

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KONJUGE LİNOLENİK ASİTÇE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ
ZEYTİNYAĞININ ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eser ARAS

Anabilim Dalı : Kimya Mühendisliği

Programı : Kimya Mühendisliği

OCAK 2011

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KONJUGE LİNOLENİK ASİTÇE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ
ZEYTİNYAĞININ ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eser ARAS

(506071031)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07 Aralık 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 25 Ocak 2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Melek TÜTER (İTÜ)

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Nuran DEVECİ (İTÜ)

Prof. Dr. Necla ARAN (İTÜ)

OCAK 2011

Anne, baba ve kardeşlerime,

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince çok değerli katkılarıyla beni yönlendiren, bana her konuda yardımcı olan, her türlü desteği ve emeği esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Melek Tüter'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca tezimin şekillenmesinde değerli katkı ve yardımlarından dolayı hocalarım Sayın Prof. Dr. Güldem Üstün ve Prof. Dr. Ayşe Aksoy'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca olduğu gibi bu çalışmam sırasında da yanımda olan benden desteğini esirgemeyen aileme bugüne kadar verdikleri emekten ve gösterdikleri sabırdan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ocak 2011

Eser Aras

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Zeytin Meyvesi ve Özellikleri.....	3
2.2 Zeytin Yağı.....	5
2.2.1 Zeytinyağı çeşitleri.....	6
2.2.1.1 Naturel zeytinyağı.....	6
2.2.1.2 Rafine Zeytinyağı.....	7
2.2.1.3 Riviera zeytinyağı.....	7
2.2.2 Zeytinyağının bileşenleri.....	7
2.2.3 Türkiye ve Dünya’da zeytincilik ve zeytinyağı sektörü	9
2.2.4 Zeytinyağının fonksiyonel özellikleri ve insan sağlığı üzerindeki etkileri.	10
2.3 Nar Bitkisi ve Nar yağı	11
2.4 Konjuge Linolenik Asit.....	13
2.5 Yapılandırılmış Yağlar	15
2.5.1 Yapılandırılmış yağ sentezlenmesinin nedenleri	16
2.5.2 Yapılandırılmış yağların sentezlenmesinde kullanılan yağ asitleri.....	17
2.5.2.1 Kısa zincirli yağ asitleri (KZYA).....	17
2.5.2.2 Orta zincirli yağ asitleri (OZYA).....	17
2.5.2.3 Uzun zincirli yağ asitleri (UZYA).....	17
2.6 Yapılandırılmış yağ sentezlenmesinde kullanılan yöntemler	18
2.6.1 İnteresterifikasyon.....	18
2.6.1.1 Transesterifikasyon.....	19
2.6.1.2 Asidoliz.....	19
2.6.1.3 Alkoliz ve gliseroliz.....	20
2.7 Enzimatik Yöntemle Yapılandırılmış Yağ Üretimi	21
2.7.1 Enzimatik yöntemle yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan lipazlar ..	21
2.7.2 Enzimatik prosesi ve ürün verimini etkileyen faktörler	22
2.7.2.1 Lipaz seçiminin etkisi.....	22
2.7.2.2 Su miktarının etkisi.....	24
2.7.2.3 Sürenin etkisi.....	24
2.7.2.4 Sıcaklığın etkisi.....	24

