elde edilmesinde reaksiyon koşulları tepki-yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir. Tepki-yüzey yönteminde seçilen farklı faktörlerin etkisi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla üre fraksiyonlama deneyleri için iki değişkenli üç seviyeli Merkezil Kompozit Tasarımı kullanılırken, enzimatik yöntem için üç değişkenli üç seviyeli Merkezil Kompozit Tasarımı kullanılmıştır. Üre fraksiyonlama yöntemi optimizasyonunda tepki olarak GLA ve SDA konsantrasyonu seçilirken, kristalizasyon süresi (8-24saat), üre:yağ asidi oranı (3-5:1ağ/ağ) bağımsız değişkenler (faktör) olarak seçilmiştir. Modelden elde edilen veriler ile optimum reaksiyon koşulları üre:yağ asitleri oranı 5:1 (ağırlıkça), kristalizasyon süresi 8 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında *Echium vulgare* tohum yağından %52,6 GLA ve SDA içeren ürün elde edilmiştir. Bu değerlerin modelden tahminlenen GLA ve SDA (50,2%) miktarı ile benzer olduğu görülmüştür. Başlangıç GLA konsantrasyonu %11,6 iken reaksiyon sonunda GLA konsantrasyonu %24,6'ya

yükselmiştir. Tohum yağının başlangıçtaki SDA konsantrasyonu ise %13,3 iken reaksiyon sonunda %28'e yükselmiştir. Reaksiyonlar sonucunda seçilen tepki [GLA ve SDA miktarı (%)] için kuadratik model elde edilmiştir. Üre fraksiyonlama yöntemi için model katsayısı, (R^2) 0,85 olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında ise *Echium vulgare* tohumu yağından çoklu doymamış yağ asidi konsantrasyonu üretimi için enzimatik hidroliz ve enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarını içeren iki basamaklı enzimatik yöntem kullanılmıştır. Enzimatik hidroliz reaksiyonu spesifik olmayan Novozyme-435 ile 60°C'de 250 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda 48 saatte gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen yağ asitleri enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarında kullanılmıştır. Enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarının optimizasyonu için lauril alkol:yağ asidi oranı (1:1-3:1 mol/mol), reaksiyon süresi (8-16 saat) ve reaksiyon sıcaklığı (50-60°C) bağımsız değişkenler olarak seçilirken, tepki olarak GLA ve SDA konsantrasyonu seçilmiştir. Modelden elde edilen veriler değerlendirildiğinde optimum reaksiyon koşulları; lauril alkol oranı:yağ asidi (1:1mol/mol), reaksiyon süresi 16 saat ve reaksiyon sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında *Echium vulgare* tohum yağından %72,3 verimle %60,5 GLA ve SDA içeren ürün elde edilmiştir. Bu değer modelden tahminlenen GLA ve SDA (59,5%) miktarı ile benzer olduğu görülmüştür. Başlangıç GLA konsantrasyonu %11,9 iken reaksiyon sonunda GLA konsantrasyonu %28,2'ye yükselmiştir. Tohum yağının başlangıçtaki SDA konsantrasyonu %16,5 iken reaksiyon sonunda %32,3'e yükselmiştir. Reaksiyonlar sonucunda seçilen tepki [GLA ve SDA miktarı (%)] için kuadratik model elde edilmiştir. Enzimatik esterifikasyon yöntemi için model katsayısı, (R^2) 0,84 olarak belirlenmiştir.

Enzimatik esterifikasyon sonucunda optimum koşullarda elde edilen konsantre üründe GLA ve SDA konsantrasyonunu daha da yükseltmek için uygulanan üre fraksiyonlama reaksiyonlarının tepki yüzey yöntemi ile optimizasyonu sonucu elde edilen optimum koşullar, üre:yağ asitleri oranı 5:1 (ağırlıkça), kristalizasyon süresi 8 saat, sonucunda son üründe GLA konsantrasyonu %28,2'den %35,2'ye yükselirken SDA konsantrasyonu %32,3'den %40,5'e yükselmiştir. Toplam GLA ve SDA konsantrasyonu %60,5'ten %75,7'ye yükselmiştir.

Çalışma sonucunda sağlık üzerine olumlu etkileri olan konsantre ÇDYA'ların besin takviyesi olarak, tedavi edici olarak veya fonksiyonel gıda formülasyonlarında yer alarak gıda, ilaç ve kişisel bakım ürünlerinde kullanım alanı bulacağı düşünülmektedir.

CONCENTRATION OF OMEGA-3 AND OMEGA-6 FATTY ACIDS BY UREA FRACTIONATION AND EZYMATIC METHODS

SUMMARY

Production of omega-3 and omega-6 fatty acids concentrates continues to be a topic of interest for both the pharmaceutical and healthy food industries. With the growing public awareness of the nutritional benefits of omega-3 and omega-6 fatty acids, demand for polyunsaturated fatty acids (PUFA) has increased during the recent years. Many of the fatty acids can be synthesized by humans, but there is a group of PUFA, the essential fatty acids, that the human body cannot produce: omega-3 and omega-6 fatty acids. The parent omega-6 fatty acid is linoleic acid (C18:2n-6, LA), arachidonic acid (AA, 20:4n-6), and g-linolenic acid (GLA, 18:3n-6) and the parent omega-3 fatty acid is α -linolenic acid (C18:3n-3, ALA) docosaheaxaenoic acid (DHA, 22:6n-3), stearidonic acid (SDA, 18:4n-3). Both omega-3 and omega-6 PUFA are precursors of hormone like compounds known as eicosanoids, which are involved in many important biological processes in the human body. Fish species and algae are rich sources of omega-3 fatty acids. Application of fish oil and especially fish oil concentrates as food ingredients has been restricted by the limited availability of high quality oils which have no smell and taste and a reasonable shelf life and major concerns for the consumer has been the negative discussion about mercury content in fish and fish products as well as other environmental contaminants such as dioxins and PCBs. Alternatively to animal sources, these fatty acids can be found in various amounts in some plant sources. Seed oil of *Echium vulgare* which is one of these plant sources highly contain PUFA's like ALA, GLA and SDA.

SDA is a PUFA that constitutes the first metabolite of ALA, in the metabolic pathway leading to C20-22 PUFA, such as EPA and DHA. SDA increased EPA more efficiently than ALA. GLA produced in the body from desaturation of LA by the reaction catalyzed by enzyme Δ 6-desaturase and GLA is rapidly elongated to DGLA by elongase enzyme. GLA can be converted into AA, and this reaction is catalyzed by Δ 5-desaturase enzyme.

Echium seed oil has a very unique ratio of omega-3 to omega-6 fatty acids. *Echium* oil has many potential uses in the pharmaceutical industry for treatment of eczema, acne, and other skin disorders and in the cosmetic and personal care products industry.

In this study, production of GLA and SDA concentrates from *Echium vulgare* seed oil by urea complex fractionation and enzymatic esterification was optimized. Urea fractionation experiments were carried out at +4 °C according to a two-factor, three level face centered central composite design points. The effect of independent variables such as urea-to fatty acid ratio (w/w) and crystallization time (h) on the GLA and SDA content of the obtained products (response) were investigated and reaction conditions of urea inclusion were optimized using response surface methodology (RSM) and the optimal model was developed. In the urea fractionation

of *Echium vulgare* seed oil fatty acids, the range of each variable was selected as follows; urea-to fatty acid ratio (w/w) of 3-5, crystallization time (h) of 8-24. Optimal conditions were determined as urea-to fatty acid ratio (w/w) 5, crystallization time (h) 8. Under the optimum conditions SDA concentration was increased from 13.3% to 28%, GLA concentration was increased from 11.6% to 24.6 and the amount of total GLA and SDA fatty acids was found to be 52.6%. A good quadratic model was obtained with a satisfactory regression coefficient (R^2) found as 0.85.

In the second part of the study, enrichment free fatty acids with PUFA by immobilized lipases was carried out by two-step process. The first step is the preparation of FFAs by hydrolyzing *Echium vulgare* seed oil with lipase Novozyme 435. The second step is the enrichment of PUFA in the FFA fraction by esterification of the resulting FFAs with alcohol using a lipase Lipozyme RMIM. Enzymatic esterification experiments were carried out according to three-factor, three level face centered composite design. The effect of independent variables such as lauryl alcohol-to fatty acid ratio (mol/mol), reaction time (h) and reaction temperature ($^{\circ}\text{C}$) on the GLA and SDA content of the obtained products (response) were investigated and reaction conditions of enzymatic esterification reactions were optimized using the response surface methodology (RSM). In the enzymatic esterification of *Echium vulgare* seed oil fatty acids, the range of each variable was selected as follows; lauryl alcohol-to fatty acid ratio (mol/mol) of 1:1-3:1, reaction time (h) 8-16 and reaction temperature $50\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Under the optimum conditions GLA concentration was increased from 11.9% to 28.2%, SDA concentration was increased from 16.5% to 32.3% and amount of total GLA and SDA fatty acids was found to be 60.5% with a 72.3% yield. A good quadratic model was obtained with a satisfactory regression coefficient (R^2) as 0,85.

Under the optimum conditions, to further increase the GLA and DHA content, unesterified FFAs recovered from enzymatic esterification reaction mixture and then applied to urea fractionation reactions performed under optimal conditions, urea-to fatty acid ratio (w/w) 5, crystallization time (h) 8. GLA concentration was increased from 28.5% to 35.2%. SDA concentration was increased from 32.3% to 40.5% and amount of total GLA and SDA fatty acids was found to be 75.7%.

In conclusion, the GLA and SDA enriched products was obtained from *Echium vulgare* seed oil. This concentrates are known to have beneficial effects on health could be used as food ingredients or functional foods, as dietary supplements, as pharmaceuticals or in personal care products.

1. GİRİŞ

Son yıllarda insan beslenmesinde ve bazı hastalıkların önlenmesinde çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA) önemi artmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar ile ÇDYA'ların enflamasyona, kardiyovasküler hastalıklara, bazı kanser türlerine, nörolojik rahatsızlıklara olumlu etkilerinin olduğu belirlenmiştir. ÇDYA'lar içinde en önemlileri omega-3 ve omega-6 yağ asitleridir. Soya, mısır, ayçiçek, aspir tohumu yağı omega-6 yağ asitleri bakımından zengin iken, omega-3 yağ asitleri açısından en zengin kaynaklar balık ve alglerdir. Günümüzde omega-3 kaynağı olarak balıklarla ilgili sorunlar artmaktadır. Metilciva ve poliklorlu bifenil (PCB) gibi çevre kirlilikleri taşıdıkları için çocuklar, hamile kadınlar ve emziren kadınlar için civa intoksikasyonu açısından risk taşımaları, dünya balık stoklarının giderek azalması, vejeteryan tüketimin artması, balık yağlarında istenmeyen kokunun bulunması, kolay okside olabilmesi nedeniyle balık ve balık yağı tüketimi azalmakta olup, omega-3 yağ asitleri bakımından zengin bitkisel kaynaklara eğilim artmaktadır. Bu nedenle, balık yağına alternatif kaynak arayışı ve yeni ürünlerin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Mevcut esansiyel yağ asidi kaynaklarına alternatif arayışı içinde farklı bitkilerin yağ asidi profilleri incelenmekte ve yeni bitkiler zengin yağ içerikleri ile önem kazanmaktadır.

Echium vulgare (engerek otu) tohum yağı sahip olduğu yağ asidi kompozisyonu ve omega-3, omega-6 oranıyla diğer bitki yağlarına göre benzersiz bir yağdır. *Echium vulgare* tohum yağı, ilaç sanayinde egzema, akne gibi cilt hastalıklarının tedavisinde ve diğer bazı cilt rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılma potansiyeline sahiptir. *Echium vulgare* yüksek α -linolenik asit (ALA, 18:3n-3), stearidonik asit (SDA, 18:4n-3) ve γ -linolenik asit (GLA 18:3n-6) içeriği bakımından diğer *Echium* türleri arasında öne çıkmaktadır. *Echium vulgare* %10-12 oranında SDA, %10-12 oranında GLA ve %30-40 oranında ALA içermektedir. SDA, ALA'nın eikosapentaenoik asit (EPA, 20:5n-3) ve dokosaheksanoik asite (DHA 22:6n-3) dönüşmesi aşamasında ilk metabolit olup ve ALA'ya kıyasla daha yüksek oranda EPA'ya dönüşebildiği belirlenmiştir.

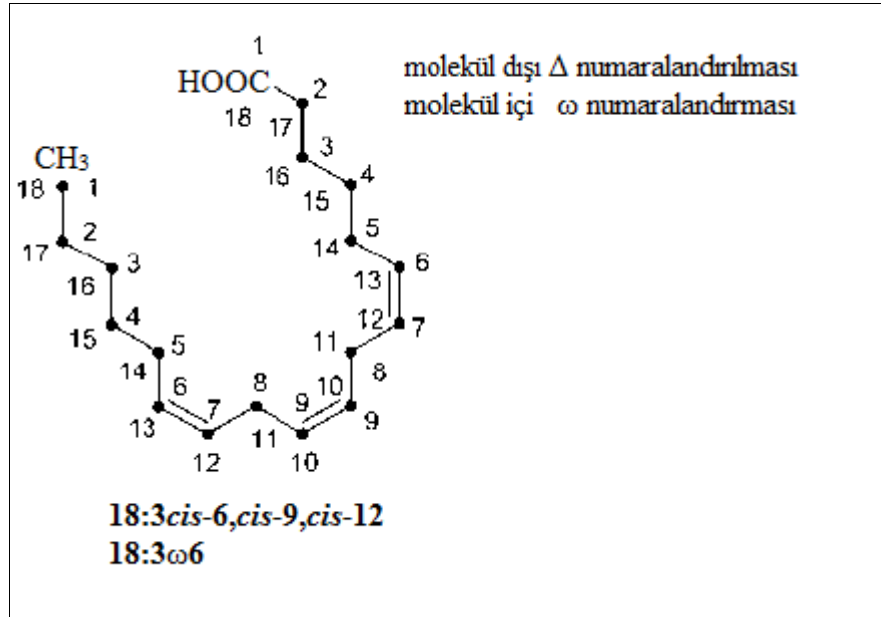
Günümüzde beslenme ve hastalıkların önlenmesinde önemi anlaşılan çoklu doymamış yağ asitleri ile zenginleştirilmiş gıda ürünleri üretimi Avrupa ve Amerika'da hızla yaygınlaşmıştır. Balık ve balık yağlarından elde edilen omega-3 yağ asidi konsantreleri fonksiyonel gıda üretiminde, besin takviyesi olarak ve tedavi edici olarak insan tüketimine sunulmuştur. Klinik uygulamalar için genellikle konsantre balık yağları, özellikle balık karaciğer yağları (morino, pisi balığı), kapsüllenmektedir. Omega-3 yağ asitleri ile zenginleştirilmiş ekmek ve diğer fırıncılık ürünleri, süt ve süt ürünleri, sürülebilir yağ, et ve et ürünleri, meyve suları ticari olarak üretilmektedir. ÇDYA konsantresi üretimi için farklı prensiplere sahip, uygulanan çeşitli yöntemler vardır. Bunlardan bazıları, üre fraksiyonlama yöntemi, enzimatik yöntem, düşük sıcaklıkta kristalizasyon yöntemi, süperkritik akışkan yöntemi, moleküler distilasyon yöntemi, kromatografik yöntemdir.

Bu çalışmada ülkemizde ve dünyada yaygın olarak bulunan fakat yeterince yararlanılmayan *Echium vulgare* bitkisinin tohum yağından, üre fraksiyonlama, enzimatik hidroliz ve enzimatik esterifikasyon yöntemi kullanılarak, omega-3 ve omega-6 konsantresi üretimi amaçlanmaktadır. Çalışmada üre fraksiyonlama (yağ asidi/üre oranı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı) ve enzimatik yöntem (reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı) ile ÇDYA konsantresi üretimi üzerine etkisi olan parametrelerin etkisinin araştırılması ve optimum koşulların Tepki Yüzey Yöntemi ile saptanarak reaksiyon koşullarının modellenmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Çoklu Doymamış Yağ Asitleri

Çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA), karbon atomları arasında iki veya daha fazla çift bağ bulunduran, 18 veya daha fazla karbon atomuna sahip olan yağ asitleridir. Omega-3 ve omega-6 olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Gebauer ve ark., 2005). IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemist) standardına göre ÇDYA'lar sistematik olarak isimlendirilir. Şekil 2.1'de ÇDYA'ların IUPAC standardına göre Δ ve ω isimlendirilmesi gösterilmektedir (O'Keefe, 2002).



Şekil 2.1: IUPAC standardına göre Δ ve ω isimlendirilmesi (O'Keefe, 2002).

Sistematik isimlendirmede yağ asidi ile aynı sayıda karbon atomundan oluşan hidrokarbonun karbon sayısının latin alfabesinden türetilen sistematik ismi esas alınır ve bu ismin sonundaki 'an' eki kaldırılıp enoik eki getirilir, çok sayıda çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinde de enoik ekinden önce 'dien, trien, tetraen, pentaen, hekzaen' gibi takılar getirilerek isimlendirme tamamlanmış olur. Zincirdeki karbon atomları karboksil grubundan başlanarak numaralandırılır. Sistematik

isimlendirmede asidin molekül yapısının da açıklanması ilke olarak benimsenmiştir. Doymamışlığın hangi karbon atomunda olduğu belirtilir. Doymamışlığı belirtmek üzere ‘ Δ ’ işareti kullanılır ve yapıdaki çift bağların yeri bundan sonra söylenerek, $\Delta^{9,12}, \Delta^{9,12,15}$ şeklinde ifade edilir. ÇDYA’ların kısaca gösterilmesi de mümkündür. Karbon zincirindeki karbon sayısı, içerdiği çift bağ sayısı yazıldıktan sonra zincirdeki karbon atomları metil grubundan (-CH₃) başlanarak numaralandırıldığında metil grubuna en yakın olan çift bağın bulunduğu yer belirtilerek isimlendirilir. Metil karbonu omega “ ω ” karbonu olarak adlandırılır ve ilk çift bağın bulunduğu ω karbonuna göre doymamış yağ asitleri ω -3, ω -6, ω -7, ω -9 gibi isimler alabilir (O’Keefe, 2002). Çizelge 2.1’de ÇDYA’ların sınıflandırılması yer almaktadır.

Çizelge 2.1: Çoklu doymamış yağ asitlerinin sınıflandırılması (Scrimgeour ve Harwood, 2007, Lobb ve Chow, 2008).

Grup	Sistematik İsim	Gösterim	Yaygın isim
Omega-3	9,12,15 Oktadekatrienoik asit	18:3(n-3)	α -linolenik asit (ALA)
	6,9,12,15 Oktadekatetraenoik asit	18:4(n-3)	Stearidonik asit
	5,8,11,14,17 Eikosapentaenoik asit	20:5(n-3)	EPA
	4,7,10,13,16,19 Dokosaheksaenoik asit	22:6(n-3)	DHA asit
	6,9,12,15,18,21 Tetrakosaheksanoik asit	24:6(n-3)	Nisinik asit
Omega-6	9,12 Oktadekadienoik asit	18:2(n-6)	Linoleik asit (LA)
	6,9,12 Oktadekatetraenoik asit	18:3(n-6)	γ -linolenik asit (GLA)
	8,11,14 Eikosatrienoik asit	20:3(n-6)	Dihomo- γ linolenik asit (DGLA)
	5,8,11,14 Eikosatetraenoik asit	20:4(n-6)	Araşidonik asit (AA)
	7,10,13,16 Dokosatetraenoik asit	22:4(n-6)	Adrenik asit

2.1.1 Omega-3 yağ asitleri

Başlıca önemli omega- 3 yağ asitleri arasında α -linolenik asit (ALA, 18:3n-3), eikosapentaenoik asit (EPA, 20:5n-3) dokosaheksanoik asit (DHA, 22:6n-3) ve stearidonik asit (SDA, 18:4n-3) bulunmaktadır (Gebauer ve ark., 2005). ALA, bitkilerde oleik asitten Δ 12 ve Δ 15 desaturaz enzimlerinin etkisiyle oluşmaktadır (Watkins ve German, 2002). Hayvanlarda omega-3 yağ asitlerinin üretilmesinde öncül metabolittir ve insanlar için esansiyel yağ asididir. Chia çekirdeği, nane (%60-70), keten tohumu (%55-60), kanola (~%10), soya fasulyesi (~%7), ceviz (~%13) gibi bitki yağlarından diyetle alınabilir (Li ve ark., 2003).

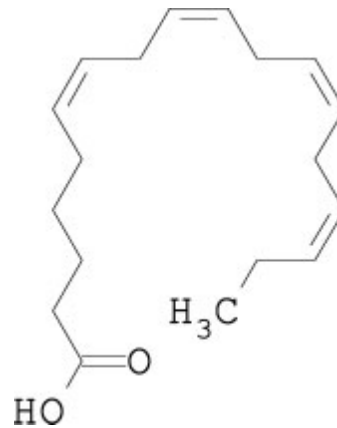
EPA ve DHA balık yağlarında yüksek oranda bulunan, birçok hastalığın önlenmesinde veya tedavi edilmesinde önemli etkileri olan omega-3 yağ asitleridir.

DHA hayvanlarda ve diğer memelilerde beyin ve retinada bulunur ve membran geçirgenliğini, membrana bağlı enzimlerin aktivitesini, iyon geçişlerini, sinyal iletimini düzenlemektedir (Li ve ark., 2005). EPA, kalp damar hastalıkları, hiperlipemi, bazı kanser türlerinin ve şizofreni tedavisinde önemli olan bir yağ asitidir (Ward ve ark., 2005).

ALA, EPA ve DHA'nın vücutta çeşitli hücrel farklılaşmayı ve büyümeyi etkileyen genlerin ekspresyonunu etkiledikleri; gen transkripsiyonu esnasında sinyal iletiminde görev aldıkları; eikosanoid adı verilen ve birçok hücrel fonksiyonu etkileyen metabolitleri oluşturdukları bilinmektedir (Gebauer ve ark., 2005). ALA eksikliğinde büyüme geriliği, pullu dermatit, cilt geçirgenliğinin artması, karaciğer yağlanması, böbrek hasarları ve üreme bozuklukları gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır. Yeni doğan, çocuk ve yetişkinler için omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin alınması önerilen günlük alım miktarı 0,5-1,6 g arasındadır (Chapkin, 2008).

2.1.1.1 Stearidonik asit

Stearidonik asit (SDA) (all-cis-6,9,12,15-oktadekatetraenoik asit) (C₁₈:4n-3), omega 3 ailesine ait çoklu doymamış bir yağ asididir. Yapısında 18 karbon atomu ve 4 çift bağ bulunmaktadır. 1960'larda bitkilerde varlığı tespit edilen SDA günümüzde birçok araştırmaya konu olmaktadır (Coupland, 2008). Şekil 2.2'de stearidonik asitin kimyasal yapısı görülmektedir. SDA, EPA ve DHA'nın metabolik sentezinde ALA Δ 6-desaturaz enzimi ile oluşan ara metabolittir. Kalp damar sağlığı için önemli olan ve iltihaplanmalara karşı etkisi bilinen EPA ve DHA'nın oluşumunda öncü metabolit olmasından dolayı dikkatleri üzerine çekmektedir (Gustone, 2001).



Şekil 2.2: Stearidonik asitin kimyasal yapısı (Guil-Guerrero 2007).

SDA, ALA'nın vücutta izlemiş olduğu metabolik yol sırasında oluşan ilk metabolit olup, insan sağlığı açısından büyük öneme sahip bir yağ asididir. Normal koşullar altında, vücutta ALA, SDA'ya daha sonrasında ise EPA ve DHA'ya dönüşmektedir. Yapılan çalışmalara göre SDA'nın vücutta ALA'ya göre daha kolay bir şekilde EPA'ya dönüşebildiği belirlenmiştir. Diyetle alınan SDA'nın EPA'ya dönüşümü, ALA'nın EPA'ya dönüşümünden daha etkilidir. Diyetle alınan 1g SDA, 300mg EPA'ya dönüşebilirken, dokularda aynı miktarda EPA konsantrasyonu için 4,3g ALA gerekmektedir (Guil-Guerrero ve ark., 2010). Ancak, ALA'nın EPA ve DHA'ya dönüşümünde bazı kısıtlamalar vardır. Dönüşüm oranını belirleyen enzim $\Delta 6$ desaturaz enzimidir. Dönüşümü engelleyen veya kısıtlayan sebepler ise $\Delta 6$ desaturaz enziminin aktivitesinin düşük olması veya enzimin inaktif olmasıdır. Buna neden olarak, kolesterol, trans ve doymuş yağ asitleri, yüksek alkol tüketimi, diyabet, stres, yaşlanma, sigara kullanımı, magnezyum ve çinko eksikliği gibi etmenler gösterilmektedir. Linoleik asit (LA, 18:2n-6), vücutta GLA sentezinde kullanılmak üzere $\Delta 6$ desaturaz enzimi için ALA ile yarışmakta ve bu sebeple de ALA'nın EPA'ya dönüşümü kısıtlanmaktadır (Guil-Guerrero ve ark., 2010; Clough, 2001).

SDA uzun zincirli omega-3 yağ asitleri gibi sağlığı koruyucu özellikler göstermektedir. Steraidonik asidin insan sağlığına olumlu etkileri ile ilgili yapılan çalışmalarda, SDA'nın cildi nemledirdiği, iltihaplı romatizmaya, kanser türlerine, aknelere, atopik dermatite, hipertrigliseridemiye olumlu etkileri olduğu tespit edilmiştir (Clough, 2001; Guil-Guerrero, 2007).

Harris ve ark. (2008)'nin yapmış olduğu çalışmada EPA ve SDA ile zenginleştirilmiş soya yağının kandaki EPA ve DHA (toplam omega-3 indeksi) miktarı üzerine etkisi karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda SDA ile zenginleştirilmiş soya yağı tüketen grubun omega-3 indeksinin diğerlerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre SDA'nın balık yağına alternatif bir kaynak olduğu ve kardiyovasküler hastalıklar üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir.

Diyetle alınan SDA, $\Delta 6$ desaturaz enziminin kısıtlayıcı etkisine maruz kalmadığı için, tümör oluşumunu engelleyici ajan olarak kullanılabilirliği konusunda umut vadetmektedir. SDA, AA'dan oluşan eikosanoidlerin oluşumunu da azaltmaktadır. Diğer yapılan çalışmalar ise SDA'nın GLA ile birlikte periferik kan lenfositlerinde ve monositlerinde EPA miktarını arttırarak bağışıklık sistemini güçlendirdiği

gözlemlenmiştir. Elde edilen bilgiler ışığında, SDA'nın tümörlere karşı olumlu etkisinin olduğunda tespit edilmiştir (Miles ve ark., 2004).

SDA soğuk su balıklarında, mikrobiyal yağlarda, bitki tohumlarında, genetiği değiştirilmiş bitkilerde bulunmaktadır (Coupland, 2008). SDA, balıklarda veya diğer deniz ürünlerinde toplam yağ asitlerinin % 0,5-2'sini oluştururken, EPA ve DHA % 15-20 seviyelerinde bulunmaktadır (Whelan, 2009). Ancak bazı uskumru (*Scomber scombrus*) balıklarının %7 oranında SDA içerdiği tespit edilmiştir (Frankel ve ark., 2002). Günümüzde omega-3 kaynağı olarak balıklarla ilgili sorunlar artmaktadır. Mevsimsel farklılıklar, çevre kirliliği, dünya balık stoklarının giderek azalması, vejeteryan tüketimin artması, balık yağlarında istenmeyen kokunun bulunması, kolay okside olabilmesi nedeniyle balık ve balık yağı tüketimi azalmakta olup, omega-3 yağ asitleri bakımından zengin bitkisel kaynaklara eğilim artmaktadır. Günümüzde balık yağına alternatif kaynak arayışı ve yeni ürünlerin geliştirilmesi yönünde çalışmalar yapılmaktadır (Guerrero ve ark., 2010; Whelan, 2009; Hjaltason, 2005).

Mikroalglerden *Isochrysis sp.* %26,8 oranında SDA içerirken, makroalglerden *Scytosiphon lomentarius* %18,8 ve *Micelophycus simplex* %20,1 oranında SDA içermektedir. Ancak, makroalglerde bulunan SDA miktarı yüksek olmasına rağmen sahip oldukları yağ miktarının çok düşük olması sebebiyle iyi birer SDA kaynağı olarak görülmemektedir (Guil-Guerrero 2007).

Tohum yağında SDA içeren az sayıda aile bulunmaktadır. Bu aileler; *Aracauriaceae*, *Boraginaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cannabaceae*, *Primulaceae*, *Saxifragaceae* ve *Loasaceae*'dir (Guil-Guerrero 2007). Stearidonik asit, *Echium* türlerinde (*E. vulgare* L.), kenevir tohumu (*Cannabis sativa* L., *Cannabaceae*) (% 2-3 oranında), frenk üzümü tohumu (*Ribes nigrum* L., *Grossulariaceae*) (%2 oranında) bulunmaktadır (Berti ve ark., 2007).

Tohumlu bitkilerden özellikle engerek otu türleri zengin SDA içeriği, hızlı gelişimi, çoğu yerde yetişebilmesi ve yenilenebilir kaynak olması bakımından günümüzde en çok ilgi duyulan ve araştırılan bitkilerdendir (Guil-Guerrero 2007).

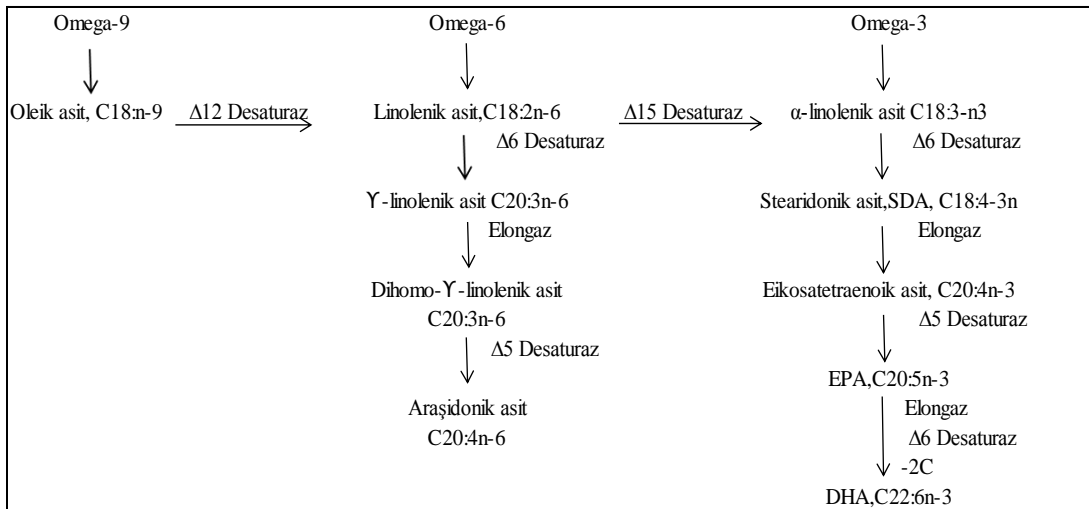
SDA, doğada bulunan bitki tohumlarının yanı sıra genetiği değiştirilmiş bitkiler yolu ile de elde edilmektedir. Ursin (2003)'nin yaptığı bir çalışmada kanola (*Brassica napus*) bitkisine, bir küf türü olan *Mortierella alpina*'dan elde edilen $\Delta 6$ and $\Delta 12$ enzimleri transfer edilmiştir. Kanola yağı SDA hiç içermezken, transgenik kanola yağında SDA oranı %23'e yükselmiştir. Toplam omega-3 yağ asidi içeriği %55'e

yükselirken (ALA+SA), toplam omega-6 yağ asidi içeriği (GLA+LA) %22 olarak belirlenmiştir.

2.1.2 Omega-6 yağ asitleri

Linoleik asit (LA, 18:2n-6), araşidonik asit (AA, 20:4n-6) ve gamma linolenik asit (GLA, 18:3n-6) başlıca omega-6 yağ asitleridir. LA, ALA ile birlikte ÇDYA'ların üretiminde birincil metabolittir. Tohum yağları LA asit bakımından oldukça zengindir (Watkins ve German, 2002). Soya, mısır ve ayçiçek yağında %50 oranında, aspir yağında ise %70'den fazladır (Scrimgeour ve Harwood, 2007). Yeni doğan bebek ve yetişkinler için, omega-6 çoklu doymamış yağ asitlerin günlük alım miktarı 4,4-17 g olarak önerilmektedir. (Chapkin, 2007). LA vücutta sentezlenemeyen, bu nedenle diyetle alınması gereken esansiyel yağ asidi olarak tanımlanır ve yeterli miktarlarda diyetle alınmaması kalp damar hastalıkları, hipertansiyon, iltihaplanma, bağışıklık hastalıkları, depresyon ve sinirsel fonksiyon bozuklukları gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur. LA ardışık desaturasyon ve elangasyon reaksiyonları sonucunda AA'ya metabolize olabilmektedir (Guil-Guerrero ve ark., 2010).

Omega-3 ve omega-6 ÇDYA'lar eikosanoidler (prostoglandin, tromboksan ve lökotrien) olarak bilinen hormon benzeri bileşiklerin öncü maddeleridir ve bu bileşikler insan vücudunda bazı önemli biyolojik reaksiyonlarda yer almaktadırlar (Shahidi ve ark., 1998). Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol Şekil 2.3'de görülmektedir.



Şekil 2.3: Omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinin vücutta izlediği metabolik yol (Scrimgeour ve Harwood, 2007).

2.1.2.1 Gamma linolenik asit (GLA)

Gamma linolenik asit (cis-6, cis-9, cis-12-oktadekatrienoik asit), omega-6 ailesine ait çoklu doymamış bir yağ asididir. Yapısında 18 karbon atomu ve 3 çift bağ bulunmaktadır (Kapoor ve Nair, 2005). Linoleik asidin $\Delta 6$ desaturaz enzimi ürünü olan GLA elongasyon reaksiyonu sonucunda di-homo gamma linolenik aside (DGLA, 20:3n-6) ve ardından $\Delta 5$ desaturaz enzimi ile araşidonik aside (AA, 20:4n-6) dönüşmektedir. DGLA'dan, siklooksigenaz (COX) enzimi ile prostoglandin E1 (PGE1) ve trombaksan A1 (TxA1) gibi anti enflamatuar, kan damarlarını genişleten, pıhtı oluşumunu önleyen bileşikler ile 15-LOX enzimi etkisiyle 15-hidroksiekosatrienoik asit (15-HETrE) oluşmaktadır. 15-HETrE, 5-LOX enzimini inhibe ederek AA'dan LTB₄ oluşumunu engeller. DGLA $\Delta 5$ desaturaz enzimi ile araşidonik aside dönüşmektedir. Diyetle aşırı miktarda LA alımı $\Delta 6$ desaturaz enzimini inhibe etmektedir. Bu durumda GLA ve DGLA'nın metabolik olarak üretimini inhibe etmektedir. DGLA siklooksigenaz (COX) ve lipoksigenaz (LOX) enzimleri için AA ile yarışmaktadır (Kapoor ve Nair, 2005). Bu enzimler ile üretilen DGLA ve AA'nın metabolitleri prostoglandin (PG), lökotrienler (LT) zıt etkilere sahiptirler. AA'dan türeyen PG ve LT'ler pro-enflamatuar iken, DGLA'dan türeyen PG ve LT'ler antienflamatuar özelliktedir (Kapoor, 2005).

GLA, hücre zarında bulunan fosfolipidlerin önemli bir bileşenidir. Şeker hastalığı, alkolizm, yüksek tansiyon, kanser, premenstural sendrom, kardiyovasküler hastalıklar, cilt hastalıkları, viral enfeksiyonlar, bağışıklık sistemi düzensizlikleri gibi bir çok hastalık üzerinde olumlu etki gösterdiği yapılan klinik çalışmalar sonucunda belirtilmektedir (Horribon, 1992).

GLA'nın insan sağlığına olan etkileri üzerine yapılmış çalışmalarda bu asidin deri ile ilgili çeşitli hastalıkların tedavisinde oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. Örneğin, egzema hastalarında $\Delta 6$ desaturaz enzimi eksikliğinden ötürü yüksek seviyede linoleik asit ve düşük seviye GLA varlığı saptanmış olup, bu hastalara GLA diyetinin uygulanması ile kaşıntının ve antihistaminik ilaç kullanım ihtiyacının azaldığı saptanmıştır. GLA içeren yağ ile romatizmal eklem iltihabının ve eklem sertleşmesi ve şeker hastalığında gözlenen nöropati şikayetininde tedavisi mümkün olabilmektedir (Horribon, 1992).

Yapılan çalışmalarda GLA'nın kolesterol metabolizmasını düzenlediği, toplam kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein konsantrasyonunu düşürecek ve yüksek

yoğunluklu lipoprotein metabolizmasını artıracak şekilde etkilediği belirlenmiştir. Bu çalışmalarda GLA'nın kan basıncını düşürücü etki gösterdiği bilindiğinden yüksek tansiyon hastalarına GLA ile zengin diyet uygulanması tavsiye edilmektedir (Horribon, 1992).

GLA'nın ayrıca bazı kanser türlerinde tümör gelişimini durdurduğu belirlenmiştir. GLA bakımından zengin akşam sefası (*Oenothera biennis*) bitkisi yağı ile beslenen fare ve memeli hayvanlarda, özellikle deri ve meme kanseri oluşumuna karşı GLA'nın etkin bir koruma sağladığı sonucuna varılmıştır (Ramesh ve Das, 1998). GLA'nın bütün bu olumlu etkileri, GLA ile zenginleştirilmiş ürünlere olan talebi artırmıştır. (Tso ve ark., 2012).

GLA, çeşitli miktarlarda *Aceraceae*, *Boraginaceae*, *Cannabinaceae*, *Liliaceae*, *Onagraceae*, *Ranunculaceae*, *Saxifragaceae* ve *Scrophulariaceae* ailelerine ait bitkilerde bulunmaktadır (Kapoor ve Nair, 2005). *Boraginaceae* ailesine ait 29 farklı bitki türünün tohum yağının incelendiği bir çalışmada %0-27 GLA, %0-56 ALA ve % 0-17 oranlarında SDA varlığı tespit edilmiştir. GLA yaygın olarak hodan bitkisi (*Borago officinalis L.*), akşam sefası bitkisi (*Oenothera biennis*), siyah kuş üzümü (*Ribes nigrum*) bitkisi tohumundan elde edilmektedir (Huang ve Ziboh, 2001). Son yıllarda GLA ve SDA üretimi için *Echium plantagineum* ve *Echium vulgare* tohum yağı yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Clough, 2001). Ayrıca GLA'nın *Mortierella spp.*, *Mucor spp.*, ve *Cynabacteria* gibi mikroorganizmalar tarafından da üretildiği tespit edilmiştir (Huang ve Ziboh, 2001). GLA ile zengin tek hücre yağının büyük ölçekli ticari üretimi ilk kez 1984 yılında GRAS statüsündeki bir küf olan *Mucor circinelloides*'in fermantasyon prosesi ile gerçekleşmiştir. GLA ile zengin olan bu yağın ticari adı Oil of Javanicus'dur. 1988 yılında Japonya'da *Mortierella isabellina* ve *Mortierella ramanniana* var. *Angulispora* küflerinin fermantasyonu sonucunda da büyük ölçekli GLA ile zengin ticari yağ üretimi başarılmıştır. Mikrobiyal kaynaklardan GLA ile zengin ticari yağ üretimi 1990 yılına kadar büyük ölçüde yapılmıştır. Ancak, GLA içeriği daha yüksek olan bitkisel kaynakların keşfedilmesi ve bu bitkisel kaynaklar ile daha ucuz üretimin başarılması ile mikrobiyal kaynaklardan yağ üretimi ve ticaretinde düşüş yaşanmıştır (Ratledge, 2001).

Günümüzde, GLA'nın ticari üretimi için hodan bitkisi yağı, akşam sefası bitkisi yağı ve siyah kuş üzümü bitkisi yağı kullanılmaktadır. Fonksiyonel gıda üretiminde GLA

için artan talep, GLA kaynağı olarak kullanılan yağların elverişliliğini artırmayı ve daha konsantre, daha düşük maliyetli üretimi gerektirmektedir. Bu nedenle transgenik bitki teknolojisi kullanılarak, yağlı bitki tohumlarından önemli miktarlarda GLA üretimi bitki biyoteknolojisi açısından önemli bir hedefdir (Tso ve ark., 2012). GLA yaygın olarak yağlı tohumların genetik modifikasyonları sonucunda üretilmektedir (Clough, 2001). Hodan (*Borago officinalis*) bitkisine ait $\Delta 6$ -desaturaz enzim genin soya bitkisine transferi ile üretilen transgenik soya bitkisinde LA'nın GLA'ya ve ALA'nın SDA'ya dönüşümü sağlanarak, tohumdaki toplam yağ asitleri içindeki GLA oranı %50'ye yükselmiştir. Benzer bir şekilde, yağ üreten bir küf olan *Pythium irregulare*'den $\Delta 6$ -desaturaz enzim geni *Brassica juncea* tohumuna transfer edilmiştir ve tohum yağındaki GLA oranı %40'a yükselmiştir. *Phaeodactylum tricorutum*'dan $\Delta 6$ -desaturaz ve *Physcomitrella patens*'den $\Delta 6$ -elongaz ve $\Delta 5$ -desaturaz genin keten tohumu (*Linum usitatissimum*)'na transfer edilmesi ile üretilen transgenik keten tohumu yağında C18-ÇDYA'larda önemli miktarda artış gözlenmiştir (%17 GLA ve %11 SDA) (Singh ve ark., 2005). Yapılan bir başka çalışmada ise hodan bitkisi (*Borago officinalis* L.), cDNA'sından kodlanan $\Delta 6$ -desaturaz enzim geni tütün bitkisine transfer edilerek oluşturulan transgenik tütün bitkisi yaprak yağında GLA ve octadekatetraenoik asit (C18:4; $\Delta 6,9,12,15$) miktarı toplam yağ asitleri içinde sırasıyla %13,2 ve %9,6'ya yükselmiştir (Sayanova ve ark., 1997).

2.2 Omega- 3 ve Omega-6 Yağ Asitlerinin Sağlık Üzerine Etkileri

Çoklu doymamış esansiyel yağ asitleri (ÇDYA), bilişsel öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını bağdaştırılmasında büyük önemi olan yağ asitleridir. ÇDYA'lar nöronal membranın yapısını ve fonksiyonunu koruyup, istikrarlı çalışmasını sağlamaktadır. ÇDYA'ların beyin üzerinde bazı etkileri vardır: fizikoloji (acı eşiği, ısı düzenleme), beyin biyokimyası (beyin nörotransmitter, kolesterol, miyelin, kortizon), merkezi sinir sistemi bozuklukları (alzheimer, epilepsi, MS (multiply sclerosis)). Bu fonksiyonlardan birçoğu idrak seviyesi üzerine etkilidir. ÇDYA'ların diyetle alındıkları miktarın bu fonksiyonlar üzerinde büyük öneme sahip olması yanında, alınan ÇDYA'ndeki n-3/n-6 oranının önemli olduğu belirtilmektedir (Yehuda, 2009).

Bütün dünyada beslenme alışkanlıklarının farklı olmasına rağmen, omega-3 yağ asidi toplam diyetle omega-6 yağ asidinden daha az alınmaktadır. Çizelge 2.2’de önemli omega-3 ve omega 6 kaynaklarını gösterilmektedir.

Çizelge 2.2: Omega-3 ve omega-6 yağ asitleri kaynakları (Howe ve ark., 2006, Harris, 2009, Kris-Etherton ve ark., 2002).

Yağ asidi tipi	Önemli kaynakları
Omega 3 yağ asitleri	
α -linolenik asid ALA,18:3(n-3)	Keten tohumu, ceviz, kanola, soya yağları.
Eikosapentaenoik asid (EPA), 20:5(n-3) Dokosahekzaenoik asid (DHA), 22:6(n-3)	Sardalya, somon balığı, ringa balığı, alabalık, tuna balığı, istiridye, balık yağları ve alglerden üretilmiş besin takviyeleri.
Dokosapentaenoik asid (DPA)	Balık yağları ve kırmızı et
Omega-6 yağ asitleri	
Linoleik asid, 18:2(n-6)	Ayçiçeği yağı, asipir yağı, mısır ve soya fasulyesi yağı
Gamma linolenic asid (GLA),18:3n-6	Akşam sefası, frenk üzümü, hodan bitkisi
Arşaidonik asid (AA), 20:4(n-6)	Et, kümes hayvanları eti, yumurta, süt ürünleri

Batı toplumlarında ‘Western societies’ balık tüketimi az olup, omega-3 ve omega-6 yağ asiti oranı 1:7 ve 1:50 arasında değişmektedir (Kris- Etherton ve ark., 2002). Bu beslenme şekli nedeniyle batı ülkelerinde kardiyovasküler rahatsızlıklar, kanser, inflamatur hastalıklar, osteoporoz ve bağışıklık sistemi rahatsızlıkları artmaktadır. Omega-3 yağ asidi alımı ile omega-6/omega:3 yağ asidi oranının düşürülmesi bu rahatsızlıkların ortaya çıkmasını baskılamaktadır (Simopoulos, 2006).

ÇDYA ile yapılan çalışmalarda tüketilen omega-3 ve omega-6 yağ asitleri oranının bu yağ asitlerinin sağlığa etkisi üzerinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Omega-3 yağ asitlerinin öncüsü olan ALA vücutta EPA’ya dönüşerek 3-series prostanoids ve 5-series leukotrienes oluşumunda öncül metabolitleri olurlar. Bu metabolitler enflamatur hastalıkları önleyici özelliktedirler. Aynı şekilde omega-6 yağ asitlerinden LA vücutta metabolize olarak eikosanoidlerin diğer bir öncüsü olan AA’ya dönüşür. Omega-6 yağ asitlerinin vücuda fazla alınması AA’in artmasına ve AA’ dan meydana gelen prostaglandinler (2-series prostanoids), trombaksanlar, lökatrienler (4-series leukotrienes) gibi pro-enflamatur eikosanoidlerin vücutta fazla üretilmesine neden olmaktadır. Bu maddelerin vücutta artması ağrı ve ateşin

artmasına, damar genişlemesine, alerjik rahatsızlıklara neden olmaktadır. Bu nedenle omega-6/omega-3 ÇDYA'nın tüketim oranı son derece önemlidir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu oranın 1:4 arasında olması tavsiye edilmektedir (Gebauer ve ark, 2005).

Bazı çalışmalar omega-6 ve omega-3 yağ asitlerinin kandaki kolesterol seviyesini azalttığını belirtmektedir. Fakat omega-6 ve omega-3 yağ asitlerinin kolesterol seviyesini azaltmadaki etkileri birbirinden farklıdır. Omega-6 yağ asitleri kolesterolü yeniden dağıtırlarken, omega-3 yağ asitleri kolesterol seviyesini nöronal membranda azaltırlar. Bu da kolesterol seviyesi yüksek olan bir insana neden omega-3 yağ asidi takviyesi alması gerektiğini açıklayabilir (Yehuda, 2009).

Epidemiyolojik çalışmalar ve klinik çalışmalar sonucunda omega-3 yağ asitlerinin kardiyovasküler rahatsızlıkları azalttığı belirlenmiştir. EPA+DHA 0.5-1.8 g/gün (besin takviyesi olarak veya balık yağlarından) alınması kalp rahatsızlıkları sonucu ölüm riskini azaltmaktadır. α -linolenik asid ise, 1.5-3 g/gün alındığında yararlı olmaktadır. Amerikan kalp birliğinin tavsiyesi haftada en az iki kez balık tüketilmesidir. Bu tavsiye α -linolenik asid içeriği yüksek keten tohumu, ceviz, kanola, soya yağları gibi bitkisel besin kaynaklarını da kapsamaktadır. Balıklar metilciva ve polikloro bisfenil (PCB) gibi çevre kirlilikleri taşıdıkları için çocuklar, hamile kadınlar ve emziren kadınlar için civa intoksikasyonu açısından risk taşımaktadırlar. Bu nedenle çevresel kontaminant içermeyen yüksek omega-3 yağ asidi içerikli besin takviyeleri almak ve bunların kullanımını yaygınlaştırmak önemlidir (Kris-Etherton ve ark., 2002).

2.3 *Echium vulgare* (Engerek Otu)

Hodangiller (*Boraginaceae*) ailesine ait olan *Echium* cinsi bitki, Akdeniz'de ve Atlantik okyanusun kuzey doğusunda yer alan bazı adalarda (Canary, Maderia, Azores ve Cabo Verde) yetişen iki yıllık, 30-60 cm boya sahip, yabancı olarak gelişmekte ve bahçe çiçeklendirilmesinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda *Echium* bitkisi, özellikle de *Echium plantagineum*, tohum yağının yağ asidi kompozisyonu nedeniyle dikkatleri üzerine çekmektedir. Hodan bitkisi ve akşam sefası bitkisi gibi yüksek miktarda GLA ve nadir rastlanan SDA içermektedir (Url-1). Engerek otu tohum yağı yağ asidi bileşimi ve sahip olduğu omega-3 ve omega-6 oranıyla diğer bitki yağlarına göre benzersiz bir yağdır. *Echium vulgare* tohum yağı, ilaç sanayinde

egzema, akne gibi cilt hastalıklarının tedavisinde ve diğer bazı cilt rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılma potansiyeline sahiptir. Ayrıca kozmetik ve kişisel bakım sanayinde de kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Echium* tohum yağının bölgesel uygulaması ile cilt kırıksıklıklarını azalttığı, cildi güneş ışığının zararlı etkilerinden koruduğu ve nemlendirdiği tespit edilmiştir. Amerika’da engerek otu yağı içeren krem ve bakım ürünleri bulunmaktadır (Berti ve ark., 2007). Ayrıca siyah kuş üzümü bitkisi yağı ve akşam sefası bitkisi yağı gibi besin tableti olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir (Url-1). İstilacı bir bitki olarak bilinen *Echium* bitkisinin Avrupa ve İngiltere’de tarımı yapılmaktadır (Berti ve ark., 2007). *Echium* yağı hipertriglisemi, kolon kanseri, astım, anoreksiya gibi hastalıklara olumlu etkisi olduğu bilinen balık yağına alternatif bir yağ olarak kabul edilmektedir (Coupland, 2008).