2.7.2.5 Substrat mol oranının etkisi.....	25
2.7.2.6 Çözücü sisteminin etkisi.....	25
2.7.3 Kimyasal ve enzimatik yöntem ile yapılandırılmış yağ üretiminin kıyaslanması	26
2.8 Yapılandırılmış Yağların Kullanım Alanları.....	27
2.9 Literatürde KLNA İle Yapılandırılmış Yağ Üretimi Üzerine Yapılan Çalışmalar	28
2.10 Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM)	31
2.10.1 Merkezi bileşik deney tasarımları	32
2.10.2 Varyans analizi (ANOVA).....	34
2.10.3 Regresyon analizi	35
2.10.4 Kalanların toplamı.....	35
2.10.5 Korelasyon katsayısı	35
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	37
3.1 Kullanılan Hammaddeler	37
3.2 Çalışma Yöntemi.....	37
3.2.1 Nar yağının ekstraksiyonu.....	37
3.2.2 Nar yağından serbest yağ asitlerinin hazırlanması.....	37
3.2.3 Kullanılan hammadde ve reaksiyon ürünlerinin karakterizasyonu	38
3.2.4 Zeytinyağı ile KLNA'nın asidoliz reaksiyonunda uygulanan yöntem.....	39
3.2.5 Asidoliz ürünlerinin analizi	40
3.2.6 Deneysel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi	40
3.2.7 Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu	41
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	43
4.1 Nar Çekirdeklerinin Yağ İçeriği.....	43
4.2 Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri	43
4.3 Tepki Yüzey Metodolojisi'nde Kullanılacak Değişken Seviye Değerlerinin Belirlenmesi	45
4.3.1 Asidoliz reaksiyonuna substrat mol oranı ve reaksiyon süresinin etkisi... 45	
4.3.2 Asidoliz reaksiyonuna enzim miktarının etkisi	48
4.3.3 Asidoliz reaksiyonuna sıcaklığın etkisi.....	50
4.4 Tepki Yüzey Metodolojisi'ne göre Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu.....	52
4.5 Farklı Reaksiyon Koşullarının Zeytinyağı ile KLNA'nın Asidoliz Reaksiyonuna Etkilerinin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi	56
4.6 İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması	60
5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	63
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	71

KISALTMALAR

ANOVA	: Analysis of variance
DAG	: Diaçilgliserol
DHA	: Dokosahekzaenoik
EPA	: Eikosapentenoik asit
EYA	: Esansiyel yağ asidi
KLA	: Konjuge linoleik asit
KLNA	: Konjuge linolenik asit
KNYA	: Kudret narı yağ asidi
KY	: Kanola yağı
KZYA	: Kısa zincirli yağ asidi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MAG	: Monoaçilgliserol
MBDT	: Merkezi bileşik deney tasarımı
MY	: Mısır yağı
MYA	: Mahlep yağ asidi
NYYA	: Nar yağı yağ asidi
OZT	: Orta zincirli triaçilgliserol
OZYA	: Orta zincirli yağ aside
SY	: Soya yağı
SYA	: Serbest yağ asidi
TAG	: Triaçilgliserol
TYM	: Tepki Yüzey Metodolojisi
UZK	: Uluslararası Zeytinyağı Konseyi
UZYA	: Uzun zincirli yağ asidi
YMMBDT	: Yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarımı
YY	: Yapılandırılmış yağlar
ZY	: Zeytinyağı

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Zeytinin kimyasal bileşimi [8].	5
Çizelge 2.2 : Çeşitli ülkelere ait zeytinyağının % yağ asidi bileşimi [1].	8
Çizelge 2.3 : Dünya zeytin üretimi (bin ton) [17].	10
Çizelge 2.4 : Nar yağının yağ asidi bileşimi [21].	12
Çizelge 2.5 : Üç faktörlü sistem için yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarımı [65].	34
Çizelge 3.1 : Gaz kromatografisi analiz koşulları.	39
Çizelge 4.1 : Nar çekirdeklerinin yağ içeriği.	43
Çizelge 4.2 : Zeytinyağının yağ asitleri bileşimi.	44
Çizelge 4.3 : Nar yağının yağ asitleri bileşimi.	44
Çizelge 4.4 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin ZY:KLNA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (T=50 °C, %10 enzim, 1:3 mol oranı).	45
Çizelge 4.5 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin ZY:KLNA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (T=50 °C, %10 enzim, 1:4 mol oranı).	46
Çizelge 4.6 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin ZY:KLNA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (T=50 °C, %10 enzim, 1:5 mol oranı).	46
Çizelge 4.7 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin ZY:KLNA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (T=50 °C, %10 enzim, 1:6 mol oranı).	47
Çizelge 4.8 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin enzim miktarı ile değişimi (ZY:NYYA mol oranı 1:4, sıcaklık 50°C, enzim miktarı % 5).	49
Çizelge 4.9 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin enzim miktarı ile değişimi (ZY:NYYA mol oranı 1:4, sıcaklık 50°C, enzim miktarı % 15).	49
Çizelge 4.10 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin sıcaklık ile değişimi (ZY:NYYA mol oranı 1:4, enzim miktarı % 10, sıcaklık 35°C).	51
Çizelge 4.11 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin sıcaklık ile değişimi (ZY:NYYA mol oranı 1:4 , enzim miktarı %10, sıcaklık 60°C)..	51
Çizelge 4.12 : Yüzey Merkezli Küp Tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviye değerleri.	53
Çizelge 4.13 : Yüzey Merkezli Küp Deney Tasarımındaki deney tasarım noktaları.	53