Guil-Guerrero ve ark. (2000)’nın Atlantik okyanusun kuzeydoğusunda yer alan bazı adalarda (Canary, Maderia, Azores ve Cabo Verde) yetişen 19 *Echium* türünü inceledikleri bir çalışma sonucunda *Echium* türlerinin GLA ve SDA üretimi için potansiyel yeni bir kaynak olduğu belirtilmiştir. Çizelge 2.3’de *Echium* türlerinin yağ asidi bileşimi görülmektedir.

Çizelge 2.3: *Echium* türlerinin yağ asidi bileşimi (Guil-Guerrero, J.L., 2007 Guil-Guerrero ve ark., 2001).

<i>Echium</i> Cinsi Bitki Türleri	% Yağ miktarları	16:0	18:0	18:1n-9	18:2n-6 (LA)	18:3n-6 (GLA)	18:3n-3 (ALA)	18:4n-3 (SDA)
<i>E. asperrimus</i>	18.7	7.7	2.8	14.7	16.3	9.6	35.3	11.1
<i>E. boissieri</i>	19.8	5.5	2.3	14.7	8.6	5.5	47.1	14.3
<i>E. creticum</i>	14.6	5.6	3.0	8.2	14.3	9.7	42.7	14.7
<i>E. italicum</i>	17.0	8.0	3.0	17.0	11.0	8.0	39.0	12.0
<i>E. lusitanicum</i>	20.6	6.7	2.5	16.4	16.4	10.9	33.3	12.3
<i>E. plantagineum</i>	30.0	7.0	4.0	17.0	15.0	10.0	34.0	13.0
<i>E. rubrum</i>	15.0	8.0	2.0	8.0	20.0	14.0	34.0	15.0
<i>E. russicum</i>	18.6	5.7	2.4	14.4	22.6	15.8	26.6	10.6
<i>E. sabulicola</i>	20.4	5.5	2.4	8.0	16.3	10.9	40.4	14.7
<i>E. fastuosum</i>	13.7	7.5	3.0	9.7	16.2	23.8	25.5	10.9
<i>E. flavum</i>	20.6	6.29	2.12	21.05	24.16	8.38	32.23	3.14
<i>E. humile</i>	6.63	7.28	3.95	17.18	24.43	7.95	31.21	5.88
<i>E. vulgare</i>	15.26	7.38	2.52	11.14	21.18	11.74	34.14	9.68

Ülkemizde Edirne’nin farklı bölgelerindeki doğal ortamlardan toplanan *Echium vulgare* tohumu yağ asidi bileşimi Çizelge 2.4’te görülmektedir.

Çizelge 2.4: Edirne'nin farklı bölgelerindeki doğal ortamlardan toplanan *Echium vulgare* tohum yağının yağ asidi bileşimi (Bilgiç, 2011).

Yağ asidi	16:0	18:0	18:1n-9	18:2n-6 (LA)	18:3n-6 (GLA)	18:3n-3 (ALA)	18:4n-3 (SDA)
(%)	7,9	4,8	16,2	15,3	32,8	10,2	12,2

2.4 Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin Konsantrasyonu

Son yıllarda sağlıklı yaşam bilincinin artması ile insan sağlığına önemli etkileri olan çoklu doymamış yağ asitleri konsantrasyonu üretimi ve tüketimi artmıştır. Balık ve balık yağlarından elde edilen omega-3 yağ asidi konsantrasyonu fonksiyonel gıda üretiminde, besin takviyesi olarak ve tedavi edici olarak insan tüketimine sunulmuştur. Klinik uygulamalar için genellikle konsantrasyon balık yağları, özellikle balık karaciğer yağları (morino, halibut), kapsüllenmektedir. Balık yağlarından üretilen bu konsantrasyon sayesinde, direkt balık yağı tüketimiyle alınan doymuş yağ asitleri ve kolesterolün olumsuz etkileri ile aşırı A ve D vitamini alımıyla oluşabilen toksik etki elimine edilebilmektedir (Shahidi, Wanasundara, 1998b; Hjaltason, 2006).

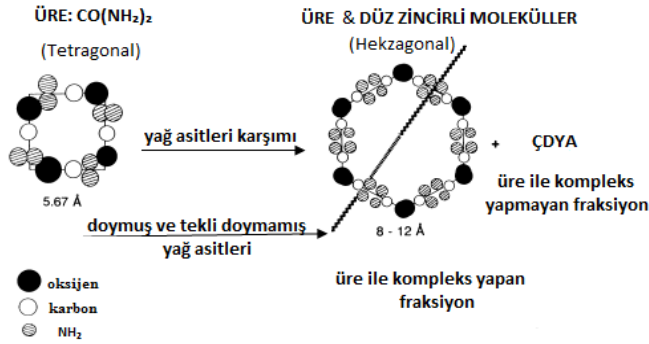
ÇDYA'lar doğal triaçilgliserol formunda konsantrasyon edilmektedir. Ayrıca serbest yağ asidi veya etil, metil esterleri ticari ürün olarak bulunmaktadır.

ÇDYA konsantrasyonu üretmek için birçok yöntem vardır. Bu yöntemlerin ancak bir kaç büyük ölçekte konsantrasyon üretimi için uygundur. Bunlar arasında, kromatografik yöntem, üre fraksiyonlama yöntemi, enzimatik yöntem, düşük sıcaklıkta kristalizasyon yöntemi, süperkritik akışkan yöntemi, moleküler distilasyon yöntemi veya fraksiyonel distilasyon yöntemi başlıca yöntemlerdir. Her yöntemin bazı avantaj ve dezavantajları vardır. Bahsedilen yöntemlerin prensipleri aşağıda detaylı olarak anlatılmaktadır.

2.4.1 Üre fraksiyonlama yöntemi

Eski bir yöntem olan üre fraksiyonlama yöntemi, ürenin 5,67 Å çapındaki zincirlerin tetragonal yapıda kristal oluşturmaya dayanmaktadır. Ancak üre, düz-uzun zincirli moleküllerin varlığında kristalleştiğinde $8 \pm 1,2$ Å çapındaki hegzagonal zincirlerle, hegzagonal yapıda kristal oluşturmaktadır. Düz-uzun zincirli moleküller bu yapının içinde korunmaktadır. Düz zincirli, altı veya daha fazla karbon atomuna sahip doymuş yağ asitleri kolayca üre ile birleşirken, karbon zincirindeki çift bağların varlığı molekül büyüklüğünü artırdığı için üre ile kompleks oluşumunu

engellemektedir (Shahidi ve Wanasundara 1998). Uzun zincirli yağ asitlerinin yokluğunda ve varlığında üre kristali oluşumu Şekil 2.4’de görülmektedir.



Şekil 2.4: Uzun zincirli yağ asitlerinin yokluğunda ve varlığında üre kristali oluşumu (Shahidi ve Wanasundara, 1998b).

Yağ asitlerinin üre içinde tutunmaları onların doymamışlık derecesine bağlıdır. Tekli doymamış yağ asitleri üre ile ikili doymamış yağ asitlerinden daha kolay kompleks oluştururken, ikili doymamış yağ asitleri ise üçlü doymamış yağ asitlerinden daha kolay kompleks oluşturmaktadır. Bu prosesi geliştirmek için yağ, KOH veya NaOH ile sabunlaştırılıp, HCl ile asitlendirilerek serbest yağ asitleri elde edilir. Ardından steroller, A ve D vitamini, ksenebiyotikler gibi sabunlaşmayan bileşenler ortamdaki uzaklaştırılır. En sonunda, serbest yağ asitleri bir alkol çözeltisi (metanol veya etanol) ve üre ile karıştırılıp, belirli bir dereceye kadar soğutulur. Doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri üre ile kolaylıkla kompleks oluşturup kristalleşir (Guil Guerrero ve ark., 2010). Soğutma ile oluşan kristaller filtrasyon ile ortamdaki uzaklaştırılabilmektedir. Üre ile kompleks oluşturmayan, sıvı fraksiyon çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleşir (Liu ve ark., 2006). Genellikle üre/serbest yağ asidi oranı 4:1 (ağ/ağ) olduğunda en iyi verim gözlenmiştir (Guil Guerrero ve ark., 2010).

Üre fraksiyonlama yöntemi yağ asitlerinin erime noktası, çözünürlük gibi bazı fiziksel özelliklerine bağlı olmayıp, yağ asidinin konfigürasyonuna, çift bağ içermesine bağlı olmasından dolayı bazı araştırmacılar tarafından yağ asidi konsantrasyonu üretimi için uygun bulunmuştur. Üre fraksiyonlama yöntemi ile oluşan kristallerin oldukça stabil olması ve filtrasyon işleminin düşük sıcaklıklarda yapılması gibi bir zorunluluğunun olmaması yöntemi avantajlı kılmaktadır (Wanasundara ve Shahidi, 1999). Çevre dostu, ortam koşullarında uygulanabilen bir yöntem olması, yenilenebilir, ucuz çözümlerin (üre, etanol veya metanol)

kullanılması yöntemin diğer avantajlarıdır. Üre fraksiyonlama yöntemi çoklu doymamış yağ asitleri konsantresi üretmek için basit ve verimi yüksek bir yöntemdir (Wu ve ark., 2008).

Wanasundura ve Shahidi (1999) tarafından yapılan bir çalışmada üre fraksiyonlama yöntemi ile fok balığı yağından omega-3 konsantresi eldesi için, üre/yağ asidi oranı (mol/mol), kristalizasyon sıcaklığı ve kristalizasyon süresi gibi bağımsız değişkenlerin etkisi incelenerek, en yüksek omega-3 konsantrasyonunu sağlayan koşulların optimizasyonu için üç değişkenli merkezli bileşik tasarım (Three-factor central composition rotatable design) (CCRD) yöntemi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda optimum reaksiyon koşulları; üre/serbest yağ asidi oranı 4,5 g/g, kristalizasyon süresi 24 saat ve kristalizasyon sıcaklığı -10°C olarak belirlenmiştir. Optimum koşullar altında elde edilen konsantre üründe maksimum omega-3 yağ asidi miktarının %88,2 olduğu belirlenmiştir.

Spurvey ve Shahidi (2000)'nin yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise hodan bitkisinden GLA konsantresi eldesi için optimum koşullar 3 faktörlü 3 seviyeli merkezli bileşik deney deseni ile belirlenmiş olup, bu koşullar; üre/serbest yağ asidi oranı 3,7 (ağ/ağ), kristalizasyon süresi 16 saat ve kristalizasyon sıcaklığı -7 °C'dir. Optimum koşullar altında %91 oranında GLA konsantresi elde edilmiştir.

Senanayake ve Shahidi (2000)'nin yapmış oldukları çalışmada deniz yosunu yağından DHA konsantresi eldesi için üre fraksiyonlama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde yağ asidi miktarı sabit tutulup, üre oranı değiştirilerek reaksiyon koşulları optimize edilmiştir. Optimum reaksiyon koşulları; üre/serbest yağ asidi oranı 3 (ağ/ağ), üre/etanol (%20 ağ/hac) ve kristalizasyon sıcaklığı 4°C, reaksiyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında deniz yosunu yağındaki doymuş ve tekli doymuş yağ asitleri uzaklaştırılarak elde edilen konsantre üründe DHA oranı %47,4'den %97,1'e yükselmiş ve verim %66,5 olarak belirlenmiştir.

Liu ve ark. (2006)'nin yapmış oldukları bir çalışmada, üre fraksiyonlama yöntemi ile tuna balığı yağından DHA ve EPA konsantresi eldesi için, üre:yağ asidi oranı (mol/mol), kristalizasyon sıcaklığı ve kristalizasyon süresi gibi bağımsız değişkenlerin etkisi incelenerek, en yüksek EPA ve DHA konsantrasyonunu sağlayan koşulların optimizasyonu için üç değişkenli merkezli bileşik tasarım (Three-factor central composition rotatable design) (CCRD) yöntemi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda optimum reaksiyon koşullarının; üre:yağ asidi oranı 15 (mol/mol),

kristalizasyon sıcaklığı -5°C ve kristalizasyon süresinin 20 saat olduğu belirlenmiş olup, bu koşullarda elde edilen konsantre üründe toplam EPA ve DHA'nın %85,02 olduğu ve ürün veriminin %25,10 olduğu belirtilmiştir.

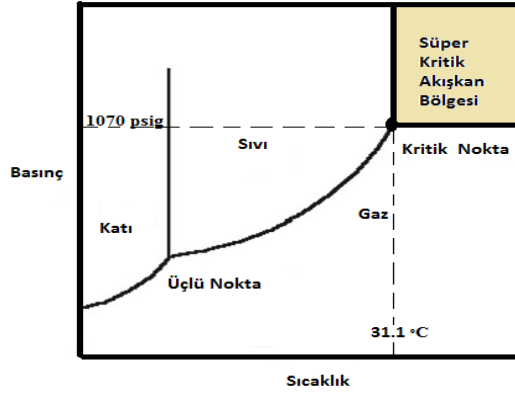
Wu ve ark. (2008)'nin yapmış olduğu bir çalışmada üre fraksiyonlama yöntemi ile ayçiçeği yağından linoleik asit konsantresi eldesi için optimum koşullar tepki yüzey metoduyla belirlenmiştir. Çalışmadaki optimum koşullar; üre/serbest yağ asidi oranı 0,94 (ağ/ağ), etanol/üre oranı 1:5 (hac/ağ), kristalizasyon sıcaklığı 18°C ve kristalizasyon süresi 5 saattir. Bu koşullarda elde edilen linoleik asidin %87,8 saflıkta olduğu ve verimin %83,4 olduğu belirlenmiştir.

Hai-bo ve ark. (2009)'nin yapmış olduğu bir çalışmada nane bitkisinden α -linoleik asit konsantresi eldesi için üre fraksiyonlama yönteminden yararlanılmıştır. Üre fraksiyonlama yöntemi kristalizasyon basamağı aşamalı soğutma uygulanarak yapılmıştır ve sonuçlar ortogonal karşılaştırma yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Optimum reaksiyon koşulları; üre/serbest yağ asidi oranı 3 (ağ/ağ), alkol: serbest yağ asidi oranı 7 (hac/ağ) ve kristalizasyon sıcaklığı 348°K , kristalizasyon süresi 690 dk olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında nane bitkisi yağından %91,5 α -linoleik asit içeren ürün elde edilmiştir.

Üstün ve Kent (2010)'in yapmış olduğu başka bir çalışmada ise alabalık yağından çoklu doymamış yağ asitleri konsantresi eldesi için optimum koşullar tepki yüzey metoduyla belirlenmiştir. Optimum reaksiyon koşulları; üre:serbest yağ asidi oranı 3,5 (ağ/ağ), etanol/üre oranı 5,6 (hac/ağ) ve kristalizasyon sıcaklığı 4°C , kristalizasyon süresi 4,8 saat olarak bulunmuştur. Bu koşullar altında alabalık yağından %88,1 çoklu doymamış yağ asidi içeren ürün elde edilmiştir.

2.4.2 Süper kritik akışkan ile ekstraksiyon yöntemi

Bir maddenin, basınç-sıcaklık faz diagramında, gaz-sıvı denge eğrisi üzerinde ileriye doğru hareket edilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artmaktadır (Şekil 2.5). Isıl genleşmeler nedeniyle, sıvının yoğunluğu azalırken; basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlar. Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşır, gaz ve sıvı arasındaki farklar kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık “akışkan” olarak adlandırılabilir. Böylece, maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının (T_c), basıncı ise kritik basıncının (P_c) üzerine çıkartıldığında katı, sıvı ve



Şekil 2.5: CO₂'nin sıcaklık ve basınç diyagramı (Shahidi ve Wanasadura, 1998b).

gaz fazlarından daha farklı, yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgedeki akışkan “süperkritik akışkan (SC)” olarak tanımlanır. İlk kez 1879’da Royal Society seminerlerinde (Londra) Hannay ve Hogart tarafından, bir katının yüksek basınçtaki gazda çözüldüğü, basınç düşürüldüğünde ise katının çöktüğü açıklanmıştır (Krukoniş 1998).

Süperkritik akışkanların fizikokimyasal özellikleri sıvılarla gazların özellikleri arasındadır. Bu özellik süperkritik akışkanların daha etkin bir çözücü olmasını sağlamaktadır. Süperkritik akışkanların yoğunlukları sıvıların, viskozite ve yayınlıkları ise gazlarınkine benzemektedir. Yoğunluğun artması ile süperkritik akışkanların çözme güçleri artmakta ve gazlara göre daha fazla madde çözebilmektedirler. Yayınlığın artması ve viskozitenin azalması ile süperkritik akışkanlar, katı yapıdaki gözeneklerde gazlar gibi kolayca yayınlabilmekte ve çözme güçleri artmaktadır (Nahar ve Sarker 2012).

Süperkritik akışkanların benzersiz çözümler özellikleri ilk olarak 100 yıldan daha önce kaydedilmiş olmasına rağmen, 80’ li yılların başında Avrupa, Amerika ve Japonya’da faaliyet gösteren birkaç büyük fabrika tarafından, kahve ve çayın dekafeinizasyonu, biracılıkta kullanılan şerbetçiotu aromasının ekstraksiyonu ve baharatlardan aroma ekstraksiyonu uygulamaları ile teknik ve endüstriyel alana giriş yapmıştır (Tülek ve Çolak, 2003). SCF günümüzde, rafine balık yağı üretiminde ve kolesterol, poliklorabifenil (PCB), E vitaminin ve diğer maddelerin ayrılmasında etkili olarak kullanılabilmektedir (Shahidi ve Wanasadura, 1998).

Süper kritik akışkan ile ekstraksiyon yöntemi, geleneksel çözümler ekstraksiyonu yöntemlerine göre bazı avantajları olan yeni bir yöntemdir.

1. Düşük viskozite, yüksek yayınelirlik özelliği ile katı madde içindeki gözeneklere sıvı çözücülerden daha etkili bir şekilde nüfus edebilmektedir. Hızlı kütle transferi nedeniyle daha iyi bir ekstraksiyon sağlamaktadır.
2. Sıvı-katı ekstraksiyonu saatler, günler sürebilirken süper kritik akışkan yöntemi ile ekstraksiyon dakikalar içinde yapılabilmektedir.
3. Basınç ve sıcaklık özellikleri değiştirilerek çözüme gücü değiştirilebilir, bu da akışkana yüksek seçicilik özelliği kazandırmaktadır. Değiştirilebilir çözüme gücü ile bitki materyalleri gibi kompleks materyallerin çözünmesinde yarar sağlamaktadır.
4. Süper kritik akışkan içinde çözülmüş maddeler basınç ortadan kaldırıldığında kolaylıkla ayrılabilir. Çok fazla zaman almayan, uçucu bileşiklerin kaybolmasını engelleyen bir yöntemdir.
5. Bu yöntem genellikle düşük sıcaklıklarda uygulanmaktadır. Sıcaklıkla bozulan maddelerin ekstraksiyonu için ideal bir yöntemdir.
6. Sıvı-katı ekstraksiyonunda 20-100 g örneğe ihtiyaç duyulurken, süperkritik akışkan yöntemi ile ekstraksiyonda 0,5-1,5 g örnek yeterli olmaktadır.
7. Kullanılan çözücü miktarı azdır ve çevreye zararı olmayan, çevre dostu çözücülerdir.
8. Bu yöntem sonuçları kromatografik yöntemle değerlendirilebilir. Böylece yüksek uçuculuğa sahip maddelerin ekstraksiyonu ve kantitatif olarak belirlenmesi kolaylaşmış olmaktadır (Lang ve Wai, 2001).

Genellikle yağlı tohumlar için, ılımlı kritik sıcaklık ve basınç değerlerine sahip, CO₂ (304 K, 7.38 MPa) kullanılmaktadır. CO₂, düşük toksisitesi, kimyasal bakımdan inört oluşu, çevreye zararı olmayan, ekonomik, kolay elde edilebilen, emniyet tedbiri gerektirmeyen bir madde olmasından dolayı tercih edilmektedir (Guil-Guerrero ve ark., 2010) Proseslerin çoğunda %90 oranında geri kazanılabilir ve tekrar kullanılabilir (Tülek ve Çolak, 2003). Çizelge 2.5'de süperkritik akışkan metodu ile çeşitli tohum yağlarından ve fungal yağdan GLA konsantresi üretimi özetlenmiştir.

Çizelge 2.5: SCF yöntemi ile çeşitli yağlar kullanılarak GLA konsantresi eldesi (Guil-Guerrero ve ark., 2010).

Yağ	Ekstraksiyon parametreleri	Yağ Konsantrasyonu (% kuru ağırlık)	GLA (Toplam serbest yağ asidi içinde%)
<i>Borage officinalis</i> tohum yağı	CO ₂ ,300 bar, 40 °C	31,0	16,9
<i>Borage officinalis</i> tohum yağı	CO ₂ ,300 bar, 60 °C	31,2	14,4
<i>Borage officinalis</i> tohum yağı	CO ₂ ,300 bar, 30 °C	17,7	15,6
<i>Borage officinalis</i> tohum yağı	CO ₂ ,300 bar, 40 °C	29	22,3
<i>Oenothera biennis</i> tohum yağı	CO ₂ ,300 bar, 40 °C	21	3,7
<i>Oenothera biennis</i> tohum yağı	CO ₂ ,200 bar, 60 °C	15	6,8
<i>Cunninghamella echinulata</i> fungal yağ	CO ₂ ,300 bar, 50 °C	26,4	9,9

2.4.3 Düşük sıcaklıkta kristalizasyon

Düşük sıcaklıkta kristalizasyon yöntemi ile fraksiyonlama yağ asitlerinin veya TAG'ların erime noktası farklılıklarına dayanan bir yöntemdir ve iki yolla yapılabilmektedir. Kuru kristalizasyon diğer adıyla düşük sıcaklıkta kristalizasyon yöntemi, yüksek erime noktasına sahip, doymuş yağ asitlerinin düşük sıcaklıklarda kristalleşip, uzaklaştırılması ile yağları çoklu doymamış yağ asitleri ile zengin hale getirmektedir. Diğer bir metot ise solvent kristalizasyonudur. Bu yöntemde metanol, aseton, hekzan gibi organik çözücüler kullanılarak fraksiyonlama gerçekleştirilmektedir (Shahidi ve Wanasundara, 1998).

Düşük sıcaklıkta kristalizasyon, 0°C üzerindeki sıcaklıklarda organik çözücüler içinde yüksek çözünürlüğe sahip, -80°C altında ise çok az çözünebilen triağlisiseroller (TAG), yağ asitleri, esterler ve diğer yağları ayırmak için kullanılan bir metottur. Yağların organik çözücü içerisindeki çözünürlükleri doymamışlık derecesi ve moleküler ağırlığına bağlıdır. Yağın doymamışlık derecesi arttıkça çözünürlüğü artarken, moleküler ağırlığı arttıkça çözünürlüğü azalmaktadır. Uzun zincirli, doymuş yağ asitleri, kısa zincirli yağ asitlerinden daha az çözünürlüğe sahipken, aynı zincir uzunluğuna sahip doymuş yağ asitleri ile tekli doymamış, ikili doymamış yağ asitleri karşılaştırıldığında ise doymuş yağ asitlerinin daha az çözünürlüğe sahip olduğu belirlenmiştir. *Trans* izomerler, *cis* izomerlere göre daha az çözünürlüğe sahipken, düz zincirli yağ asitleri dallanmış yağ asitlerine göre daha az çözünürlüğe sahiptir (Shahidi ve Wanasundara, 1998).

Yağ asitlerinin erime noktaları, yağ asidinin çeşidine ve doymamışlık derecesine bağlı olarak değişmektedir. Bu da doymuş yağ asitleri ile doymamış yağ asitlerinin ayrımını mümkün kılmaktadır. Doymuş yağ asitlerinin erime noktaları, doymamış yağ asitlerinin erime noktasından yüksektir. Düşük sıcaklıklarda, yüksek erime

noktasına sahip uzun zincirli doymuş yağ asitleri kristal hale gelerek çökerken, çoklu doymamış yağ asitleri sıvı formda kalmayı sürdürürler (Shahidi ve Wanasundara, 1998). Sıvı faz çok az miktarda doymuş yağ asidi içerir ve oleik faz olarak adlandırılır, kristal haline gelen kısım ise çok az miktarda doymamış yağ asidi içerir ve bu faz stearik faz olarak adlandırılmaktadır (Harroldson, 1984). Kristal haline gelen ve sıvı faz içinde bulanıklığa neden olan kısım buzdolabı sıcaklığında filtrasyonla uzaklaştırılmaktadır. Genellikle uygulanan prosedür; yağ 24 saatlik bir periyotta 6 °C'ye kadar yavaşça soğutulur. Daha sonra soğutma işlemi sonlandırılıp, son sıcaklıkta sıvı/katı karışımı 6-8 saat bekletilir. Ardından filtrasyon işlemi uygulanır (Guil-Guerrero ve ark., 2010).

Farklı organik çözücülerin ve sıcaklıkların kullanımı ÇDYA konsantrasyonu eldesini etkilemektedir. Bu nedenle ÇDYA konsantresi eldesi için uygun sıcaklık ve uygun çözücü kullanımı önemlidir (Brown, 1941).

Chen ve Ju (2001)'nin yaptığı çalışmada keten tohumu ve hodan yağından ÇDYA konsantresi elde etmek için düşük sıcaklıkta çözgen kristalizasyonu yönteminden yararlanılmıştır. Sıcaklığın, çözgen/serbest yağ asidi oranının ve çözgenin etkisinin incelendiği bu çalışmada, %30 oranında asetonitril ve %70 oranında aseton karışımının çözgen olarak kullanıldığı, çözgen/serbest yağ asidi oranının 30ml/g ve kristalizasyon sıcaklığının -80°C ve kristalizasyon süresinin 24 saat olduğu çalışma koşullarında hodan yağ asitleri içindeki GLA konsantrasyonu %62 verimle %23,4'den %88,9'e yükselirken, keten tohumu yağ asitlerindeki α -linolenik asit içeriği %24,9 verimle %55'den %85,7'ye yükselmiştir.

Vázquez ve Akoh (2012)'un yapmış oldukları bir çalışmada ise genetik modifiye soya fasulyesi yağında SDA konsantrasyonunun artırılması amaçlanmıştır. En yüksek SDA konsantrasyonu eldesi için optimum koşullar, hekzan:aseton (10:90,hac/hac), yağ:solvent %10, -80 °C'de 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında %44,5 SDA konsantresi %35,1 verimle elde edilmiştir.

2.4.4 Moleküler distilasyon metodu

Moleküler distilasyon yöntemi, çoklu doymamış yağ asitleri, vitaminler gibi sıcaklığa duyarlı moleküllerin ayrılmasında, konsantre edilmesinde ve saflaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir. Distile edilecek olan sıvı buharlaştırıcı silindirden geçip, buhar haline gelir. Buharlar, buharlaştırıcıya yakın bir yerde

konumlandırılmış olan soğuk yoğuşturucu üzerinde tekrar sıvı hale gelmektedir. Buharlaştırıcı içinde basınç düşüktür (yaklaşık 10^{-4} mmHg), bu nedenle buharlaşan moleküller kolayca yoğuşturucuya geçebilmektedirler. Düşük buhar basıncına sahip, ısı olarak stabil olmayan sıvıların distilasyonu, düşük bir sıcaklıkta (normal basınçtaki sıcaklıkla karşılaştırıldığında 200-250 °C düşürülmüş) ısı bir bozulma olmadan, sıcak yüzeye kısa süreli temas (10^{-1} . 10^1 s), küçük evaporator-yoğuşturucu mesafesinde (20–50mm) gerçekleşmektedir. Distile edilen sıvı ince bir film şeklinde (0.05–2 mm) silindirden aşağı doğru akmaktadır (Fregolente ve ark., 2006).

Bu yöntemde vakum altında, yağ asitlerinin kaynama noktalarının farklılığından ve moleküler ağırlıklarının farklılığından yararlanmaktadır. Moleküler distilasyon metodunda kısa süreli ısıtma yapılmakta ve düşük sıcaklıklarda çalışılmaktadır. Metil esterlerinin vakum altında fraksiyonel distilasyonunda yaygın bir şekilde kullanılan oldukça eski bir yöntem olan moleküler distilasyon yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duymaktadır (yaklaşık olarak 250 °C) (Shahidi ve Wanasundara, 1998).

Balık yağlarından omega-3 yağ asitlerinin triaçilgliserol (TAG) formunda konsantre edilmesinin güç olduğu belirlenmiştir. Distilasyon metodu yağ asitlerinin metil esterlerinde TAG'lara göre daha etkilidir. Ancak metot sadece DHA için başarılı sonuçlar vermiştir.

Uzun zincirli omega-3 yağ asitlerinin yüksek sıcaklıkta distile edilmesi sırasında yağ asitleri çeşitli reaksiyonlar (oksidasyon, polimerizasyon ve çift bağlarda izomerizasyon) sonucunda bozunmaya uğramaktadır. Bu problemi en aza indirebilmek için ince film buharlaştırıcı veya santrifüjlü damıtma aletleri kullanılabilir (Gibon, 2006). Omega-3 yağ asitleri konsantresi eldesi için bir metot tasarlandığında, ısı zararını önüne geçebilmek için düşük proses sıcaklığı ve kısa zaman koşulları dikkate alınmalıdır. Hodan bitkisi yağının lipaz enzimi ile GLA esterleri ile zenginleştirilmesi sonrasında yağ asitlerinin ayrılmasında da distilasyon metodundan yararlanılmıştır (Guil-Guerrero ve ark., 2010).

Stout ve ark. (1990)'ı balık yağlarından omega-3 yağ asitlerinin TAG formunda konsantre edilmesinin zor olduğunu belirtmişlerdir. Kompozisyonunda %16 EPA bulunan menhaden yağının distilasyon yöntemi ile konsantrasyonu sonucu bu oran %19,5'e yükselmiştir. Bununla beraber, etil esterlerinin distilasyonu sonucunda EPA konsantrasyonu % 15,9'dan %28,4'e yükselmiştir.

2.4.5 Kromatografik yöntem

Kromatografik yöntem yağ asitlerinin yüksek saflıkta elde edilmesi için yaygın bir şekilde kullanılan bir methodur (Shahidi ve Wanasundara, 2005). Yağ asitleri uygun adsorbanlar kullanılarak karbon sayılarına göre veya doymamışlık derecelerine göre ayrılabilir. Omega-3 ve omega-6 konsantresi üretimi için, genellikle DHA ve EPA, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gümüş-reçine kromatografisi, gümüş nitrat ile doyurulmuş silika jel kolonu, katyon değişimli Y-zeolit yataklı kolon, silisik asit kolon kromatografisi kullanılmaktadır (Shahidi ve Wanasundara, 1998).

Kromatografik yöntem yağ asitlerinin yüksek saflıkta elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Yağ asitlerini ayırmak için farklı tip adsorbanlar ve teknikler geliştirmiştir. Polar (normal faz) veya polar olmayan sabit faz (ters faz) kullanılan kromatografik yöntemler vardır. Yağ asidi metil esterleri (yağ alkoller, alkanolamitler, α -sülfonlu metil esterleri, diğer yağ esterleri) yağ asidi alternatifi olarak kullanılabilir. Metil esterleri, son üründe yüksek verim, saflık, ılımlı koşullarda elde edilebildikleri için yağ asitlerine tercih edilmektedir. Metil esterleri yağların alkali katalist, genellikle sodyum metoksit, varlığında metillendirilmesiyle elde edilebilir. İyonik olmayan, hidrofobik çapraz bağlı polimerler yağ asitlerinin seçici ayırımı gerçekleştirilebilir. Yağ asitleri öncelikle katı adsorban üzerinde tutulup, daha sonra uygun bir çözücü ile bağlandıkları yerden ayrılmaktadır (Shahidi ve Wanasundara, 2005).

Yapılan bir çalışmada, mikroalg olan *Schizochytrium*'un ürettiği triaçilgliseroller hareketli faz olarak aseton/asetonitril ve sabit faz olarak oktadesilsilan (ODS) kullanarak ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografisinde ayrılmıştır. Bu ayırma işlemi sabit faz ile yağ asitleri arasındaki van der Waals çekim kuvvetine dayanmaktadır (Shahidi ve Wanasundara, 2005).

Moleküler eleme yapabilen adsorbanlar doymuş, tekli, ikili doymamış yağ asitlerinin ayrılmasında ve konsantre edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda adsorban olarak zeolit kullanarak yağ asidi esterleri doymamışlık derecesine göre ayrılabilir (Shahidi ve Wanasundara, 2005).

Yapılan bir çalışmada gümüş nitrat ile doyurulmuş silika jel kolon kullanılarak, kalamar-ciğer yağından EPA metil esterleri %85-86 EPA %39 verimle ve DHA esterleri %95 – 98 DHA %48 verimle ayrılmıştır. Yapılan bir başka çalışmada ise

çizgili ton balığı göz çukuru yağından *n*-hekzan, dietileter/*n*-hekzan ve dietil eter kullanılarak silisik asit kolonu ile %74 saflıkta DHA izole edilmiştir (Shahidi ve Wanasundara, 1998).

Bu yöntem küçük ölçekli çalışmalar için oldukça uygun bir yöntem olmasına rağmen büyük ölçekli çalışmalar için pek uygun değildir. Kullanılan çözümlerin ve kromatografik kolonların pahalı olması, eğitilmiş personel ihtiyacı olmasından dolayı büyük ölçekli çalışmalar için alternatif yöntemlerin kullanılması daha uygundur (Guil-Guerrero ve ark., 2010).

Zıt akışlı kolan kromatografisi (CCC) veya santrifüj dağılımlı kromatografi (CPC) çoklu doymamış yağ asitlerinin konsantre edilmesinde önem kazanmış yeni bir yöntemdir. Bu yeni sıvı kromatografisi yönteminde, kompleks kimyasal bir karışımın sıvı-sıvı içindeki dağılımı ile ayırım yapılmaktadır. Birbirine karışmayan iki sıvı kullanılmaktadır. Sıvılardan biri sabit faz, diğeri ise hareketli fazdır. Buradaki ayırım, ayrılmak istenen maddenin bu iki fazdan birinde çözünmesiyle sağlanmaktadır. Bu yöntemde katı sabit fazın kullanılmaması ile, yüksek adsorplama özelliği olan katı fazın ayrılmak istenen maddeye geri dönüşümsüz olarak bağlanıp, verimi düşürmesi gibi dezavantajları ortadan kalkmış olmaktadır. Bu nedenle bu yöntemle ayırmada nerdeyse %100 verim elde edilebilmektedir (Shahidi ve Wanasundara, 2005).

2.4.6 Enzimatik yöntem

Lipazlar (EC 3.1.1.3.), triaçilgliseroller (TAG), diaçilgliserollere (DAG), monoaçilgliserollere (MAG), serbest yağ asitlerine ve gliserole hidroliz eden enzimlerdir. Bu enzimler hidroliz reaksiyonları yanında esterifikasyon, interesterifikasyon, asidoliz ve alkoliz reaksiyonlarını da katalizleyebilen çok yönlü enzimlerdir (Guil-Guerrero ve ark., 2010).

Yağ asitleri, lipaz enzimleri tarafından esterleştirilebilir ve hidrolize edilebilir. Düşük su aktivitesi koşullarında tersinir etki göstererek ester bağları sentezleyebilmektedir. Sıcaklık, su miktarı ve reaksiyon süresi, reaksiyon yönünü ve verimi etkilemektedir (Guil-Guerrero ve ark., 2010).

Lipazlar hayvansal, bitkisel, doğal veya genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalardan elde edilebilir. Lipazların en önemli avantajları katalizledikleri reaksiyonlarda spesifik ve yüksek seçici özellikte olmalarıdır. Farklı kaynaklardan elde edilen

lipazlar, farklı pozisyonel seçicilik ve yağ asidi seçiciliği gösterebilmektedir. Bu özelliklerine göre lipazlar beş farklı sınıfa ayrılır.

Birinci gruptaki enzimler herhangi bir pozisyonel seçicilik göstermezler. Yağ asidi tipi ve yağ asidi pozisyonuna bağlı olmadan, yağ asitleri hidrolizi rastgele gerçekleşmiş olur. *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* bu gruptaki mikroorganizmalardan elde edilen lipaz enzimlerine örnektir.

İkinci gruptaki enzimler 1,3 spesifik lipazlardır ve bu enzimler sadece sn-1 ve sn-3 pozisyonundaki ester bağlarına etki eder. Bu özelliklere sahip lipazlar, *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus arrhizus*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Humicola lanuginosa* mikroorganizmalarından ekstrakte edilebilir.

Üçüncü gruptaki enzimler, monoaçilgliseroller, diaçilgliseroller, triaçilgliseroller farklı oranlarda hidrolize edebilmektedir. Bu tür enzimlere fare ve insan dokularında rastlanmaktadır.

Dördüncü gruptaki enzimler, yağ asitlerine seçicilik göstermektedirler. Bu gruba örnek olarak *Geotrichum candidum* 'dan elde edilen hücre dışı lipazı örnek verilebilir. Doymamış cis-omega-9- yağ asitlerine seçicilik göstermektedir.

Beşinci gruptaki enzimler, sn-1 veya sn-3 pozisyonundaki yağ asitlerini daha yüksek hızda hidrolizler. Bu özellik stereo-spesifiklik olarak tanımlanmaktadır. Sütte bulunan lipoprotein lipazı, yağ doku, post-heparin plazma lipazları sn-1 pozisyonundaki ester bağlarına seçicilik gösterirken, insan ve farelerin dillerinden izole edilen lipaz enzimi sn-3 pozisyonundaki yağ asitlerine spesifiklik göstermektedir (Camp ve ark., 1998). Farklı kaynaklardan elde edilen triaçilgliserol lipazların seçicilikleri Çizelge 2.5'de gösterilmektedir.

Lipazlar, TAG'ların modifikasyonunda çeşitli şekillerde kullanılmaktadır. Lipaz enzimlerinin, organik sentezlerde sıklıkla kullanılmalarının başlıca nedeni, koenzimlere gerek duymadan yüksek sıcaklıklarda organik çözücülerle birlikte kullanıldıklarında stabil olmalarıdır. Lipazların 'pozisyonel seçicilik' ve 'yağ asidi seçiciliği' özelliği en çok yararlanılan özellikleridir. Bu özellikler sayesinde istenilen kimyasal kompozisyona ve yapıya sahip ürünler elde edilmektedir (Mukherjee, 2002).

Enzimatik yöntem ile omega-3 yağ asitleri üretimi geleneksel yöntemlere göre (kromatografik yöntem, moleküler distilasyon vb.) daha avantajlı bir yöntemdir. Bazı yöntemlerde gerek duyulan yüksek sıcaklık ve pH koşulları yağ asitlerinin oksidasyonuna, cis-trans izomerizasyonuna ve çift bağ migrasyonuna neden olmaktadır. Yüksek sıcaklık ve pH koşullarına gerek olmaması, ılımlı çalışma koşullarında enerji gereksiniminin az olması ve ürün seçiciliğinin olması önemli avantajlarıdır (Shahidi ve Wanasundara, 1998).

Çizelge 2.6: Farklı kaynaklardan elde edilen triaçilgliserol lipazların seçicilikleri (Mukherjee, 2002).

Lipaz kaynakları	Yağ asidi seçiciliği	Pozisyonel seçicilik
Mikroorganizmalar		
<i>Aspergellus niger</i>	K, O, U	sn-1,3 >> sn-2
<i>Candida antarctica</i>	K > O, U	sn-3
<i>Candida rugosa</i>	K, U > O	sn-1,2,3
<i>Chromobacterium viscosum</i>	K, O, U	sn-1,2,3
<i>Rhizomucor miehei</i>	K > O, U	sn-1,3 >> sn-2
<i>Penicillium roquefortii</i>	K, O >> U	sn-1,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	K, O, U	sn-1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	K, U > O	sn-1,2,3
<i>Rhizopus delemar</i>	K, O, U	sn-1,2,3
<i>Rhizopus oryzae</i>	O, U > S	sn-1,3 >> sn-2
Bitkiler		
Kolza tohumu (<i>Brassica napus</i>)	K > O, U	sn-1,3 >> sn-2
Papaya (<i>Carica papaya</i>)		sn-3
Hayvansal dokular		
Domuz pankreası	K > O, U	sn-1,3
Tavşan midesi	K, O, U	sn-3

K; Kısa zincirli, O; Orta zincirli, U;Uzun zincirli yağ asidi.

Enzimlerin katalitik aktivitelerinin yüksek olması, reaksiyonlarda az miktarda enzimin yeterli olması, immobilize enzimlerin tekrar tekrar kullanılabilmeleri diğer avantajlarındandır (Haraldson ve ark., 1997). Ayrıca, beslenme açısından serbest yağ asitleri ve yağ asitlerinin metil veya etil esterlerinden daha faydalı olduğu bilinen açilgliserol formunda omega-3 konsantresi üretimine olanak sağlaması diğer önemli bir avantajıdır (Shahidi ve Wanasundara,1998).

Bazı lipazların, belirli yağ asitlerine gösterdiği seçicilik ve pozisyonel seçicilik özellikleri ile seçici hidroliz, transesterikasyon, interesterifikasyon reaksiyonları sonucu doğal yağlardan yağ asitlerinin veya yağ asidi esterlerinin konsantrasyonu

gerçekleşebilmektedir (Mukherjee, 2002). sn-1,3 spesifik lipazların kullanıldığı enzimatik interesterifikasyon reaksiyonları sonucunda üretilen kakao yağı benzerleri yağ ve anne sütü yağına benzer yağ üretimi endüstride yaygındır (Xu, 2000).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, mikrobiyal lipazların kullanılarak balık yağlarının enzimatik hidroliz, esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonları sonucu yağ asitlerinin konsantre edilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (Rubio-Rodríguez, 2010).

Hills ve ark. (1990)'ı morino balık yağından DHA konsantresi ve akşam sefası bitkisinden GLA konsantresi elde etmek üzere enzimatik yöntemden yararlanmıştır. Kolza tohumundan (*Brassica napus L.*) ve *M.miehei*'den elde ettikleri GLA ve DHA'ya karşı seçici olan lipazları kullanarak morino balığı yağ asitlerinin ve akşam sefası bitkisi yağ asitlerinin *n*-butanol ile selektif esterifikasyon reaksiyonu sonucunda, esterlenmemiş yağ asitleri fraksiyonunda, morino balık yağından %45 DHA içeren ve akşam sefası bitkisinden %85 GLA içeren konsantre ürün elde etmişlerdir.

Rahmatullah ve ark. (1994a), *Candida cylindracea* lipazı kullanarak akşam sefası ve hodan tohum yağlarını hidroliz ettiklerinde, reaksiyon sonucunda hidroliz olmamış açilgliserollerde GLA'yı konsantre etmişlerdir. Akşam sefası tohum yağında başlangıçta %9,4 oranında mevcut olan GLA'nın hidroliz olmadan kalan TAG'larda %46,5'e yükseldiği; hodan yağının aynı koşullarda kısmi hidrolizinde ise başlangıçta hodan yağında %20,4 oranında mevcut olan GLA'nın reaksiyon sonunda TAG fraksiyonunda %47,8 değerine eriştiğini belirlemişlerdir.

Rahmatullah ve ark. (1994b)'nin yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise hodan (*Borago officinalis L.*) ve akşam sefası (*Oenothera biennis L.*) bitki yağlarından kimyasal hidroliz ile elde edilen yağ asitleri, *Rhizomucor miehei*'den elde edilen immobilize enzim varlığında (lipozim) *n*-butanol ile esterleştirilmiştir. Enzimin öncelikle palmitik, stearik, oleik ve linoleik asit yağ asitlerini esterleştirdiği dolayısıyla GLA'nın esterleşmeyen yağ asitleri kısmında konsantre hale geldiğini belirlemişlerdir. Hodan ve akşam sefası bitkisi yağları ile yürütülen bu çalışma sonucunda, içerisinde %93 ve %75 GLA içeren esterleşmeyen yağ asidi fraksiyonları elde edilmiştir.

Foglia ve ark. (1995)'nin yapmış oldukları çalışmada silika jel üzerine immobilize *Geotrichum candidum*'dan elde edilen lipaz enzimi kullanılarak hodan yağından

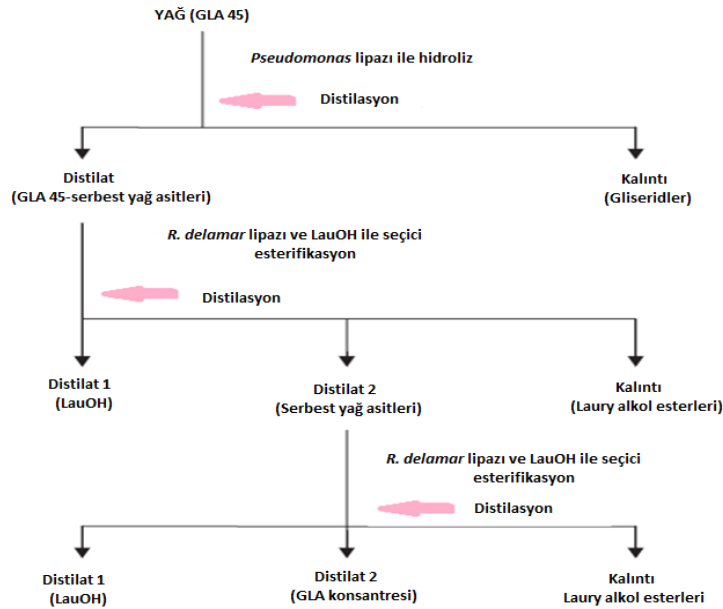
GLA konsantresi elde edilmiştir. Hodan yağının kimyasal hidroliziyle edilen yağ asitleri *Geotrichum candidum*'dan elde edilen lipaz varlığında 1-butanolle esterleştirilmiştir. Başlangıçta hodan yağında %25 oranında GLA mevcut iken, esterleşme sonunda esterleşmeyen yağ asitlerinde GLA oranı %70'e yükselmiştir. Elde edilen GLA ile zengin karışımda GLA yanında C-20 ve daha uzun uzun zincirli yağ asitlerinin bulunduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile bu enzimin özellikle uzun zincirli yağ asitlerine karşı seçicilik gösterdiği de ortaya konmuştur.

Huang ve ark., (1997)'nin yapmış olduğu bir çalışmada ise, hodan bitkisi yağından GLA konsantresi elde edilmiştir. Çalışmada, hodan bitkisi yağının *Candida rugosa*'dan elde edilmiş olan lipaz enzimi ile isooktan varlığında selektif hidroliziyle serbest yağ elde edilmiş, daha sonra bu yağ asitleri Lipozim IM 20 enzimi yardımıyla *n*-butanol varlığında esterleştirilmiştir. Son olarak, reaksiyon ürünleri olan hidroliz olmayan açilgliseroller ve esterleşmemiş serbest yağ asitlerinin Lipozim IM 20 enzimi ile asidolizi gerçekleştirilmiştir. Selektif hidroliz sonucunda hodan bitkisi yağının hidroliz olmayan açilgliserollerinde GLA miktarı %23,6'dan %51,7'ye yükselmiştir. Selektif esterikasyon sonucunda ise yağ asitleri içerisindeki GLA konsantrasyonu %87'ye yükselmiştir. Asidoliz reaksiyonu sonucunda açilgliserollerin %65 GLA içerdiği tespit edilmiştir.

Shimada ve ark. (1997)'nin yapmış oldukları çalışmada, tuna balığı yağından DHA konsantresi elde etmek için iki basamaklı enzimatik yöntem kullanılmıştır. İlk önce balık yağın *Pseudomonas*'dan elde ettikleri lipaz enzimi ile hidrolize etmişlerdir. Daha sonra çoklu doymamış yağ asitleri üzerine zayıf etkisi olan bir alkol varlığında (lauril alkol) *R. delemar* ile seçici esterifikasyonu sonucunda tuna balığından elde edilen yağdaki DHA konsantrasyonu %23'den %65-%68'e yükselmiştir.

Shahidi ve Wanasundara (1998), menhadan ve morino balık yağından omega-3 yağ asitleri konsantresi elde etmek için *Aspergillus niger*, *Candida cylindracea*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas* sp., *Rhizopus oryzae* ve *Rhizopus niveus*'dan elde ettikleri lipaz enzimlerini hidroliz reaksiyonlarında kullanmışlardır. Çalışma 35°C'deki 200 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda yürütülmüştür. En yüksek omega-3 konsantrasyonu morino balık yağında (%43,5) ve menhadan balık yağında (%44,1) *Candida cylindracea* lipazı ile 40 saat hidroliz reaksiyonu sonucunda elde edilmiştir.