Çizelge 4.14 : Zeytinyağı ile konjuge linolenik asidin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri, ZY:NYYA mol oranı 1:3, (Deney No: 1 - 4 sonuçları).....	54
Çizelge 4.15 : Zeytinyağı ile konjuge linolenik asidin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri (ZY:NYYA: mol oranı 1:5) (Deney No: 5 - 8 sonuçları).	54
Çizelge 4.16 : Zeytinyağı ile konjuge linolenik asidin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri (Sıcaklık 50°C) (Deney No: 9-12 sonuçları).....	55
Çizelge 4.17 : Zeytinyağı ile konjuge linolenik asidin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri (ZY: NYYA mol oranı 1:4, Enzim miktarı %10) (Deney No: 13-17 sonuçları)	55
Çizelge 4.18 : Yüzey Merkezli Küp Tasarımına göre yürütülmüş asidoliz reaksiyonlarından elde edilen tepki değerleri.....	56
Çizelge 4.19 : Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları	56
Çizelge 4.20 : Varyans analizi sonuçları.....	58
Çizelge 4.21 : Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Zeytin bitkisi ve meyvesi .	3
Şekil 2.2 : Nar meyvesi	11
Şekil 2.3 : Linolenik, punisik, α -Eleostearik ve β - Eleostearik asidin kimyasal yapıları	13
Şekil 2.4 : Yapılandırılmış yağların genel yapısı (U: uzun zincirli yağ asidi, O: orta zincirli yağ asidi ve K: kısa zincirli yağ asidini ifade etmektedir) .	15
Şekil 2.5 : İki farklı triaçilgliserol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu	19
Şekil 2.6 : Bir açilgliserol ve bir asit arasındaki asidoliz reaksiyonu	20
Şekil 2.7 : Bir açilgliserol ve bir alkol arasındaki alkoliz reaksiyonu	20
Şekil 2.8 : Pozisyonel seçiciliğe sahip olmayan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonları (L: Uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi)	23
Şekil 2.9 : sn-1 ve sn-3 pozisyon seçiciliğine sahip olan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonları (L: Uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi)	23
Şekil 2.10 : Merkezi bileşik deney tasarımında üç değişkenli bir sistem için deney noktaları örneği .	33
Şekil 2.11 : Yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarımında üç değişkenli bir sistem için deney noktaları örneği	33
Şekil 4. 1 : Zeytinyağının NYYA ile asidolizinde, KLNA katılımının farklı reaksiyon sürelerinde substrat mol oranı ile değişimi.	47
Şekil 4.2 : Zeytinyağının NYYA ile asidolizinde, KLNA katılımının farklı substrat mol oranlarında reaksiyon süresi ile değişimi.	48
Şekil 4.3 : Zeytinyağının NYYA ile asidolizinde, KLNA katılımının farklı reaksiyon sürelerinde enzim miktarı ile değişimi.	50
Şekil 4.4 : Zeytinyağının NYYA ile asidolizinde, KLNA katılımının farklı reaksiyon sürelerinde sıcaklık ile değişimi.	52
Şekil 4.5 : Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki	59
Şekil 4.6 : Ürünün KLNA içeriğinin, sıcaklık ve enzim miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği	60
Şekil 4.7 : Ürünün KLNA içeriğinin, NYYA:ZY mol oranı ve enzim miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği	61
Şekil 4.8 : Ürünün KLNA içeriğinin, NYYA:ZY mol oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği	61

KOJUGE LİNOLENİK ASİTÇE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ZEYTİNYAĞININ ÜRETİMİ VE OPTİMİZASYONU

ÖZET

Türkiye Dünya zeytinyağı üretiminde ön sıralarda yer almaktadır. Zeytinyağının insan sağlığı açısından önemli besin kaynağı olmasının yanında bazı hastalıklara karşı koruyucu etkisi olduğu da bilinmektedir.