Shimada ve ark. (1998)'nin yapmış oldukları bir başka çalışmada ise, GLA'nın büyük ölçekte saflaştırma prosesinde başlangıç materyali olarak hodan bitkisi yağının selektif hidrolizi sonucunda elde edilen %45 oranında GLA içeren yağ kullanılmıştır. Çalışmada GLA ile zengin yağ, seçici *Pseudomonas* lipazı ile hidroliz edilmiş ve elde edilen yağ asitleri distilasyon yöntemi ile diğer ürünlerden ayrılmıştır. Ardından, yağ asitleri *Rhizopus delemar* kaynaklı lipaz enzimi varlığında lauril alkolle selektif esterleştirilmiştir. Yağdaki GLA konsantrasyonu %22,5'ten %70,2'ye yükselmiştir. Daha yüksek GLA konsantresi elde etmek için ikinci bir esterifikasyon işleminin ardından yapılan distilasyon ve üre fraksiyonlama sonucunda %98,6 GLA içeren yağ asitleri ürünleri elde etmişlerdir. Şekil 2.6'da Shimada ve ark. (1998)'nin yapmış oldukları GLA'nın büyük ölçekte saflaştırılması için uygulanan hidroliz/esterifikasyon yöntemi proses basamakları gösterilmiştir.



Şekil 2.6: GLA'nın büyük ölçekte saflaştırılması için uygulanan hidroliz-esterifikasyon yöntemi proses basamakları (Shimada ve ark., 2001).

Üstün ve Akova (2002)'nin yapmış oldukları çalışmada ise hodan yağından GLA ile zengin ürünler elde edebilmek amacıyla, hodan yağının immobilize ve serbest çörekotu lipazı ile hidrolizi gerçekleştirilmiş ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Hidroliz reaksiyonu serbest enzim varlığında, tampon çözelti ortamında (pH:6), immobilize enzim varlığında ise, hekzan ortamında yürütülmüştür. Hodan yağının hekzan ortamında immobilize çörekotu enzimi ile 24 saat hidrolizi sonucunda, %50 verimle ve içerisinde %38 GLA bulunan, 1,73 kat GLA ile zenginleşmiş gliserid karışımı elde edilebileceği belirlenmiştir.

López-Martínez ve ark. (2006)'nın yapmış olduğu çalışmada *Borago officinalis* ve *Echium fastuosum* tohum yağları GLA ile zenginleştirilmiştir. Çalışma iki kısımdan oluşmuştur. Çalışmanın ilk basamağında her iki tohum yağı *R. delemar*, *Pseudomonas fluorescens*, *C. rugosa*'dan elde edilen serbest lipaz enzimleri ve *Alcaligenes* spp, *M. miehei* and *C. cylindracea*, *Mucor javanicus* ve *G. candidum*'dan elde edilen immobilize enzimler ile 250 rpm çalkalama hızına sahip 37°C'deki su banyosunda 48 saat enzimatik olarak hidroliz edilmiştir. *Borago officinalis* tohum yağının 48 saat hidrolizi sonucu en yüksek hidroliz oranı (%91,2) *C. rugosa*'dan elde edilen lipaz enzimi ile elde edilmiştir. *Echium fastuosum* tohum yağının ile 48 saat hidrolizi sonucu en yüksek hidroliz oranı (%80,4) *M. javanicus*'dan elde edilen lipaz enzimi ile elde edilmiştir. Çalışılan bütün enzimler *Borago officinalis* tohum yağının hidrolizini *Echium fastuosum* tohum yağının hidrolizinden daha yüksek oranda gerçekleştirmiştir. Bu durumun, *Echium fastuosum* tohum yağının LA, ALA, SDA gibi çoklu doymamış yağ asitlerini *Borago officinalis* tohum yağına göre daha yüksek oranda içermesinden dolayı kaynaklandığı düşünülmektedir. Her iki tohum yağının, çalışılan bütün lipaz enzimleri ile yapılan hidrolizi sonucu açığa çıkan yağ asitlerinde GLA konsantrisi gözlenmemiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında *B. officinalis* ve *E. fastuosum*'dan elde edilen tohum yağlarının kimyasal hidrolizi sonucu elde edilen yağ asitleri, hidroliz için kullanılan bütün enzimlerle 250 rpm çalkalama hızına sahip 40°C'deki su banyosunda lauril alkolle esterleştirilmiştir. *B. officinalis* tohum yağından elde edilen yağ asitlerinin *Candida rugosa* lipazı ile esterifikasyonu ile esterleşmemiş yağ asitlerindeki GLA oranı %59 verimle %91'e yükselirken, *E. fastuosum* tohum yağından elde edilen yağ asitlerinin *Mucor javanicus* lipazı ile esterifikasyonu ile esterleşmemiş yağ asitlerindeki GLA oranı %68 verimle %64'e yükselmiştir.

Okado ve Morrissey (2007)'in yapmış oldukları çalışmada sardalya balığı (*Sardinops sagax*) yağı omega-3 yağ asitlerince zenginleştirilmiştir. *Candida rugosa* (CR), *Candida cylindracea* (CC), *Mucor javanicus* (MJ) ve *Aspergillus niger* (AN) elde edilen lipazlar ile sardalya balık yağı hidrolize edilmiştir. CR lipaz ile en yüksek omega-3 konsantrasyonu sağlanmıştır. 250 U/g enzim ile 1,5 saat yapılan hidroliz sonucunda DHA konsantrasyonu %26,86'dan %33,74'e yükselirken, 500 U/g enzim ve 9 saat hidrolizi sonucunda EPA miktarı %13,2'den %29,94'e yükselmiştir.

Rincón-Cervera ve Guil Guerrero (2010)'nın yapmış oldukları çalışmada, *Echium plantagineum* yağı triaçilgliseroller (TAG), sabit faz olarak gümüş iyon-silikajel içeren normal faz kolon kromatografisinde ayrılmıştır. Ayrılan TAG fraksiyonu sn-1,3 spesifik pankreatik lipaz varlığında hidroliz edilmiştir. Böylece sn-2 pozisyonunda ÇDYA içeren TAG'lar elde edilmiştir. TAG içerisindeki yağ asitlerinin dağılımını belirlemek için yapılan bu çalışmada toplam yağ asitleri içinde SDA'nın %50 oranında sn-2 pozisyonunda olduğu belirlenmiştir. SDA'yı takiben ALA'nın %19 ve GLA'nın %18,5 sn-2 pozisyonunda olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 2.7'de enzimatik yöntemler ile ÇDYA konsantresi üretimi literatür özeti yer almaktadır.

Çizelge 2.7: Enzimatik yöntemler ile ÇDYA konsantresi üretimi literatür özeti.

Yağ	Lipaz Kaynağı	Reaksiyon	Yağ asidi	Referans
Morino balık yağı, akşam sefası bitkisi	<i>Brassica napus L.</i> , <i>M.miehei</i>	<i>n</i> -butanol ile selektif esterifikasyon	DHA GLA	Hills ve ark. (1990).
Akşam sefası bitkisi ve hodan bitkisi tohum yağı	<i>C.cylindracea</i>	Enzimatik Hidroliz	GLA	Rahmatullah ve ark. (1994a).
<i>Borago officinalis L.</i> <i>O. biennis L.</i>	<i>R. miehei</i>	Kimyasal hidroliz, <i>n</i> -butanol varlığında selektif esterleştirme	GLA	Rahmatullah ve ark. (1994b).
Hodan yağı	<i>G. candidum</i>	Kimyasal hidroliz, 1-butanol varlığında selektif esterleşme	GLA	Foglia ve ark. (1995).
Hodan bitkisi yağı	<i>C. rugosa</i> Lipozim IM 20	İsooktan varlığında selektif hidroliz, <i>n</i> -butanol varlığında esterleşme	GLA	Huang ve ark., (1997).
Tuna balığı yağı	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>R. delemar</i>	Hidroliz, Lauril alkol varlığında selektif esterifikasyon	DHA	Shimada ve ark. (1997).
Menhadan, morino balık yağı	<i>C. cylindracea</i>	Enzimatik Hidroliz	Omega-3 yağ asitleri	Shahidi ve Wanasundara (1998).
% 45 oranında GLA içeren hodan bitkisi yağ	<i>Pseudomonas R. delemar</i>	Enzimatik Hidroliz, Lauril alkol ile varlığında esterifikasyon	GLA	Shimada ve ark. (1998).
Hodan yağı	immobilize ve serbest çörekotu lipazı	Enzimatik Hidroliz	GLA	Üstün ve Akova (2002).
<i>Borago officinalis</i> ve <i>Echium fastuosum</i>	<i>C. rugosa M. javanicus</i>	Enzimatik Hidroliz, Lauril alkol varlığında selektif esterifikasyon	GLA	López-Martínez ve ark. (2006).

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Malzeme

Üre fraksiyonlama reaksiyonlarında kullanılan *Echium vulgare* tohumu Emorsgate Seeds (İngiltere), enzimatik yöntem reaksiyonlarında kullanılan *Echium vulgare* tohum yağı ise Harke Nutrition (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan lipaz enzimleri Novozyme 435 ve Lipozyme[®] RM IM ise Novozymes (Bagsvaerd, Danimarka) firmasından temin edilmiştir. Novozyme 435 ve Lipozyme[®] enzimlerinin aktiviteleri ürün spesifikasyonunda sırasıyla 10000 PLU/g ve 275 UIN/g olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO) ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılan çözelti ve kimyasallar kromatografik ve/veya analitik saflıktadır.

3.2 Yöntemler

Deneysel çalışmada öncelikle üre fraksiyonlama deneylerinde kullanılan *Echium vulgare* tohumlarından yağ eldesi ve elde edilen yağın karakterizasyonu için asit sayısı, kırılma indisi, sabunlaşma sayısı ve yağ asidi kompozisyonu tayini yapılmıştır. Daha sonra ise üre fraksiyonlama yöntemi ve enzimatik yöntemlerle çoklu doymamış yağ asidi konsantrisi eldesi gerçekleştirilerek tepki-yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir.

3.2.1 *Echium vulgare* tohumlarından yağ eldesi

Echium vulgare tohumlarından yağ eldesi için hekzan ile soğuk maserasyon yöntemi kullanılmıştır. Öğütülen engerek otu tohumlarından 10 gr tartılmış ve 100 ml hekzan ile 2 saat ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Daha sonra çözgen-tohum karışımı filtre kağıdında süzölmüştür. Çözgen döner buharlaştırıcıda kuruluğa kadar uçurulmuştur. Elde edilen yağ koyu renkli şişelere aktarılarak derin dondurucuda -18 °C'de saklanmıştır.

3.2.2 Yağın Karakterizasyonu

3.2.2.1 Asitlik tayini

Echium vulgare tohum yağlarında asitlik sayısı ‘TS EN ISO 660 Hayvansal ve Bitkisel Katı ve Sıvı Yağlar-Asitlik Sayısı ve Asitlik Tayini’ standardına göre yapılmıştır. Bu yöntemde göre yağ titrasyondan önce etanol-dietil eter çözeltisi içinde çözülür ve 0,1 N etanollü potasyum hidroksit çözeltisi ve indikatör (fenolfitaleyn) varlığında titre edilir (TSE, 2010). Asitlik sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$A.V = \frac{56.1 \times T \times V}{m} \quad (3.1)$$

V=Etanollü potasyum hidroksit sarfiyatı (ml)

T = Ayarlı etanollü potasyum hidroksit çözeltisinin derişimi (N)

m = yağ miktarı (gr)

3.2.2.2 Kırılma indisi tayini

Echium vulgare tohumlarından elde edilen yağın kırılma indisi Abbe refraktometresi ile (Veb Carl Zeiss Jena, Model G) oda sıcaklığında ölçülmüştür.

3.2.2.3 Sabunlaşma sayısı tayini

Echium vulgare yağında sabunlaşma sayısı tayini ‘AOAC 920.160 Katı ve Sıvı Yağların Sabunlaşma Sayısı’ resmi metoduna göre yapılmıştır. 2 gr tohum yağı üzerine 25 ml, 0,5N etanollü potasyum hidroksit ve kaynama taşları eklenerek 60 dk geri soğutucu altında kaynatılır. Süre sonunda 1ml fenolfitaleyn damlatılarak 05N HCl ile renk dönüşümü görülene kadar titre edilir. Sabunlaşma sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$S.V = \frac{56.1 \times T \times (V_o - V_1)}{m} \quad (3.2)$$

T= Ayarlı hidrolorik asit çözeltisinin derişimi (N)

V_o= Tanık için harcanan 0,5N HCl miktarı

V₁= Örnek için harcanan 0,5N HCl miktarı

m= Yağ miktarı (gr)

3.3 *Echium vulgare* Tohum Yağından Serbest Yağ Asitleri Eldesi

Echium vulgare tohumu yağından serbest yağ asitlerinin (SYA) eldesinde Senanayake ve Shahidi (1999)'nin uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yönteme göre 25 g yağ, 5,75 g KOH, 11 ml su ve 66 ml %95'lik sulu etanol (hacim/hacim) karışımı kullanılarak 1 saat boyunca 60 °C'de geri soğutucu altında sabunlaştırılmıştır. Süre sonunda karışıma 50 ml distile su eklenmiş ve ortamdan sabunlaşmayan maddelerin uzaklaştırılması için, karışım ayırma hunisinde 100 ml hekzan ile iki kez yıkanmıştır. Sabunlaşan kısmı içeren sulu fraksiyon 3N HCl ile pH 1 olana dek asitlendirilmiştir. Daha sonra karışım ayırma hunisine alınmış ve açığa çıkan yağ asitleri 50 ml hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Hekzan fazı susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra döner buharlaştırıcıda 40°C'de uzaklaştırılmıştır. Elde edilen serbest yağ asitleri kullanıma kadar -18°C'de saklanmıştır.

3.4 'Üre Fraksiyonlama' Yöntemi ile Yağ Asidi Konsantresi Eldesi

Echium vulgare tohum yağından çoklu doymamış yağ asitlerinin konsantresi eldesinde literatürden yararlanılarak reaksiyon koşulları belirlenmiştir. Bu yöntemde önceden elde edilen yağ asitleri, 'yağ asidi:üre:etanol' oranı 1:3-5:20, olacak şekilde 60°C'de geri soğutucu altında karışım homojen bir hal alıncaya dek (1 saat boyunca) karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım buzdolabında +4°C'de 8-24 saat arasında değişen sürelerde tutularak kristallendirilmiştir. Doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri üre kristalleri oluşturmuştur. Kristalizasyon sonrasında çoklu doymamış yağ asitlerini içeren karışım vakum uygulanarak derhal süzölmüş ve üre kristalleri 25 ml etanol ile yıkanmıştır. Filtrata eşit hacimde su eklenerek 6 N HCl ile pH 4-5 olana dek asitlendirilmiştir. Karışıma eşit miktarda hekzan eklenerek 1 saat boyunca karıştırılmış ve ayırma hunisine aktararak çoklu doymamış yağ asitlerini içeren hekzan fazı, üre içeren su fazından ayrılmıştır. Hekzan fazı, içinde kalabilecek üreyi ayırmak için önce distile su ile yıkanmış, sonra susuz sodyum sülfat ile kurutulmuştur. Döner buharlaştırıcı kullanılarak 40°C'de hekzanın uzaklaştırılmasının ardından örnek metillendirilmiştir.

3.5 Enzimatik Yöntem ile Yağ Asidi Konsantresi Eldesi

Echium vulgare tohum yağından çoklu doymamış yağ asidi konsantresi üretimi için, Shimada ve ark. (1997)'nin uyguladığı enzimatik hidroliz ve enzimatik

esterifikasyon reaksiyonlarını içeren iki basamaklı enzimatik yöntemden yararlanılmıştır.

3.5.1 Enzimatik hidroliz

Çalışmanın ilk aşamasında tohum yağından serbest yağ asitlerinin eldesi için *Candida antarctica*'dan elde edilen spesifik olmayan Novozyme 435 lipaz enzimi varlığında ile hidroliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Enzimatik hidroliz reaksiyonu; 2,5 g yağ 2,5 g su ve 275 IUN/g toplam substratın % 10'u kadar Novozyme 435 enzimi ile 250 rpm çalkalama hızına sahip 60 °C'deki su banyosunda 48 saatte gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda karışım filtre kağıdı ile derhal süzülüp enzimlerin ortamdaki uzaklaştırılması sağlandıktan sonra, gliseridlerin uzaklaştırılması için karışıma 100 ml hekzan ilave edilmiştir. Ayırma hunisine aktarılan karışımdan gliseridleri içeren hekzan fazı uzaklaştırılmıştır. Sabunlaşan kısmı içeren sulu fraksiyon 3N HCl ile pH 1 olana dek asitlendirilmiştir. Daha sonra karışım ayırma hunisine alınmış ve açığa çıkan yağ asitleri 100 ml hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Serbest yağ asitlerini içeren hekzan fazı susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra döner buharlaştırıcıda 40°C'de uzaklaştırılmıştır. Elde edilen yağ asitleri ikinci aşama olan esterifikasyon reaksiyonlarında kullanılmıştır. Hidroliz oranı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Dandik ve ark.,1993).

$$\text{Hidroliz \%: } 100 \times \frac{\text{Asit değeri (Hidrolize olmuş yağ-orjinal yağ yağın asit değeri)}}{\text{Sabunlaşma sayısı orjinal yağ - asit değeri (orjinal yağ)}} \quad (3.3)$$

3.5.2 *Echium vulgare* tohum yağı serbest yağ asitlerinin seçici esterifikasyonu

Enzimatik hidroliz reaksiyonları sonucunda elde edilen serbest yağ asitlerinin *Rhizomucor miehei*'den elde edilen sn-1,3 spesifik lipaz enzimi Lipozyme[®] RM IM ile lauril alkol varlığında selektif esterifikasyon reaksiyonları 4 g lauril alkol: yağ asidi karışımı (1:1-1:3 (mol/mol)), 1 ml su ve 3 ml hekzan varlığında reaksiyon sıcaklığı 50-60°C arasında ve reaksiyon süresi 8-16 saat arasında değişen sürelerde 250 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon koyu renkli 50 ml'lik cam şişelerde gerçekleştirilmiş olup, kullanılan enzim miktarı toplam substratın %10'u kadardır. Reaksiyon başlangıcındaki ve sonundaki asit değeri 0,1N KOH ile titre edilerek belirlenmiş olup esterifikasyon derecesi reaksiyon sırasında harcanan yağ asidi baz alınarak hesaplanmıştır (Shimada ve ark.,1997). Bütün reaksiyonlar iki paralel olacak şekilde yapılmış ve sonuçların ortalamaları alınmıştır.

3.5.3 Serbest yağ asitlerinin fraksinasyonu

Enzimatik esterifikasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen reaksiyon karışımı enzimlerin uzaklaştırılması için filtre kağıdı ile süzülmüştür. Karışıma 70 ml 0,5 N KOH (%30 etanollü) ilave edilip, ayırma hunisi yardımıyla 100 ml hekzan ile lauril alkol ve lauril alkol esterleri ayrılmıştır. Sabunlaşan kısmı içeren sulu fraksiyon 3N HCl ile pH 1 olana dek asitlendirilmiştir. Daha sonra karışım ayırma hunisine alınmış ve açığa çıkan yağ asitleri 100 ml hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Serbest yağ asitlerini içeren hekzan fazı susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra döner buharlaştırıcıda 40°C'de uzaklaştırılmıştır.

3.6 Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Üre fraksiyonlama ve enzimatik esterleştirme reaksiyonları sonucu elde edilen yağ asitleri AOAC 969.33 metoduna göre metillendirilmiştir. Bu yöntemle göre, cam balon içerisindeki 350 mg yağ asidi üzerine 4 ml 0,5 N metanollü NaOH ve kaynama taşı konularak geri soğutucu altında 60°C'de 5-10 dk kaynatılır. Ardından 5ml BF₃ eklenerek 2 dk kaynatılır, daha sonra 5 ml heptan eklenerek 1 dk daha kaynatılır. Yağ asitlerini içeren balon geri soğucudan alınır, 15 ml doymuş NaCl çözeltisi eklenerek hızlı bir şekilde 15 sn çalkalanır. Balonun üst kısmında toplanan heptan fazının üzerine susuz Na₂SO₄ ilave edilerek deney tüplerine aktarılır.

3.7 Yağ Asitlerinin Gaz-Sıvı Kromatografisi ile Analizi

Metillendirme işleminin ardından reaksiyon ürünlerinin yağ asidi kompozisyonları kapiler gaz-sıvı kromatografisi (GSK) ile AOAC 969.33 metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla Thermoquest marka Trace GC 2000 model GSK kullanılmış olup, analizde 30 m uzunluğa sahip kapiler ZB wax (Bellaforte, PA) kolonu kullanılmıştır. GSK cihazının koşulları ve kullanılan kolonun özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1: Gaz kromatografisi cihazında uygulanan koşullar ve kolon özellikleri.

Dedektör tipi ve sıcaklığı	Alev iyonizasyon dedektörü, 260 °C
Enjektör sıcaklığı	Dağıtım mod, 250°C Dağıtım akış hızı: 116 ml/dk Dağıtım oranı: 77
Helyum Akış Hızı	1,5 ml/dk
Fırın sıcaklığı (Programlı çalışma)	1. aşama 150°C (3dk) 2. aşama 5°C/dk ile 225°C 3. aşama 225°C (5dk)
Kolon tipi	30m uzunluğunda, 0,25 mm iç çaplı, 0,25 µm film kalınlığında kapiler kolon
Enjeksiyon miktarı	1µl

3.8 Tepki Yüzey Yöntemi ile Deneysel Tasarım

Echium vulgare tohum yağı kullanılarak ÇDYA ile zenginleştirilmiş yağların üretiminde kullanılan üre fraksiyonlama yöntemi üzerine etkisi olan ‘üre:yağ asidi’ miktarı oranı’ ve ‘reaksiyon süresi’nin etkisinin incelenmesi amacıyla tepki-yüzey yönteminden yararlanılmıştır. Tepki olarak ise GLA ve SDA konsantrasyonu seçilmiştir. Bağımsız değişkenlerin değer aralıklarının seçiminde hem ön deneme sonuçlarından hem de literatürde verilen değerlerden yararlanılmıştır. Bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve değerleri Çizelge 3.2’de verilmektedir.

Çizelge 3.2: Üre fraksiyonlama yöntemi için kullanılan Merkezil Kompozit Tasarımına ait değişkenler (faktörler) ve seviyeleri.

Bağımsız değişkenler	Semboller	Kullanılan seviyeler		
		-1	0	+1
Yağ asidi/üre (ağ/ağ)	U/F	3	4	5
Reaksiyon süresi (saat)	h	8	16	24

Enzimatik yöntemle *Echium vulgare* tohum yağından ÇDYA konsantresi üretimi üzerine etkili olan ‘lauril alkol:yağ asidi oranı (mol/mol)’ ‘reaksiyon sıcaklığı’, ve ‘reaksiyon süresi’nin etkisinin incelenmesi amacıyla tepki-yüzey yönteminden yararlanılmıştır. Tepki olarak ise GLA ve SDA konsantrasyonu seçilmiştir. Bağımsız değişkenlerin değer aralıklarının seçiminde hem ön deneme sonuçlarından hem de literatürde verilen değerlerden yararlanılmıştır. Bağımsız değişkenlerin seviyeleri ve değerleri Çizelge 3.3’de verilmektedir.

Çizelge 3.3: Enzimatik yöntem için kullanılan Merkezil Kompozit Tasarımına ait değişkenler (faktörler) ve seviyeleri.

Bağımsız değişkenler	Semboller	Kullanılan seviyeler		
		-1	0	+1
Lauril alkol /Yağ asidi/ (mol/mol)	LA/FFA	1:1	2:1	3:1
Reaksiyon sıcaklığı ° C	T	50	55	60
Reaksiyon süresi (saat)	h	8	12	16

3.9 İstatistiksel Analiz

Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) ve Modde 9.1 (Umetrics, İsveç) programı yardımıyla oluşturulan deney tasarımına göre gerçekleştirilen üre fraksiyonlama ve enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarından elde edilen veriler kullanılarak kuadratik (ikinci derece) modelin oluşturulması sağlanmıştır. Üre fraksiyonlama ve enzimatik esterifikasyon sonucunda elde edilen tepki için geliştirilen modelde aşağıda yer alan polinom denklem kullanılmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{n+1} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{n+1} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^{n+1} \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.4)$$

Eşiklikte yer alan;

Y = Tepki

β_0 = Kesişim terimi

β_i = Lineer (birinci derece) regresyon katsayısı

β_{ii} = Kuadratik (ikinci derece) regresyon katsayısı

β_{ij} = Etkileşim regresyon katsayısı

X_i ve X_j = Bağımsız değişken olarak simgelenmektedir.

Bağımsız değişkenler ile tepkiler arasındaki ilişkiyi tahminlemek için varyans analizi (ANOVA) ile elde edilen modelin deneylerden elde edilen verilere uygunluğu R^2 ve Q^2 değerleri ile tespit edilmiştir (Yüksel ve Yeşilçubuk, 2011).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 *Echium vulgare* Tohum Yağının Karakterizasyonu

Substrat olarak kullanılan İngiltere orjinli *Echium vulgare* tohumu yağının analizlenen özellikleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1: *Echium vulgare* tohum yağının özellikleri.

Özellik	<i>E. vulgare</i> yağı ¹	<i>E. vulgare</i> yağı ³
Asitlik sayısı, mg KOH	2,54	2,80
Serbest yağ asitliği (%)	1,27	1,40
Kırılma indisi	1,46	1,481
Sabunlaşma sayısı, mg KOH	186,95	180,3

¹Üre fraksiyonlama deneylerinde kullanılan *E.vulgare* tohum yağı.

²Türkiye orjinli *E.vulgare* tohum yağı (Bilgiç, 2009).

Çizelge 4.1’de görüldüğü üzere üre fraksiyonlama reaksiyonunda kullanılan İngiltere orjinli *E.vulgare* tohum yağının özellikleri Türkiye orjinli *E.vulgare* tohum yağının değerlerine yakın olarak bulunmuştur.

4.2 *Echium vulgare* Tohumunun Yağ Asidi Bileşimi

E. vulgare tohum yağının GSK kullanılarak belirlenen yağ asidi bileşimi Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Analiz sonucu elde edilen *E. vulgare* yağ asidi bileşimi literatürdeki değere yakın olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.2’de görüldüğü üzere *E.vulgare* tohum yağı omega-3 ve omega-6 yağ asitleri bakımından, özellikle GLA, ALA ve SDA içeriği bakımından zengin bir yağdır.

Çizelge 4.2: *Echium vulgare* tohum yağının yağ asidi bileşimi.

Yağ asidi	<i>E. vulgare</i> tohum yağı ¹	<i>E. vulgare</i> tohum yağı ²	<i>E. vulgare</i> tohum yağı ³
C 16:0	5,7	7,9	7,7
C 18:0	2,2	4,8	4,2
C 18:1n-9	10,0	16,2	16,0
C 18:2n-6 (LA)	19,1	15,3	15,5
C 18:3n-6 (GLA)	11,6	10,2	10,7
C 18:3n-3 (ALA)	37,9	32,8	31,7
C 18:4n-3 (SDA)	13,3	12,2	12,6
C 20:0	1	0,45	-

¹Üre fraksiyonlama deneylerde kullanılan *E. vulgare* tohum yağı.

³Türkiye orjinli *E. vulgare* tohum yağı (Bilgiç, 2009).

⁴Czaplicki ve ark., 2009.

4.3 Omega-3 ve Omega-6 Yağ Asitlerinin Üre Fraksiyonlama ve Enzimatik Yöntemler ile Konsantrasyonu

Omega-3 ve omega-6 yağ asitleri bakımından zengin bir yağ olan *E. vulgare* tohum yağından üre fraksiyonlama ve enzimatik hidroliz ile enzimatik esterifikasyonu içeren iki basamaklı enzimatik yöntemle çoklu doymamış yağ asidi konsantrasyonu üretilmiş olup, reaksiyon koşulları Tepki Yüzey Yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir.

4.3.1 Üre fraksiyonlama yöntemi

4.3.1.1 Reaksiyon koşullarının Tepki Yüzey Yöntemi ile optimizasyonu

E. vulgare tohum yağından çoklu doymamış yağ asidi konsantrasyonu üretiminde reaksiyon koşullarının optimizasyonu, seçilen reaksiyon parametreleri olan reaksiyon süresi (h, saat) ve yağ asidi/üre oranı (U/F, ağ/ağ) ile Tepki Yüzey Yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney tasarımı doğrultusunda elde edilen reaksiyon koşullarının üre fraksiyonlama yöntemi üzerindeki etkisi incelenmiştir.

4.3.1.2 GLA ve SDA konsantrasyonu üretimine reaksiyon koşullarının etkilerinin istatistiksel açıdan yorumlanması

Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı kullanarak üre fraksiyonlama yönteminden elde edilen veriler analizlenerek tepkiye ait bir model oluşturulmuş; varyans analizi yapılarak, elde edilen veriler ile oluşturulan modelin uygunluğu incelenmiştir. Modde 5.0 programı yardımıyla gerçekleştirilen 2 faktörlü 3 seviyeli Merkezil

Kompozit Tasarımı ve deney noktalarında gözlenen tepki değerleri (% GLA ve SDA miktarları) Çizelge 4.3’de yer almaktadır.

Çizelge 4.3: Tepki Yüzey Yöntemi ile geliştirilen deney tasarımı ve gözlenen tepkiler.

Deney	Bağımsız değişkenler		Tepki		
	U/F (ağ/ağ)	h (saat)	%GLA	% SDA	(%) SDA+GLA
1	3	8	16,7	18,9	35,6
2	5	8	26,5	22,7	49,2
3	3	24	17,4	19,3	36,7
4	5	24	20,6	24,2	44,9
5	3	16	17,0	18,7	35,7
6	5	16	26,3	19,0	45,4
7	4	8	19,0	21,5	40,6
8	4	24	19,4	17,6	37,1
9	4	16	14,3	17,0	31,3
10	4	16	13,2	15,3	28,5
11	4	16	16,4	19,2	35,6

U/ F: üre /serbest yağ asidi oranı (g/g), h:kristalizasyon süresi (saat)

Elde edilen modelin gözlenen tepkiye (% GLA ve SDA miktarı) ait regresyon katsayıları β ve önem dereceleri (*P*-değeri) istatistiksel olarak hesaplanmış ve aşağıda Çizelge 4.4’da verilmiştir.

Çizelge 4.4: Modelin GLA ve SDA konsantresi üretimi için regresyon katsayıları ve önem dereceleri.

Bağımsız değişkenler	Regresyon katsayıları (β)	<i>P</i> -değeri (önem derecesi)
Kesişim/Sabit	33,25	<0,0001
Lineer (1.derece)		
U/F	4,08	0,03
h	-2,35	0,15
Kuadratik (2.derece)		
U/F*U/F	6,01	0,03
h*h	4,5	0,08
Etkileşim		
U/F*h	0,47	0,79

U/ F: üre /serbest yağ asidi oranı (g/g), h:kristalizasyon süresi (saat)

Çizelge 4.4’de yer alan değerler incelendiğinde, $p<0,05$ önem düzeyinde birinci derece terim olan U/F [üre:yağ asidi(ağ/ağ)] oranının GLA ve SDA konsantresi üretimine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca birinci derece terimlerden olan sürenin GLA ve SDA konsantresi üretimini negatif yönde etkilediği gözlenmektedir. Kuadratik terim olan üre:yağ asidi oranının da istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. Etkileşim terimleri olan ‘üre/yağ asidi-süre, ‘süre-süre’ terimlerinin GLA ve SDA konsantrasyonu üzerine etkisinin istatistiksel

olarak $p < 0,05$ önemli olmadığı belirlenmiştir. GLA ve SDA konsantrasyonu için oluşturulan denklem aşağıda verilmektedir.

$$\text{GLA ve SDA konsantresi üretimi} = 33,25 + 4,08(U/F) + 6,01(U/F)^2 \quad (4.1)$$

Elde edilen modelin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) ile irdelenmiş olup; sonuçlar Çizelge 4.5’de gösterilmiştir.

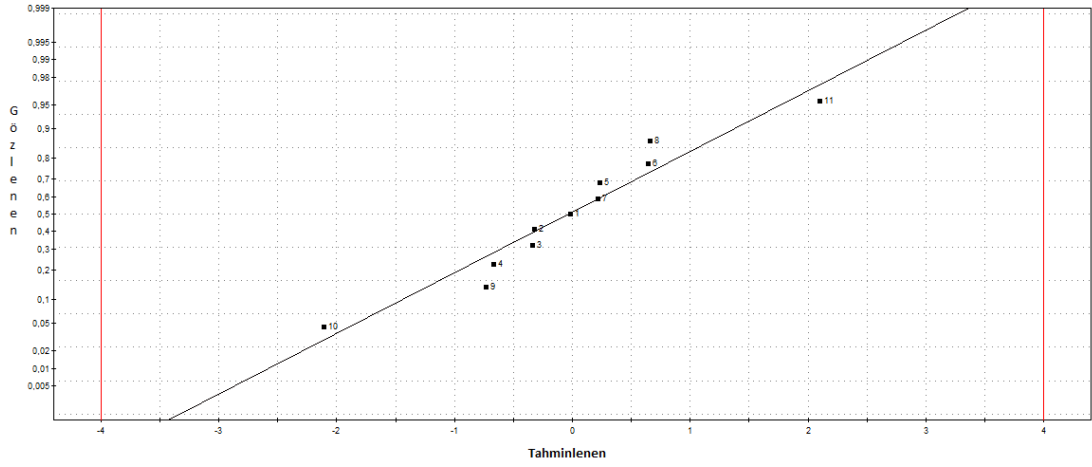
Çizelge 4.5: GLA ve SDA konsantresi üretimi için (ANOVA) analizi sonuçları.

ÇDYA Konsantresi	SD	KT	KO	F değeri	P-değeri
Toplam	11	17117,4	1556,13		
Sabit	1	16731	16731		
Toplam düzeltilen	10	386,38	38,63		
Regresyon	5	328,10	65,62	5,62	0,04
Hata	5	58,28	11,65		
Model yetersizliği	3	9,78	3,26	0,13	0,93
Tekrar hatası	2	48,5	24,25		

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

Varyans analizi sonuçlarına göre, GLA ve SDA konsantresi üretimi için elde edilen modelin F değerleri (F_{model}) ile F_{Tablo} değerlerinin karşılaştırılması ile modelin tahminleme için uygunluğu değerlendirilmiştir. Buna göre, $P < 0,05$ önem düzeyinde (F_{model}) (5,62) değerinin F_{Tablo} $F_{(5,5)}$ (5,05) değerinden büyük olduğu; dolayısıyla elde edilen modelin tahminleme için uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca, modelin elde edilen verilere uygunluğu model yetersizliği (lack of fit) ile tespit edilmektedir. Model yetersizliği, modelin deneysel bölgelerde bulunan ve regresyonda yer almayan noktalardaki verileri göstermedeki başarısızlığının bir ölçütüdür GLA ve SDA konsantresi üretimi için elde edilen modelin model yetersizliğinin p -değeri (0,13) $> 0,05$ olduğundan, GLA ve SDA konsantresi üretimine ait modelin verilerle uyumlu olduğu saptanmıştır (Bilgiç, 2011).

Varyans analiz sonuçları incelendiğinde GLA ve SDA konsantresi üretimi için geliştirilen modele ait model katsayısı (R^2) 0,85 düzeltilmiş model katsayısı (R^2 düz) 0,7 ve modelin tahminleme gücü ise (Q^2) 0,58 olarak bulunmuştur. Ayrıca modelden tahminlenen değerler ile üre fraksiyonlama reaksiyonları sonucunda elde edilen veriler arasındaki ilişki Şekil 4.1’de grafikte gösterilmiştir.

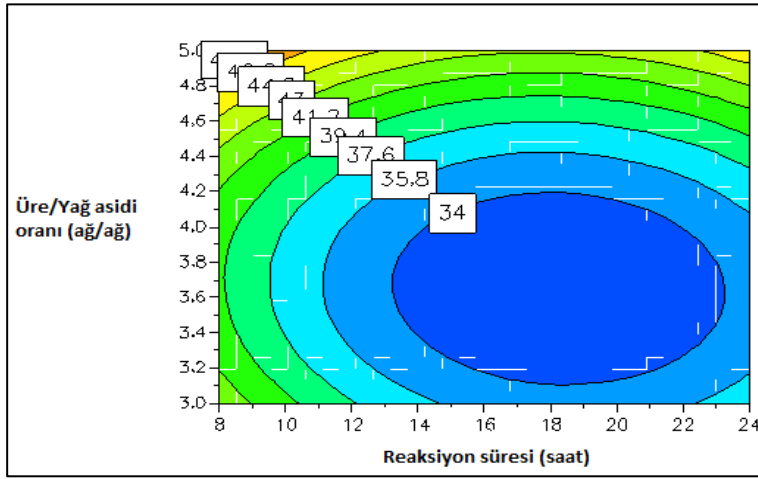


Şekil 4.1: Reaksiyon sonuçları ile SDA ve GLA konsantresi üretimine ait modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki.

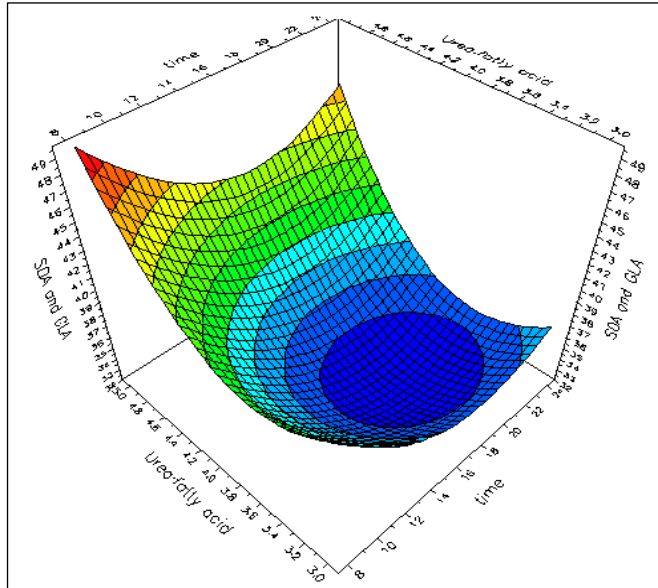
Şekil 4.1'deki grafikte görüldüğü gibi, deney sonucunda gözlenen değerler ile modelden tahmin edilen değerler arasındaki ilişki yüksek oranda lineerlik göstermektedir. Bu aynı zamanda, modelin büyük oranda reaksiyon parametreleri ile tepki (GLA ve SDA konsantrasyonu) arasındaki gerçek ilişkiyi temsil ettiğinin bir göstergesidir (Yang ve ark., 2003).

4.3.1.3 Sonuçların tepki-yüzey ve izdüşüm grafikleriyle yorumlanması

Üre fraksiyonlama reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerin reaksiyon parametreleri tepki-yüzey ve izdüşüm grafikleri ile incelenmiştir. Şekil 4.2'de üre:yağ asidi (ağırlıkça) oranı ile reaksiyon süresinin SDA ve GLA konsantresi üretimine etkisini gösteren ve "maksimum tepki" olarak tanımlanan izdüşüm grafiği yer almaktadır. Bu grafiğe göre, reaksiyon süresi kısaltıldıkça ve üre:yağ asidi oranı (ağ/ağ) arttıkça GLA ve SDA konsantrasyonun arttığı görülmektedir. Şekil 4.3'de GLA ve SDA konsantresi üretimine üre:yağ asidi oranının ve kristalizasyon süresinin etkisini gösteren tepki yüzey grafiği görülmektedir.



Şekil 4.2: GLA ve SDA konsantresi üretimine üre:yağ asidi oranının ve kristalizasyon süresinin etkisini gösteren izdüşüm grafiği.



Şekil 4.3: GLA ve SDA konsantresi üretimine üre:yağ asidi oranının ve kristalizasyon süresinin etkisini gösteren tepki yüzey grafiği.

Echium vulgare tohum yağından GLA ve SDA konsantresi eldesine ait izdüşüm grafiklerinden çıkarılan sonuçlara göre; GLA ve SDA konsantresi eldesini etkileyen en önemli faktörün birinci ve ikinci dereceden terimlerden olan üre:yağ asidi oranı olduğu sonucuna varılmıştır. Üre:yağ asidi oranının konsantrasyon oranını etkilemesi literatürde yer alan diğer çalışmalarda da gözlenmektedir. Wanasundura ve Shahidi (1999) tarafından yapılan çalışmada üre fraksiyonlama yöntemi ile fok balığı yağından omega-3 yağ asidi konsantresi eldesi için, üre:yağ asidi oranı (mol/mol), kristalizasyon sıcaklığı ve kristalizasyon süresi gibi bağımsız değişkenlerin etkisi incelenerek, en yüksek omega-3 konsantrasyonunu sağlayan koşulların optimizasyonu için üç değişkenli Merkezil Kompozit Tasarımı kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda optimum reaksiyon koşulları; üre:serbest yağ asidi oranı 4,5 (g/g), kristalizasyon süresi 24 saat ve kristalizasyon sıcaklığı -10°C olarak belirlenmiştir. Tepki olarak belirlenen omega-3 yağ asidi içeriği üzerine birinci ve ikinci terimlerden olan üre:yağ asidi oranının ve kristalizasyon sıcaklığının istatistiksel olarak çok önemli olduğu belirlenirken, kristalizasyon süresinin önemli olmadığı belirlenmiştir.

Spurvey ve Shahidi (2000)'nin yapmış çalışmada ise hodan bitkisinden GLA konsantresi eldesi için optimum koşullar 3 faktörlü 3 seviyeli merkezli bileşik deney deseni ile belirlenmiş olup, bu koşullar; üre:serbest yağ asidi oranı 3,7 (ağ/ağ), kristalizasyon süresi 16 saat ve kristalizasyon sıcaklığı -7°C 'dir. Optimum koşullar altında %91 oranında GLA konsantresi elde edilmiştir. Tepki olarak seçilen GLA konsantrasyonu üzerine, bağımsız değişken olarak belirlenen üre:yağ asidi oranı, kristalizasyon süresi ve kristalizasyon sıcaklığının etkisi incelenmiştir. GLA içeriğine, birinci ve ikinci terimlerden olan üre:yağ asidi oranının etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenirken, kristalizasyon süresi ve kristalizasyon sıcaklığının GLA içeriğine etkisinin önemli olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca etkileşim terimlerinin GLA içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. GLA konsantresi eldesini etkileyen en önemli faktörün üre:yağ asidi oranı olduğu vurgulanmıştır.

Liu ve ark. (2006)'nın yapmış oldukları bir çalışmada ise, üre fraksiyonlama yöntemi ile tuna balığı yağından DHA ve EPA konsantresi eldesi için, üre:yağ asidi oranı (mol/mol), kristalizasyon sıcaklığı ve kristalizasyon süresi (saat) gibi bağımsız değişkenlerin etkisi incelenerek, en yüksek EPA ve DHA konsantrasyonunu sağlayan koşulların optimizasyonu için üç değişkenli merkezli bileşik tasarım yöntemi kullanılmıştır. Çalışma sonucunda optimum reaksiyon koşullarının; üre:yağ asidi oranı 15 (mol/mol), kristalizasyon sıcaklığı -5°C ve kristalizasyon süresinin 20 saat olduğu belirlenmiş olup, bu koşullarda elde edilen konsantre üründe toplam EPA ve DHA'nın %85,02 olduğu ve ürün veriminin %25,10 olduğu belirtilmiştir. Tepki olarak belirlenen toplam EPA ve DHA içeriği üzerine, birinci ve ikinci terimlerden olan üre:yağ asidi oranının istatistiksel olarak çok önemli olduğu ve kristalizasyon sıcaklığının istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenirken, kristalizasyon süresinin önemli olmadığı belirlenmiştir.

Üstün ve Kent (2010)'in yapmış olduğu başka bir çalışmada ise alabalık yağından çoklu doymamış yağ asitleri konsantresi eldesi için optimum koşullar tepki-yüzey metoduyla belirlenmiştir. Üç değişkenli üç seviyeli yüzey merkezli küp tasarım noktalarında 4°C'de gerçekleştirilen ve bağımsız değişkenler olarak etanol:üre oranı (hac/ağ), üre yağ asidi (ağ/ağ) oranı ve kristalizasyon süresi (saat) olarak seçilen üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda, optimum reaksiyon koşulları; üre:serbest yağ asidi oranı 3,5 (ağ/ağ), etanol:üre oranı 5,6 (hac/ağ) ve kristalizasyon süresi 4,8 saat olarak bulunmuştur. Bu koşullar altında alabalık yağından %88,1 çoklu doymamış yağ asidi içeren ürün elde edilmiştir. Tepki olarak belirlenen ÇDYA içeriğine, birinci terimlerden olan etanol:üre oranının istatistiksel olarak etkisinin negatif olduğu, diğer birinci terimlerden olan üre:yağ asitleri oranının etkisinin en yüksek olduğu ve kristalizasyon süresinin en az etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. ÇDYA içeriğine, ikinci terimlerden olan üre: yağ asidi oranının en yüksek etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Maksimum GLA ve SDA konsantrasyonu; üre:yağ asidi oranının 5:1 (ağ/ağ); reaksiyon süresinin 8 saat olduğu koşullarda gerçekleşmiştir. Bu koşullarda elde edilen ürünün yağ asidi bileşimi Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6: GLA ve SDA konsantrasyonunun maksimum olduğu koşullardaki yağ asidi bileşimi (%mol).

Yağ asidi	<i>E. vulgare</i> tohum yağı
C 16:0	1,1
C 18:0	2,7
C 18:1n-9	0,07
C 18:2n-6 (LA)	13,0
C 18:3n-6 (GLA)	26,5
C 18:3n-3 (ALA)	33,5
C 18:4n-3 (SDA)	22,7
C 20:0	0,3

GLA ve SDA konsantresi eldesi için Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) programı yardımı ile elde edilen optimum koşullar; üre:yağ asidi oranı 5:1(ağ/ağ), kristalizasyon süresi 8 saat olup, bu koşullar altında beklenen GLA ve SDA konsantrasyonu % 50,26'dır.

4.3.1.4 Modelin doğrulanması

Tepki yüzey yöntemi ile elde edilen GLA ve SDA konsantresi eldesine ait modelin doğruluğunun tespiti için belirlenen optimum reaksiyon koşullarında; üre:yağ asitleri

oranı 5:1 (ağırlıkça), kristalizasyon süresi 8 saat deney tekrar yapılmıştır. Bu koşullar için modelden tahminlenen GLA ve SDA konsantrasyonu % 50,26'dır. Üre fraksiyonlama reaksiyonu sonucu optimum koşullarda elde edilen ürünün yağ asidi bileşimi Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7: Optimum koşullarda elde edilen ürünün yağ asidi bileşimi (% mol).

Yağ asidi	<i>E. vulgare</i> tohum yağı ¹
C 16:0	0,22
C 18:0	0,04
C 18:1n-9	1,35
C 18:2n-6 (LA)	13,2
C 18:3n-6 (GLA)	24,6
C 18:3n-3 (ALA)	32,3
C 18:4n-3 (SDA)	28,0
C 20:0	0,14

Üre fraksiyonlama reaksiyonu sonucu optimum koşullarda elde edilen üründe toplam GLA ve SDA konsantrasyonu %52,6 olarak belirlenmiş olup, modelden tahminlenen değere (%50,2) yakın olduğu görülmektedir.

4.3.2 Enzimatik yöntem

Echium vulgare tohum yağının hidroliz reaksiyonları literatürde verilen değerlerden ve ön deneme sonuçlarından yararlanılarak 250 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda çeşitli sıcaklıklarda Novozyme 435 enzimi ile 48 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünün GSK kullanılarak belirlenen yağ asidi bileşimi Çizelge 4.8'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.8: *E. vulgare* tohum yağının Novozyme 435 enzimi ile gerçekleştirilen hidroliz reaksiyonu sonucu yağ asidi bileşimi (% mol).

Yağ asidi	45 °C	55°C	60 °C
C 16:0	7,3	6,1	6,0
C 18:0	4,2	3,3	2,3
C 18:1n-9	18	14	13,8
C 18:2n-6 (LA)	14,4	15,7	14,8
C 18:3n-6 (GLA)	10,6	11,7	11,9
C 18:3n-3 (ALA)	31,3	30,3	33,1
C 18:4n-3 (SDA)	13,3	16,5	16,5
C 20:0	0,1	2,1	0,5

* 48 saat, 250 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda.

* Hidroliz Derecesi: 45°C: %71; 55°C:%76; 60°C:%83.

E.vulgare tohum yağının en yüksek oranda hidrolizi 60°C’de 250 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda 48 saat sürede gerçekleşmiştir. Bu nedenle hidrolizasyon reaksiyonları bu koşullarda yapılmıştır.