Nar meyvesi, içeriğindeki yağ asidi bileşiminden kaynaklanan endüstriyel ve tıbbi potansiyeli dolayısıyla milyonların önemli ölçüde ilgisini çekmektedir. Nar çekirdeğinin konjuge linolenik asitçe (KLNA) , ağırlıklı olarak punisik asit, zengin olduğu bilinmektedir. KLNA, üç konjuge çift bağ içeren oktadekatrienoik asitlerin pozisyonel ve geometrik izomerleri karışımı için kullanılan kolektif bir terimdir. Bunlar hayvansal yağlarda yaygın olarak bulunmazken çeşitli bitkilerin tohum yağlarında bulunurlar. Günümüzde KLNA insan sağlığı üzerinde yararlı etkilerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. KLNA'nın vücut ağırlığını kontrol etmek, kandaki kolesterol seviyesini ayarlamak, kalp hastalıklarına karşı korumak, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve bazı kanser tiplerinde ilerlemeyi önlemek gibi önemli etkileri olduğu bilinmektedir.

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

Bu çalışmada, zeytinyağının konjuge linolenik asit ile enzimatik olarak zenginleştirilmesi ve sağlığa yararlı, birçok olumlu özelliğe sahip fonksiyonel bir gıda haline gelmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, zeytinyağı ile konjuge linolenik asitçe zengin olan nar yağı yağ asitlerinin (NYYA) asidoliz reaksiyonları *Thermomyces lanuginosa* lipaz enzimi varlığında hekzan ortamında gerçekleştirilmiştir. Tepki Yüzey Metodolojisi uygulanarak, reaksiyon parametrelerinin (substrat mol oranı, reaksiyon süresi, enzim miktarı ve sıcaklık) zeytinyağına katılan KLNA yüzdesi üzerine olan etkileri incelenmiş ve reaksiyon koşulları optimize edilmiştir.

Üç değişkenli ve üç seviyeli Yüzey Merkezli Küp Deney Tasarımı kullanılarak yürütülmüş deneyler sonucunda, optimum reaksiyon koşulları 1:3,5 ZY: NYYA mol oranı, 9,7 enzim miktarı ve 60°C sıcaklık değeri olarak saptanmıştır. Bu koşullarda, zeytinyağından içeriğinde %41 konjuge linolenik asit bulunan yapılandırılmış triaçilgliseroller (TAG) elde edilmiştir.

PRODUCTION AND OPTIMIZATION OF OLIVE OIL ENRICHED IN CONJUGATED LINOLENIC ACID

SUMMARY

Turkey is a leading country in olive oil production in all over the world. Olive oil is known a source of significant nutritional value in human health on the other hand it has a preventive role against many illness.

The pomegranate fruit takes considerable attention of millions due to its industrial and pharmaceutical potential coming from its fatty acid content. Pomegranate seed is known rich in conjugated linolenic acid, mainly punisic acid. Conjugated linolenic acid (CLNA) is a collective term for the positional and geometric isomers of octadecatrienoic fatty acids those contain three double bonds. They are not very common in animal fats but are found in various seed oils. Recently CLNA have attracted a great attention due to its beneficial effects on human health. It controls body weight, regulates cholesterol level in blood, defends against heart diseases, enhances immune system and prevents progression of some cancer types.

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

In this study, enrichment of olive oil with CLNA by using lipase as a catalyst and develop a functional food that has various health benefits and functions are aimed.

For this purpose, the acidolysis reaction of olive oil (OO) with pomegranate oil fatty acid (POFA) which is rich in CLNA, in the presence of *Thermomyces lanuginosa* lipase and hexzan was studied in detail. The effects of substrate molar ratio, reaction time, enzyme amount and temperature on incorporation yield and ratio are investigated and optimized by Response Surface Methodology.

Among all the experimental results which are occurred by Face Centered Cube Experimental Design (3 parameters and 3 levels) for optimization, the optimum reaction conditions are found as substrate molar ratio of 1:3,5 of OO:POFA, %9,7 enzyme amount and 60°C temperature. In these conditions the incorporation ratio of conjugated linolenic acid into olive oil is determined as %41.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Temel besin maddelerinden olan ve insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan yağlar insan organizması için gerekli olan ve yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesinde beslenme zinciri içerisinde mutlaka yer alması gereken ana besin maddelerindendir. Canlının anatomik yapısının oluşum ve korunmasındaki önemli işlevlerinin yanında, vücudun estetik görünümünü de olumlu yönde etkilerler. Yağlar, vücut sıcaklığının ve suyunun korunmasında izolatör olarak görev yapmakla beraber, A,D,E,K gibi yağda çözünen vitaminleri içermeleri sebebiyle de önem kazanmaktadır. Ayrıca hayvansal organizmalarda sentezlenemeyen esansiyel yağ asitleri gibi bazı elzem bileşikler için de, yegane kaynak durumundadırlar.

Ancak sağlığa olan faydalarının yanında doğru tüketilmediklerinde obezite, kalp ve damar hastalıkları gibi rahatsızlıklara neden olabilmektedirler. Bu nedenle, günümüzde birçok biyoteknolojik çalışmalarla yağlar, özellikleri olumlu şekilde geliştirilerek sağlığa daha faydalı ürünler haline getirilmektedir. Yapılandırılmış yağların üretimine ilişkin çalışmalar da bu amaçladır.

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

Ülkemizde de önemli ölçüde üretilen zeytinyağı dünyanın en eski ve önemli yağlarındanıdır. Zeytinyağı, sahip olduğı yağ asitleri, hidrokarbonlar ve steroller gibi bileşenler sayesinde insan sağlığı açısından oldukça önemli bir yağ çeşididir.

Konjuge linolenik asit (KLNA), üç konjuge çift bağ içeren oktadekatrienoik asidin pozisyonel ve geometrik izomerlerinin oluşturduğu bir karışımdır. Çeşitli bitkilerin tohum yağlarında bulunan KLNA'nın en önemli kaynaklarından biri de nar meyvesi çekirdekleridir. Yapılan çalışmalar KLNA'nın insan sağlığı üzerine pek çok olumlu etkisinin olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmada, zeytinyağının nar yağı yağ asitleri ile enzimatik asidoliz reaksiyonu sonucu KLNA'ca zenginleştirilmiş yapısal yağ üretimi ve asidoliz reaksiyonu üzerine etki eden substrat mol oranı, enzim miktarı ve reaksiyon süresinin Tepki-Yüzey Metodolojisi ile optimizasyonu amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Zeytin Meyvesi ve Özellikleri

Zeytin, zeytingiller (Oleaceae) familyasından Akdeniz iklimine özgü *Olea europaea* olarak bilinen zeytin ağacının meyvesidir. Bin yıllardır Akdeniz Havzasında yetiştirilen zeytin, ilk tarım ürünlerinden biri olarak bilinmektedir [1,2].

Akdeniz uygarlığının sembolü olan zeytin ağacı, tarih boyunca bu bölgede kurulan tüm uygarlıkların temelini oluşturmuştur. Zeytinin anavatanının ve gen merkezinin Güneydoğu Anadolu olduğu eskiden beri bilinmektedir. Son yıllardaki çalışmalarda Hatay, Kahramanmaraş ve Mardin şeridinde zeytin ağacının en alt türüne rastlanılmış olması bu yargıyı kesinleştirmiştir. Güneydoğu Anadolu'da ilk yerleşimini tamamlayan zeytin, Batı Anadolu'ya ve oradan da Ege adaları yolu ile Yunanistan, İtalya, Fransa ve İspanya'ya kadar uzanmıştır. Sicilya yolu ile Kuzey Afrika'ya sıçrayan zeytin, Güneydoğu Anadolu'dan çıkarak Suriye ve Mısır üzerinden ilerleyen ikinci kol ile birleşmiş ve böylece Akdeniz'in tüm güney kıyılarına yayılmıştır. Bir üçüncü kol da Irak ve İran üzerinden Afganistan ve Pakistan'a kadar ilerlemiştir. XVI. Yüzyılda İspanyollar tarafından Güney ve Kuzey Amerika'ya götürülmesi ile zeytinin dünyadaki yayılışı tamamlanmıştır [3]. Şekil 2.1'de zeytin bitkisi görülmektedir.