4.3.2.1 Reaksiyon koşullarının Tepki Yüzey Yöntemi ile optimizasyonu

Echium vulgare tohum yağından enzimatik esterifikasyon reaksiyonu ile ÇDYA konsantresi üretiminde reaksiyon koşullarının optimizasyonu, seçilen reaksiyon parametreleri olan reaksiyon sıcaklığı (T,°C) ve süresi (h, saat), lauril alkol:yağ asidi oranı (LA/FFA, mol/mol) ile Tepki Yüzey Yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney tasarımı doğrultusunda elde edilen reaksiyon koşullarının enzimatik esterifikasyon reaksiyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

4.3.2.2 GLA ve SDA konsantresi üretimine reaksiyon koşullarının etkilerinin istatistiksel açıdan yorumlanması

Modde 9.1 (Umetrics, İsveç) programı kullanarak enzimatik esterifikasyon yönteminden elde edilen veriler analizlenerek tepkiye ait bir model oluşturulmuş; varyans analizi yapılarak, elde edilen veriler ile oluşturulan modelin uygunluğu incelenmiştir. Modde 9.1 programı yardımıyla gerçekleştirilen 3 faktörlü, 3 seviyeli Merkezil Kompozit Tasarımı ve deney noktalarında gözlenen tepki değerleri (% GLA ve SDA miktarları) ile verim ve esterifikasyon dereceleri Çizelge 4.9’de yer almaktadır.

Çizelge 4.9: Tepki Yüzey Yöntemi ile geliştirilen deney tasarımı ve gözlenen tepkiler ile verim ve esterifikasyon dereceleri.

Deney	Bağımsız değişkenler			Tepki			% Verim	% ED
	h	LA/FFA	T	%GLA	% SDA	% SDA+GLA		
1	8	1:1	50	25,9	29,5	55,4	74,1	84,8
2	8	1:1	60	22,5	26,9	49,1	52,2	72
3	16	1:1	50	27,2	32,2	59,4	73,4	84
4	16	1:1	60	20,1	25,2	45,3	59,1	75,9
5	8	3:1	50	20,8	23,4	44,3	36,2	76,8
6	8	3:1	60	21,8	27,6	49,4	45,6	71,7
7	16	3:1	50	20,8	23,1	44	40,7	73,7
8	16	3:1	60	19,9	21,5	41,1	38,3	61,5
9	12	2:1	50	21	24,3	45,3	49,8	74,2
10	12	2:1	60	19,4	23,8	43,2	47,5	62
11	8	2:1	55	20,3	25,4	45,7	47,2	62
12	16	2:1	55	21,6	26,1	47,7	46,8	72
13	12	1:1	55	24,4	29,8	54,2	57,8	73
14	12	3:1	55	19,6	23	42,6	48,8	62
15	12	2:1	55	23,5	27,9	51,4	57,1	69
16	12	2:1	55	23	27,3	50,3	53,4	62
17	12	2:1	55	24,5	28	52,5	55,7	63

h; Reaksiyon süresi, LA/FFA; Lauril alkol/Yağ asidi oranı (mol/mol), T; reaksiyon sıcaklığı (°C), ED; Esterifikasyon derecesi.

Modelin gözlenen tepkiye (% GLA ve SDA miktarı) ait regresyon katsayıları β ve önem dereceleri (*P*-değeri) istatistiksel olarak hesaplanmış ve aşağıda Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10: Modelin GLA ve SDA konsantresi üretimi için regresyon katsayıları ve önem dereceleri.

Bağımsız değişkenler	Regresyon katsayıları (β)	<i>P</i> -değeri (önem derecesi)
Kesişim/Sabit	48,72	<0,0001
Lineer (1.derece)		
LA/FFA	-4,2	0,003
h	-0,64	0,53
T	-2,02	0,07
Kuadratik (2.derece)		
LA/FFA*LA/FFA	1,72	0,39
h*h	0,04	0,98
T*T	-2,45	0,23
Etkileşim		
LA/ FFA*h	-1,08	0,35
LA/FFA*T	2,84	0,035
h*T	-1,97	0,11

LA/FFA; Lauril alkol/yağ asidi oranı (mol/mol), h;reaksiyon süresi (saat), T; reaksiyon sıcaklığı (°C).

Çizelge 4.10’da yer alan değerler incelendiğinde, $p<0,05$ önem düzeyinde birinci derece terim olan ‘lauril alkol/yağ asidi (mol/mol) oranı’nın GLA ve SDA konsantresi üretimine etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu ancak etkisinin negatif olduğu görülmektedir. Ayrıca birinci derece terimlerden olan ‘reaksiyon sıcaklığı’ ve ‘reaksiyon süresi’nin GLA ve SDA konsantresi üretimine etkisinin istatistiksel olarak önemli olmadığı, GLA ve SDA konsantresi üretimini negatif yönde etkilediği gözlenmektedir. Kuadratik terim olan ‘sıcaklık-sıcaklık’ teriminin GLA ve SDA konsantresi üretimine negatif etki ettiği gözlenmektedir. Etkileşim terimi olan ‘sıcaklık-lauril alkol/yağ asidi oranı (mol/mol)’ teriminin GLA ve SDA konsantrasyonu üzerine etkisinin istatistiksel olarak ($p<0,05$) önemli olduğu belirlenmiştir. GLA ve SDA konsantrasyonu için oluşturulan denklem aşağıda verilmektedir.

$$\text{GLA ve SDA konsantresi üretimi}=48,72-4,2 \text{ LA/FFA}+2,8\text{LA/FFA}*T \quad (4.2)$$

Elde edilen modelin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) ile irdelenmiş olup; sonuçlar Çizelge 4.11’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11: GLA ve SDA konsantresi üretimi için (ANOVA) analizi sonuçları.

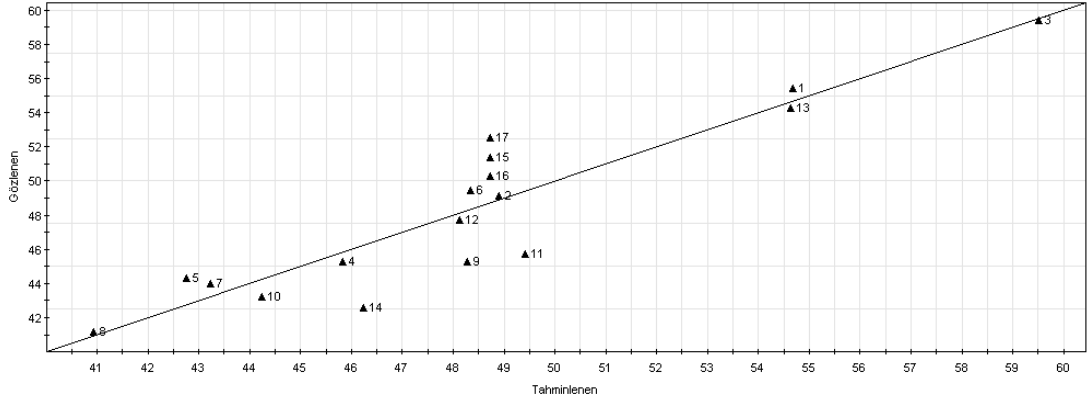
ÇDYA Konsantresi	SD	KT	KO	F değeri	P-değeri
Toplam	17	40095,3	2358,54		
Sabit	1	39682,8	39682,8		
Toplam düzeltilen	16	412,45	25,77		
Regresyon	9	346,05	38,45	4,05	0,039
Hata	7	66,40	9,48		
Model yetersizliği	5	63,86	12,7	10,09	0,093
Tekrar hatası	2	2,53	1,26		

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

Varyans analizi sonuçlarına göre, GLA ve SDA konsantresi üretimi için elde edilen modelin F değerleri (F_{model}) ile F_{Tablo} değerlerinin karşılaştırılması ile modelin tahminleme için uygunluğu değerlendirilmiştir. Buna göre, $P<0,05$ önem düzeyinde (F_{model}) (4,05) değerinin F_{Tablo} $F_{(9,7)}$ (3,69) değerinden büyük olduğu; dolayısıyla elde edilen modelin tahminleme için uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca, modelin elde edilen verilere uygunluğu model yetersizliği (lack of fit) ile tespit edilmektedir. Model yetersizliği, modelin deneysel bölgelerde bulunan ve regresyonda yer almayan noktalardaki verileri göstermedeki başarısızlığının bir ölçütüdür. GLA ve SDA konsantresi üretimi için elde edilen modelin model yetersizliğinin p -değeri

(0,093)>0,05 olduğundan, GLA ve SDA konsantrasi üretimine ait modelin verilerle uyumlu olduğu saptanmıştır (Bilgiç, 2011).

Varyans analiz sonuçları incelendiğinde GLA ve SDA konsantrasi üretimi için geliştirilen modele ait model katsayısı (R^2) 0,84 düzeltilmiş model katsayısı (R^2 düz) 0,63 ve modelin tahminleme gücü ise (Q^2) 0,23 olarak bulunmuştur. Ayrıca modelden tahminlenen değerler ile enzimatik esterifikasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen veriler arasındaki ilişki Şekil 4.2’de grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Reaksiyon sonuçları ile GLA ve SDA konsantrasi üretimine ait modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki.

Şekil 4.4’deki grafikte görüldüğü gibi, deney sonucunda gözlenen değerler ile modelden tahmin edilen değerler arasındaki ilişki yüksek oranda lineerlik göstermektedir. Bu aynı zamanda, modelin büyük oranda reaksiyon parametreleri ile tepki (GLA ve SDA konsantrasyonu) arasındaki gerçek ilişkiyi temsil ettiğinin bir göstergesidir (Yang ve ark., 2003).

Maksimum GLA ve SDA konsantrasyonu; yağ asidi oranı:lauril alkol: 1:1 (mol/mol); reaksiyon sıcaklığının 50°C ve reaksiyon süresinin 16 saat olduğu koşullarda gerçekleşmiştir. Bu koşullarda elde edilen ürünün yağ asidi bileşimi Çizelge 4.6’da verilmiştir.

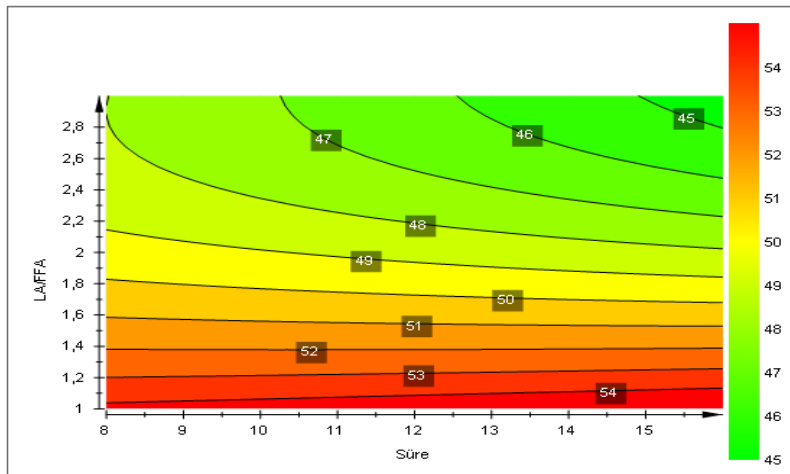
Çizelge 4.12: GLA ve SDA konsantrasyonunun maksimum olduğu koşullardaki yağ asidi bileşimi (%mol).

Yağ asidi	<i>E. vulgare</i> yağ asidi
C 16:0	3,8
C 18:0	2,3
C 18:1n-9	9,3
C 18:2n-6 (LA)	8
C 18:3n-6 (GLA)	27,2
C 18:3n-3 (ALA)	16,7
C 18:4n-3 (SDA)	32,2
C 20:0	-

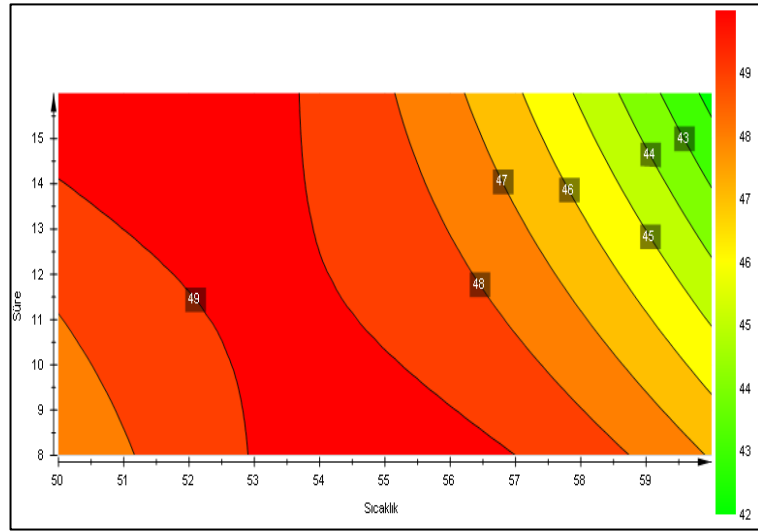
GLA ve SDA konsantresi eldesi için Modde 9.1 (Umetrics, İsveç) programı yardımı ile elde edilen optimum koşullar; yağ asidi:lauril alkol oranı 1:1 (mol/mol), reaksiyon sıcaklığı 50°C ve reaksiyon süresi 16 saat olup, bu koşullar altında beklenen GLA ve SDA konsantrasyonu % 59,5'dur.

4.3.2.3 Sonuçların tepki-yüzey ve izdüşüm grafikleriyle yorumlanması

Enzimatik esterifikasyon reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlerin reaksiyon parametreleri tepki-yüzey ve izdüşüm grafikleri ile incelenmiştir. Şekil 4.5'de yağ asidi:lauril alkol (mol/mol) oranı ile reaksiyon süresinin GLA ve SDA konsantresi üretimine etkisini gösteren izdüşüm grafiği yer almaktadır. Bu grafiğe göre, reaksiyon süresi uzadıkça ve lauril alkol:yağ asidi oranı (mol/mol) düştükçe GLA ve SDA konsantrasyonunun arttığı görülmektedir. Şekil 4.6'de GLA ve SDA konsantresi üretimine reaksiyon sıcaklığının ve reaksiyon süresinin etkisini gösteren tepki yüzey grafiği görülmektedir.

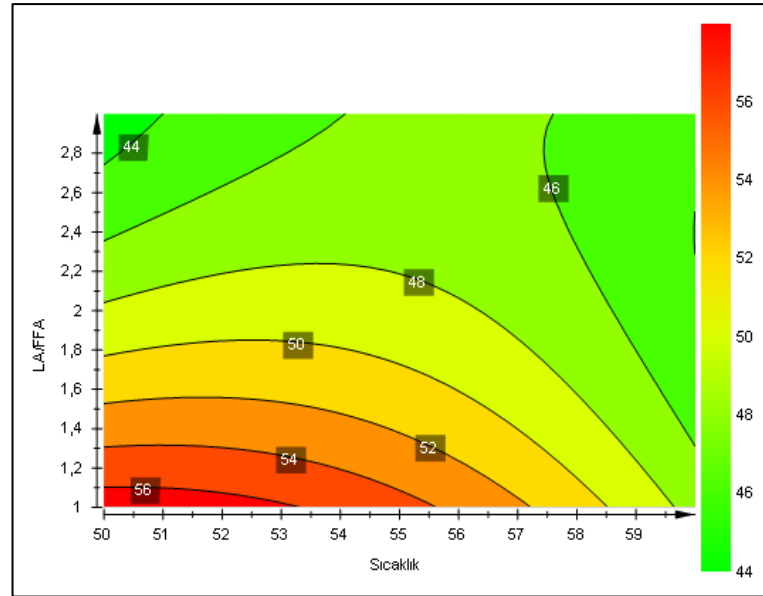


Şekil 4.5: GLA ve SDA konsantresi üretimine lauril alkol:yağ asidi oranının mol/mol ve enzimatik esterifikasyon süresinin etkisini gösteren izdüşüm grafiği.



Şekil 4.6: GLA ve SDA konsantresi üretimine reaksiyon süresinin ve reaksiyon sıcaklığının etkisini gösteren izdüşüm grafiği.

Şekil 4.7’de yer alan grafikte ise lauril alkol:yağ asidi oranının (mol/mol) ve reaksiyon sıcaklığının GLA ve SDA konsantresi üretimine etkisi görülmektedir.



Şekil 4.7: GLA ve SDA konsantresi üretimine lauril alkol:yağ asidi oranının (mol/mol) ve reaksiyon sıcaklığının etkisini gösteren izdüşüm grafiği.

Şekil 4.7’den de görüleceği üzere lauril alkol:yağ asidi oranı (mol/mol) ve reaksiyon sıcaklığı düştükçe GLA ve SDA konsantrasyonu artmaktadır.

Huang ve ark., (1997)’nin hodan bitkisi yağından GLA konsantresi elde ettikleri çalışmada, kimyasal hidroliz ile elde ettikleri yağ asitleri Lipozyme IM 20 enzimi yardımıyla *n*-butanol varlığında esterleştirilmiştir. Selektif esterifikasyon reaksiyonunun optimizasyonu için çeşitli oranlarda hodan bitkisi serbest yağ asidi:*n*-

butanol oranı (1:1-1:4, mol/mol) denenmiştir. 15 mg Lipozim IM 20 enzimi, 3ml isooktan varlığında 600 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu optimum koşulların; *n*-butanol/serbest yağ asidi oranı 2:1, ve reaksiyon süresinin 2 saat, reaksiyon sıcaklığının ise 60°C olduğu belirlenmiştir. Selektif esterifikasyon sonucunda yağ asitleri içerisindeki GLA konsantrasyonu %87'ye yükselmiştir.

Shimada ve ark., (1997)'ı hodan bitkisi yağından GLA konantresi elde etmek için iki basamaklı enzimatik yöntem kullanmışlardır. 3 gr hodan yağı 2 gr su varlığında 5000 U Lipozam ile 35°C'de 500 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda 24 saat hidroliz edilmiştir. Hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen yağ asitleri selektif esterifikasyon için kullanılmıştır. 4 gr hodan yağ asidi/lauril alkol (1:2, mol/mol), 1 gr su 1000U *R. delemar* kaynaklı lipaz enzimi ile 30°C'de 20 saat 500 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda gerçekleştirilen esterifikasyon reaksiyonu ile palmitik asit, oleik asit ve linoleik asidin lauril alkol ile esterleşmesi sonucu esterleşmemiş yağ asidi fraksiyonunda GLA konsantrasyonu %22,5'ten %70'e %80 verimle yükselmiştir. Esterifikasyon ilk 8 saat içinde çok hızlı bir şekilde gerçekleşirken 8 saatten sonra GLA'nın lauril alkol ile ester yapması sonucu GLA'nın yağ asidi fraksiyonunda verimi düşmüştür. Aynı şartlarda yapılan ikinci esterifikasyon reaksiyonu sonucunda GLA konsantrasyonu %93,7'e yükselmiştir.

Shimada ve ark. (1998)'nin yapmış oldukları başka bir çalışmada ise, GLA'nın büyük ölçekte saflaştırma prosesinde başlangıç materyali olarak hodan bitkisi yağının selektif hidrolizi sonucunda elde edilen %45 oranında GLA içeren yağ kullanılmıştır. Çalışmada GLA ile zengin yağ, %33 su varlığında 250U/g *Pseudomonas* kaynaklı lipaz enzimi ile 35°C' de 24 saat hidroliz edilmiş ve elde edilen yağ asitleri distilasyon yöntemi ile diğer ürünlerden ayrılmıştır. GLA ile zengin yağ % 91,5 oranında hidroliz olmuştur. Hidroliz reaksiyonu sonucu elde edilen yağ asitleri *R. delemar* kaynaklı lipaz enzimi varlığında lauril alkol ile esterleştirilmiştir. Yağ asitleri/lauril alkol oranı 1:2 (mol/mol) olan, 70U/g *R. delemar* kaynaklı lipaz enzimi ve %20 su içeren reaksiyon karışımı 500 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda 30°C'de 16 saat süren esterifikasyon reaksiyonu sonucunda yağdaki GLA konsantrasyonu %52'ye esterifikasyon derecesi 89,5'e yükselmiştir. % 18 oranında lauril alkol esterleri ile kontamine olmuş GLA ile zengin fraksiyonun GLA içeriğini yükseltmek için ikinci bir esterifikasyon işlemi uygulanmış ve GLA konsantrasyonu %97,3'e yükselmiştir (esterifikasyon derecesi:

%15,2). Esterifikasyon reaksiyonlarının ardından uygulanan üre fraksiyonlama reaksiyonu sonucunda %98,6 GLA içeren yağ asitleri ürünleri elde etmişlerdir.

López-Martínez ve ark. (2006)'larının yapmış olduğu çalışmada *B. officinalis* ve *E. fastuosum* tohum yağlarından GLA konsantresi elde etmek için enzimatik hidroliz ve enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarını içeren iki basamaklı enzimatik yöntem kullanılmıştır. 37°C'de 250 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda 48 saat süren hidroliz reaksiyonunda 100 mg tohum yağı, 0,1 ml distile su, 5 ml hekzan ve 10 mg çeşitli lipaz enzimleri kullanılmıştır. *B. officinalis* tohum yağı en yüksek oranda *R. delemar* lipaz enzimi ile hidrolize olurken, *E. fastuosum* tohum yağı *M. javanicus* lipazı ile yüksek oranda hidrolize olmuştur. Çalışmanın ikinci kısmında ise, kimyasal hidroliz ile elde edilen yağ asitlerinin lauril alkol varlığında hidroliz sırasında kullanılan enzimler ile seçici esterifikasyonu sağlanmıştır. 100 mg yağ asidi, 130 mg lauril alkol, 4 ml hekzan içeren reaksiyon karışımı 40°C'de 250 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda 48 saat süreyle 10 mg lipaz enzimi varlığında esterleşmiştir. *B. officinalis* tohum yağından elde edilen yağ asitlerinin *C. rugosa* lipazı ile esterifikasyonu ile esterleşmemiş yağ asitlerindeki GLA oranı %59 verimle %91'e yükselirken, *E. fastuosum* tohum yağından elde edilen yağ asitlerinin *M. javanicus* lipazı ile esterifikasyonu ile esterleşmemiş yağ asitlerindeki GLA oranı %68 verimle %64'e yükselmiştir.

4.3.2.4 Modelin doğrulanması

Tepki yüzey yöntemi ile elde edilen GLA ve SDA konsantresi eldesine ait modelin doğruluğunun tespiti için Modde 9.1 (Umetrics, İsveç) programı yardımıyla belirlenen optimum reaksiyon koşullarında; lauril alkol:yağ asitleri oranı 1:1 (mol/mol), reaksiyon süresi 16 saat ve reaksiyon sıcaklığı 50°C, deney tekrarı yapılmıştır. Bu koşullar için modelden tahminlenen GLA ve SDA konsantrasyonu %59,5'dur. Belirlenen optimum koşulda modelin doğruluğunun araştırılması için, enzimatik esterifikasyon reaksiyonu optimum koşullarda tekrarlanmış ve elde edilen ürünün yağ asidi bileşimi belirlenmiştir. Enzimatik esterleştirme reaksiyonu sonucu optimum koşullarda elde edilen ürünün yağ asidi bileşimi Çizelge 4.13'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13: Optimum koşullarda elde edilen ürünün yağ asidi bileşimi (%mol).

Yağ asidi	<i>E. vulgare</i> tohum yağı
C 16:0	3,9
C 18:0	2,7
C 18:1n-9	9,1
C 18:2n-6 (LA)	8
C 18:3n-6 (GLA)	28,2
C 18:3n-3 (ALA)	15,8
C 18:4n-3 (SDA)	32,3
C 20:0	-

Enzimatik esterifikasyon reaksiyonu sonucu optimum koşullarda %72,3 verimle ve %85 esterifikasyon derecesi ile elde edilen üründe toplam GLA ve SDA konsantrasyonu %60,5 olarak belirlenmiş olup, modelden tahminlenen değere (%59,5) yakın olduğu görülmektedir.

Enzimatik esterifikasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen üründe GLA ve SDA konsantrasyonunu daha da artırmak için optimum koşulda elde edilen ürüne, üre fraksiyonlama reaksiyonlarının tepki yüzey yöntemi ile optimizasyonu sonucu elde edilen optimum koşullar, üre:yağ asitleri oranı 5:1 (ağırlıkça), kristalizasyon süresi 8 saat, uygulanmıştır. Optimum koşullarda elde edilen ürüne uygulanan üre fraksiyonlama reaksiyonu sonuçları Çizelge 4.9’da verilmektedir.

Çizelge 4.14: Optimum koşullarda elde edilen ürüne uygulanan üre fraksiyonlama reaksiyonu sonuçları.

Yağ asidi	<i>E. vulgare</i> tohum yağı	Üre Fraksinyasyonu
C 16:0	3,9	0,8
C 18:0	2,7	0,6
C 18:1n-9	9,1	3,9
C 18:2n-6 (LA)	8	5,8
C 18:3n-6 (GLA)	28,2	35,2
C 18:3n-3 (ALA)	15,8	12,2
C 18:4n-3 (SDA)	32,3	40,5
C 20:0	-	-

Üre fraksiyonlama reaksiyonları sonucunda son üründe GLA konsantrasyonu %28,2’den %35,2’ye yükselirken SDA konsantrasyonu %32,3’den %40,5’e yükselmiştir. Toplam GLA ve SDA konsantrasyonu %60,5’ten %75,7’ye yükselmiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışma ile omega-3 ve omega-6 yağ asitleri içeriği bakımından zengin *Echium vulgare* tohum yağından üre fraksiyonlama ve enzimatik esterifikasyon yöntemleri ile ÇDYA konsantresi eldesinde reaksiyon koşulları tepki-yüzey yöntemi ile optimize edilmiştir.

Çalışmada, üre fraksiyonlama deneyleri +4°C'de iki değişkenli üç seviyeli merkezli kompozit tasarım noktalarında yapılmıştır. Bağımsız değişkenler olan üre:yağ asidi (ağ/ağ) oranının ve kristalizasyon süresinin (saat) elde edilen ürünlerin GLA ve SDA içeriğine (tepki değerine) olan etkileri incelenmiş ve reaksiyon koşulları Tepki Yüzey Metodolojisine göre optimize edilmiştir. Kristalizasyon süresi azaldıkça ve üre:yağ asidi oranı (ağ/ağ) arttıkça GLA ve SDA konsantrasyonun arttığı gözlenmiştir. Reaksiyonlar sonucunda seçilen tepki [GLA ve SDA miktarı (%)] için kuadratik model elde edilmiştir.

Maksimum SDA ve GLA konsantrasyonu; üre:yağ asidi oranın 5:1 (ağ/ağ); reaksiyon süresinin 8 saat olduğu koşullarda gerçekleşmiştir. Bu koşullarda elde edilen üründe %26,5 GLA, %22,7 SDA içermiştir. Minimum GLA ve SDA konsantrasyonu; üre:yağ asidi oranın 4:1 (ağ/ağ); reaksiyon süresinin 16 saat olduğu koşullarda gerçekleşmiştir. Bu koşullarda elde edilen ürün %14,3 GLA, %17 SDA içermiştir.

Optimum reaksiyon koşulları üre:yağ asitleri oranı 5:1 (ağırlıkça), kristalizasyon süresi 8 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında *Echium vulgare* tohum yağından %52,6 GLA ve SDA içeren ürün elde edilmiştir. Bu değer modelden tahminlenen GLA ve SDA (%) miktarı ile benzer olduğu görülmüştür. Başlangıç GLA konsantrasyonu %11,6 iken reaksiyon sonunda GLA konsantrasyonu %24,6'e yükselmiştir. Tohum yağının başlangıçtaki SDA konsantrasyonu ise %13,3 iken reaksiyon sonunda %28 olmuştur.

Çalışmanın ikinci kısmında ise *Echium vulgare* tohum yağından ÇDYA konsantresi üretimi için enzimatik hidroliz ve enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarını içeren iki

basamaklı enzimatik yöntem kullanılmıştır. Enzimatik hidroliz reaksiyonu spesifik olmayan Novozyme-435 ile 60°C’de 250 rpm çalkalama hızına sahip su banyosunda 48 saatte gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz ile elde edilen yağ asitleri enzimatik esterifikasyon reaksiyonlarında kullanılmıştır. Enzimatik esterifikasyon deneyleri üç değişkenli üç seviyeli merkezli kompozit tasarım noktalarında yapılmıştır. Bağımsız değişkenler olan lauril alkol:yağ asidi (mol/mol), oranının reaksiyon süresinin (saat) ve reaksiyon sıcaklığının (°C) elde edilen ürünlerin GLA ve SDA içeriğine (tepki değerine) olan etkileri incelenmiş ve reaksiyon koşulları Tepki Yüzey Metodu yardımıyla optimize edilmiştir. Reaksiyonlar sonucunda seçilen tepki [GLA ve SDA miktarı (%)] için kuadratik model elde edilmiştir. Lauril alkol:yağ asidi oranı azalırken GLA ve SDA konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir.

Maksimum GLA ve SDA konsantrasyonu; lauril alkol:yağ asidi (1:1, mol/mol), reaksiyon süresi 16 saat ve reaksiyon sıcaklığı 50°C olduğu koşullarda gerçekleşmiştir. Bu koşullarda elde edilen üründe %27,2 GLA, %32,2 SDA içermiştir. Minimum GLA ve SDA konsantrasyonu; lauril alkol:yağ asidi oranı (1:3mol/mol), reaksiyon süresi 12 saat ve reaksiyon sıcaklığı 55°C olduğu koşullarda gerçekleşmiştir. Bu koşullarda elde edilen üründe %19,6 GLA ve %23 SDA içermiştir.

Modelden elde edilen veriler ile optimum reaksiyon koşulları; lauril alkol:yağ asidi oranı (1:1mol/mol), reaksiyon süresi 16 saat ve reaksiyon sıcaklığı 50°C olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında *Echium vulgare* tohum yağından %72,3 verimle %60,5 GLA ve SDA içeren ürün elde edilmiştir. Bu değer modelden tahminlenen GLA ve SDA (%59,5) konsantrasyon miktarı ile benzer olduğu görülmüştür. Başlangıç GLA konsantrasyonu %11,9 iken reaksiyon sonunda GLA konsantrasyonu %28,2’ye yükselmiştir. Tohum yağının başlangıçtaki SDA konsantrasyonu %16,5 iken reaksiyon sonunda %32,3’e yükselmiştir.

Enzimatik esterifikasyon sonucunda optimum koşullarda elde edilen konsantre üründe GLA ve SDA konsantrasyonunu daha da yükseltmek için uygulanan üre fraksiyonlama reaksiyonlarının tepki yüzey yöntemi ile optimizasyonu sonucu elde edilen optimum koşullar, üre:yağ asitleri oranı 5:1 (ağırlıkça), kristalizasyon süresi 8 saat, sonucunda son üründe GLA konsantrasyonu %28,2’den %35,2’ye yükselirken SDA konsantarsyonu %32,3’den %40,5’e yükselmiştir. Toplam GLA ve SDA konsantrasyonu %60,5’ten %75,7’ye yüklemiştir.

Yapılan tüm çalışma sonuçları değerlendirilecek olursa çoklu doymamış yağ konsantresi eldesinde enzimatik yöntemin verimi yüksek bir yöntem olduğu görülmektedir. Enzimatik yöntem reaksiyonu ardından üre fraksiyonlama reaksiyonları uygulanacak olursa daha yüksek konsantrasyonda ve verimde ürünler elde edebileceği görülmektedir.

Çalışma sonucunda sağlık üzerine olumlu etkileri olan konsantre ÇDYA'ların besin takviyesi olarak, tedavi edici olarak veya fonksiyonel gıda formülasyonlarında yer alarak kullanım alanı bulacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- AOAC International, 2000.** Saponification Number (Koettstorfer Number) of Oils and Fats, *AOAC Official Method 920.160*.
- AOAC International, 2000.** Fatty Acids in Oils and Fats. Preparation of Methyl Esters. Boron Trifluoride Method, *AOAC Official Method 969.33*.
- Akova, A., Üstün, G., 2002.** Boraj yağının enzimatik hidrolizi ile gamma-linolenik asit zenginleştirilmesi, *itü dergisi/d Mühendislik* Cilt:1 Sayı:1.
- Berti, M., B. L. Johnson, S. Dash, S. Fischer, R. Wilckens, and F. Hevia, 2007.** Echium: A Source of Stearidonic Acid Adapted to the Northern Great Plains in the US, *Issues in new crops and new uses*. Sayfa 120-125. Janick and A. Whipkey (eds.). ASHS Press.
- Bilgiç, S., 2011.** Engerek otu (*Echium vulgare*) Tohum Yağı ve Zeytin Yağından Enzimatik Yöntemle Fonksiyonel Yağ Üretimi, Yüksek lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi.
- Bornscheuer, U. T., Adamczak, M., Soumanou, M. M., (2003).** Lipase-catalysed synthesis of modified lipids, in *Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals*, Oily Press , Editor, Frank D. Gunstone , İngiltere.
- Brown, J. B. 1941.** Low-Temperature Crystallization Of The Fatty Acids And Glycerides. *Chem. Rev.*, 29 (2), pp 333–354.
- Camp, j. V., Huyghebaert, A., Geoman, P., 1998.** Enzymatic Synthesis of Structured Modified Fats, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use*. Editor: Armand B. Christophe, AOCS Press.
- Chapkin, R. S., 2007.** Reappraisal of The Essential Fatty Acids, *Fatty Acids, Foods and Their Health Applications*, 675-683, CRC Press , New York.
- Chen, T. C. and Ju, Y. H., 2001.** Polyunsaturated Fatty Acid Concentrates from Borage and Linseed Oil Fatty Acids. *JAOCs* 78, 485–488 (May).
- Clough, P. M., 2001.** Specialty Vegetable Oils Containing γ -Linolenic Acid and Stearidonic Acid, *Structured and modified oils*, Editör: Frank D. Gunstone, Markel Dekker Press, New York.
- Czaplicki, S., Zadernowski, R. and Ogrodowska, D., 2009.** Triacylglycerols from viper bugloss (*Echium vulgare* L.) seed bio-oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 111,1266–1269.
- Çolak, N., Tülek, Y., 2003.** Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu, *Gıda* 28 (3): 313-320.
- Dandik, L., Arioglu, G., Aksoy, H. A., 1993.** The enzymatic hydrolysis of used frying oil by native lipas. *Applied Biochemistry and Biotechnology* Volume 42, Issue 2-3, pp 119-126.

- Fregolente, L. V., Moraes, E. B., Martins, P. F., Batistella, C. B., Wolf Maciel, M. R., Afonso, A. P., Reis, M. H. M., 2006.** Enrichment of Natural Products Using an integrated Solvent-Free Process: Molecular Distillation. *Distillation and Absorption inst. Of Chemical Engineers, London, 648-656.*
- Foglia, T. A. and Sonnet, P. E., 1995.** Fatty acid selectivity of Lipases: γ -linolenic Acid from Borage Oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, Volume 72, Issue 4, pp 417-420.
- Gebauer, S., Harris, W., Kris-Etherton, P. M., and Etherton T.D., 2005.** Dietary n-6:n-3 Fatty Acid Ratio and Health, *Healthful Lipids*, Editor Akoh, C., C., Lai, O. M., AOCS Press.
- Guil-Guerrero, J. L., Gomez-Mercado, F., Garcia-Maroto, F. Campra-Madrid P., 2000.** Occurrence and characterization of oils rich in γ -linolenic acid Part I: Echium seeds from Macaronesia, *Phytochemistry* 53, 451-456.
- Guil-Guerrero, J. L., García Maroto, F. F. and Giménez Giménez, A., 2001.** Fatty Acid Profiles from Forty-nine Plant Species That Are Potential New Sources of γ -Linolenic Acid, *JAOCS*, Vol. 78, no. 7.
- Guil-Guerrero, J. L., 2007.** Stearidonic acid (18:4n-3): Metabolism, Nutritional Importance, Medical Uses And Natural Sources, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 1226–1236.
- Guil-Guerrero, J. L., Rinco'n-Cervera M. A. and Venegas-Venegas E., 2010.** Gamma-linolenic and stearidonic acids: Purification and up grading of C18-PUFA oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 112, 1068–1081.
- Gunstone, F. D, 2001.** Procedures used for modification in *Structured and Modified Lipids*, 11-36. Editor: Frank D. Gunstone, Markel Dekker Press, New York.
- Gibon, V., 2006.** Fractionation of lipids for use in food, *Modifying lipids for use in food*. Edited by Frank D. Gunstone, CRC Press Cambridge, England, Bölüm: 10, 201-231.
- Hjaltason, B., 2006.** Use of fish oils and marine PUFA concentrates *Modifying lipids for use in food*. Edited by Frank D. Gunstone, CRC Press Cambridge, England, Bölüm: 10, 201-231.
- Haraldsson, G. G., Kristinsson, B., Sigurdardottir, R., Gudmundssona, G. G., and Breivik, H., 1997.** The Preparation of Concentrates of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid by Lipase-Catalyzed Transesterification of Fish Oil with Ethanol, *JAOCS* 74, 1419-1424.
- Hai-bo, G., Xue-yi, M., Jing-bo, W., Qi, Z., Wen-bing, Y. and Yi-ping, C., 2009.** Concentration of α -Linoleic Acid of Perilla Oil by Gradient Cooling Urea Inclusion, *Agricultural Sciences in China*, 8(6): 685-690.
- Haraldsson, G. G., 1984.** Separation of Saturated/Unsaturated Fatty Acids, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 219-222.

- Harris, K. G., 2009.** Omega-3 versus Omega-6 Fatty Acid İntake and immunity in *Health Promotion and Disease Causation*, Editor, Watson, R. R., AOCS press, USA.
- Harris, W. S., Lemke, S. L., Hansen, S. N., Goldstein, D. A., DiRienzo, M. A., Su H., Nemeth, A. M., Taylor, M. L., Ahmed, G., George C., 2008.** Stearidonic Acid-Enriched Soybean Oil Increased the Omega-3 Index, an Emerging Cardiovascular Risk Marker, *Lipids*, 43:805–811.
- Hills, J. M., Kiewitt, I., Mukherjee, K. D., 1990.** Enzymatic fractionation of fatty acids: Enrichment of γ -linolenic acid and docosahexaenoic acid by selective esterification catalyzed by lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol:67, no:9, sayfa:561-564.
- Huang, F. C., Ju, Y. H., Huang C. W., 1997.** Enrichment of γ -linolenic acid from borage oil via lipase-catalyzed reactions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 977–981.
- Huang, Y. S., Ziboh, V. A., 2001.** γ -Linolenic Acid, Resent Advances in *Biotechnology and Clinical Applications*, AOCS Press, Editör, Yuang Sheng Huang, Vincent A. Ziboh.
- Horrobin, D. F., 1992.** Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid, *Prog. Lipid Res.* Vol. 31, No. 2, pp. 163-194.
- Kapoor, R., 2005.** γ -Linolenic acid: the health effects, in *Healthful Lipids*, sayfa: 301-334, Editör C.C Akoh ve O.M.Lai, AOCS Press, Champaign,IL.
- Kapoor R. and Nair, H., 2005.** Gamma Linolenic Acid Oils. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Editör Fereidoon Shahidi, 4. Bölüm, 67-119.
- Kent, L., Üstün, G., 2010.** Alabalık yağından çoklu doymamış yağ asitleri eldesi: Tepki yüzey metodolojisi ile optimizasyonu. *İTÜ dergisi*, Cilt:9 Sayı:4 ,103-110.
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., Appel L. J., 2002.** Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *American Heart Association, Nutrition Committee*, 106:2747–57.
- Krukonis, V., 1998.** In European Pharmaceutical Contractor (EPC), May, London. Sayfa 2-10.
- Lang, Q., Wai, M.,C., 2001.** Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta* 53, 771–782, *Elsevier Science*.
- Li, H., Ruan, X. Z., Powis, S. H., Fernando, R., Mon, Y. W. Wheeler, D. C., Moorhead, C. F. and Varghese Z., 2005.** EPA and DHA reduce LPS-induced inflammation responses in HK-2 cells: Evidence for a PPAR-c–dependent mechanism. *Kidney International*, Vol. 67 pp. 867–874.
- Li, D., Bode, O., Drummond, H., Sinclair, A., 2003.** Omega-3 (n-3) fatty acids, *Functional Foods and Nutraceuticals*, Oily Press, Editor, Frank D. Gunstone, İngiltere. Bölüm:8 Sayfa:225-262.
- Liu, S., Zhang, C., Hong, P., Ji, H., 2006.** Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea

complexation: optimization of process parameters, *Journal of Food Engineering* 73: 203–209.

- Lobb, K. and Chow, C. K., 2008.** Fatty acid classification and nomenclature, in *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*, sayfalar 1-15, editör Chow, C.K., CRC press, New York.
- López-Martínez, J. C., Campra-Madrid, P., Guil-Guerrero J. L., 2004.** γ -Linolenic Acid Enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* Seed Oils and Fatty Acids by Low Temperature Crystallization, *Journal Of Bioscience and Bioengineering* vol. 97, No. 5, 294–298. 2004.
- López-Martínez, J.C., Campra-Madrid, P., Ramírez-Fajardo, A., Esteban-Cerdán L. and Guil-Guerrero J. L., 2006.** Screening of Lipases For Enzymatic Concentration of γ -Linolenic Acid (GLA) From Seed Oils, *Journal of Food Lipids* 13, 362–374.
- Miles, E. A., Banerjee, T., Dooper, M. M. B. W., M'Rabet, L., Graus, Y. M. F., Calder P. C., 2004.** The influence of different combinations of gamma-linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *Br J Nutr*, 91, 893–903.
- Mukherjee, K. D., 2002.** Lipid Biotechnology, in *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Editor: Casimir C. Akoh, David B. Min, Markel Dekker Press.
- Nahar, L., Sarker, S. D., 2012.** Supercritical Fluid Extraction in Natural Products Analyses, *Natural Products Isolation*, Humana Press. Bölüm 3., Sayfa 43-75.
- Okada, T., Morrissey, M. T., 2007.** Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis, *Food Chemistry* 103, 1411–1419.
- O'keefe, S. F., 2002.** Nomenclature and Classification of Lipids, in *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology, Second Edition, Revised and Expanded*, Editor: Casimir C. Akoh, David B. Min, Markel Dekker Press, Sayfa 1-40.
- Ramesh, G., Das, U. N., 1998.** Effect of Dietary Evening Primrose, Black Currant, Borage and Fish Oils on Two Stage Skin Carcinogenesis in Mice, *Prostaglandins Leukot Essential Fatty Acids*, 59: 155-161.
- Ratledge, C., 2001.** Microorganisms as Sources of Polyunsaturated Fatty Acids, *Structured and Modified oils*, Editör: Frank D. Gunstone, Markel Dekker Press, New York.
- Rincón-Cervera M., A. and Guil-Guerrero J. L., 2010.** Preparation of stearidonic acid-enriched triacylglycerols from *Echium plantagineum* seed oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 112, 227–232.
- Rubio-Rodríguez, N., Beltrán, S., Jaime, I., Diego, S. M., Sanz, M.T., Carballido, J. R., 2010.** Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 1–12.
- Sayanova, O., Smith, A. M., Lapinskas, P., Stobart, A. K., Dobson, G., Christie, W. W., Shewry, P. R. and Napier, J. A., 1997.** Expression of a

borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome *b5* domain results in the accumulation of high levels of $\Delta 6$ -desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 94, pp. 4211–4216, *Plant Biology*.

- Scrimgeour, C. M. ve Harwood J. L., 2007.** Fatty Acid and Lipid Structure, *The Lipid Handbook*, Sayfa 1-5. Editorler; F. D. Gunstone, J. L., Harwood, A. J. Dijkstra, CRC Press, New York.
- Senanayake, S. P. J. N, and Shahidi, F., 2000.** Concentration of Docosahexaenoic Acid (DHA) From Algal Oil via Urea Complexation, *Journal of Food Lipids* 7 51-61.
- Shahidi, F., Wanasundara, U. N., 1998a.** Lipase-Assisted Concentration of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Acylglycerols from Marine Oils, *JAOCS*, vol:75, no:8, sayfa: 945-951.
- Shahidi, F., & Wanasundara, U. N. 1998b.** Omega-3 fatty acid concentrates: Nutritional aspects and production Technologies, *Trends in Food Science & Technology*, 9, 230–240.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Shibahiraki, M., Fujita, H., Nakano, H., Nagao, T., Terai, T., and Tominaga, Y., 1997.** Purification of γ -linolenic acid from borage oil by a two-step enzymatic method. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 1465-1470.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Nakano, H., Kuramoto, T., Nagao, T., Gemba, M. and Tominaga Y., 1997.** Purification of Docosahexaenoic Acid by Selective Esterification of Fatty Acids from Tuna Oil with *Rhizopus delemar* Lipase, *JAOCS* 74, 97–101.
- Shimada, Y., Sakai, N., Sugihara, A., Fujita, H., Honda, Y., Tominaga Y., 1998.** Large-Scale Purification of γ -Linolenic Acid by Selective Esterification Using *Rhizopus delemar* Lipase, *JAOCS* 75, 1539–1543.
- Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., 2001.** Enzymatic purification of polyunsaturated fatty acids. *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 529–538.
- Simopoulos, A. P., 2006.** Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases *Biomedicine & Pharmacotherapy* 60, 502–507.
- Singh, S. P., Zhou, X. R., Liu, Q., Stymne, S., Green, A. G., 2005.** Metabolic engineering of new fatty acids in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 8:197–203.
- Spurvey, A. S., Shahidi, F., 2000.** Concentration of γ - Linolenic Acid (GLA) From Borage Oil By Urea Complexation: Optimization of Reaction Conditions, *Journal of Food Lipids*, 7, 163-174. *Food di Nutrition Press, Trumbull, Connecticut*.
- Syed Rahmatullah, M. S. K., Shukla, V. K. S., Mukherjee, K. D., (1994a).** Enrichment of γ -Linolenic Acid from Evening Primrose Oil and Borage Oil via Lipase-Catalyzed Hydrolysis, *J. American Oil Chemists Society*, 71, 569-573.
- Syed Rahmatullah, M. S. K., Shukla, V. K. S., Mukherjee, K. D., (1994b).** γ -Linolenic Acid Concentrates from Borage and Evening Primrose Oil

Fatty acids via Lipase-Catalyzed Esterification, *J. American Oil Chemists Society*, vol:71, no:6 563-567.

- Tso, P., Caldwell, J., Lee, D., Boivin, G. P., De Michele, S. J., 2012.** Comparison of growth, serum biochemistries and n-6 fatty acid metabolism in rats fed diets supplemented with high-gamma-linolenic acid safflower oil or borage oil for 90 days, *Food and Chemical Toxicology* 50,1911–1919.
- Türk Standartları Enstitüsü, 2010.** Hayvansal ve Bitkisel Katı ve Sıvı Yağlar-Asit Sayısı ve Asitlik Tayini, *TS EN ISO, 660* Ankara.
- Ursin, V. M., 2003.** Modification of Plant Lipids for Human Health: Development of Functional Land-Based Omega-3 Fatty Acids, *Symposium: Improving Human Nutrition through Genomics, Proteomics and Biotechnologies, J. Nutr.* 133: 4271–4274.
- Vazquez, L., Akoh, C. C., 2012.** Enrichment of stearidonic acid in modified soybean -oil by low temperature crystallisation, *Food Chem* 130:147–155.
- Yang, T., Freukilde, M-B., and Xu, X., 2003.** Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 881-887.
- Yehuda, S., 2009.** The importance of the Omega-3 and Omega-6 Ratio: Brain Biochemistry, Cognition, and Behavior fatty acids in *Health Promotion and Disease Causation*, Editor, Watson, R. R., AOCS press, USA.
- Yüksel, A., Yeşilçubuk, N. Ş., 2012.** Enzymatic production of human milk fat analogues containing stearidonic acid and optimization of reactions by response surface methodology, *LWT-Food Science and Technology* 46, 210-216.
- Wanasundara, U. N., Shahidi, F., 1999.** Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions, *Food Chemistry*, 65, 41-49.
- Wanasundara, U. N., Wanasundara, P. K. J. P. D. and Shahidi, F., 2005.** Novel Separation Techniques for Isolation and Purification of Fatty Acids and Oil By-Products, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Sixth Edition, Six Volume Set.* Edited by Fereidoon Shahidi., John Wiley & Sons, Inc.
- Watkins, S. M., German, J. B., 2002.** Unsaturated fatty acids, in *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Editor: Casimir C. Akoh, David B. Min, Markel Dekker Press, sayfa 559-588.
- Ward O. P., Singh, A. 2005.** Omega-3/6 Fatty Acids: Alternative Sources of Production, *Process Biochemistry*, 40, 3627–3652.
- Whelan, J., 2009.** Dietary Stearidonic Acid is a Long Chain (n-3) Polyunsaturated Fatty Acid with Potential Health Benefits, *J. Nutr.* 139: 5–10.
- Wu, M., Ding, H., Wang, S., Xu, S., 2008.** Optimizing Conditions for the Purification of Linoleic Acid from Sunflower Oil by Urea Complex Fractionation, *J Am Oil Chem Soc.* 85:677–684.

Xu, X., 2000. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review, *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 287–303.

Frankel, E. N., Satue-Gracia, T., Meyer, A. S., German, J. B., 2002. Oxidative Stability of Fish and Algae Oils Containing Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Bulk and in Oil-in-Water Emulsions, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2094–2099.

URL-1 <<http://www.ienica.net/crops/echium.pdf>>, alındığı tarih 19.01.2013.

URL-2 <http://www.dweckdata.com/Published_papers/Echium.pdf>, alındığı tarih 19.01.2013.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Özlem ÖZMEN

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 24.01.1986.

Adres: İTÜ-Fen Bilimleri Enstitüsü/Ayazağa Kampüsü-İstanbul

E-Posta: oozmen@itu.edu.tr

Lisans: Atatürk Üniversitesi-Ziraat Fakültesi-Gıda Mühendisliği Bölümü



TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Özmen, Ö., Sahin, N., 2013. Concentration of Polyunsaturated Fatty Acids from *Echium vulgare* seed oil by Urea Complexation, EUROFOODCHEM XVII, İstanbul, Turkey. (Poster sunumu)