Şekil 2.1 : Zeytin bitkisi ve meyvesi [4].

Zeytin ağacı sık dallı, yayvan tepeli, her mevsim yeşil yapraklı bir ağaçtır. 1000 yıldan daha uzun süre meyve verebilen zeytin ağacının yaprakları birbirine çaprazdır. Yaprğını dökmeyen zeytin ağacının oval biçimli ince uzunca yapraklarının üstü koyu yeşil ve altı gümüşü renktedir [5].

Zeytin entansif yetiştiriciliğe uygun olduğu gibi, diğer ürünlerin yetiştirilemediği besin maddelerince fakir ve sulama imkanı bulunmayan kıraç topraklarda da yetiştirilebilmektedir. Ilıman iklimden hoşlanan zeytin için kışın dayanabileceği en düşük sıcaklık -7°C olup bu derecenin altında don zararı artar. Yıllık yağış en az 400 mm olmalıdır. Zeytin bitkisi genellikle kalkerli-kumlu, derin nemli ve besin maddelerince zengin toprakları sever. Zeytin ağacını yıl içersisindeki tüm gelişme dönemlerinde topraktaki nem eksikliğine göre ihtiyaç duyduğu dönemlerde sulamak gerekir. Özellikle de çekirdek sertleşme döneminde zeytinin su ihtiyacı karşılanmalıdır. Bu dönemde sulama yapılırsa ürün miktarı ağırlıkça artarken, ürünün sofralık değeri de yükselir [6].

Zeytin sofralık veya yağlık olarak değerlendirildiği için hasadı da farklı periyotlarda yapılmaktadır. Yeşil zeytin hasadı, meyvelerin rengi sarımsı-yeşile döndüğünde yapılır. Dokusu sertliğini biraz yitirmiş ve meyve normal iriliğini almıştır. Hasat zamanı; iklim, çevre ve çeşide göre Eylül-Ekim aylarıdır. Zeytinler siyah olarak hasat edilecekse çeşide has olgunluk rengini alması beklenir. Fazla gecikme danede yumuşamaya neden olur. Hasat genellikle Kasım-Aralık aylarında yapılır. Yağlık zeytinler ağaçta yeşil meyve kalmadığında, yağ oranının en yüksek seviyeye çıktığı zaman toplanır [6].

Ağaçtan düşürme-yerden toplama, doğrudan ağaç üzerinden elle veya bazı yardımcı aletlerle toplama şeklinde hasat yöntemleri vardır. Ürün kalitesi yönünden en iyi hasat şekli ürünün sıyrılmasıdır. Sırıkla yapılan hasatta dalların ve filizlerin kırılması ve müteakip yılın ürünün zarar görmesi gibi olumsuzluklar söz konusudur [6].

Zeytin meyvesinin temel bileşenleri su, yağ, karbonhidratlar, proteinler, vitaminler, organik asitler, renk maddeleri ve inorganik maddelerdir. Zeytin bileşiminin büyük bir kısmı su ve yağdan oluşmaktadır. Zeytinde bulunan yağın önemli bir bütünü meyve eti kısmında yer almakta ve meyvenin bünyesindeki mevcut suyla emülsiyon halinde bulunmaktadır [5,7]. Zeytin C vitamini içeren ve bileşiminde birçok fenolik madde bulunduran bir meyvedir. Bu maddeler içinde en önemlisi zeytin meyvesinde

acılığa yol açan oleoropin adlı fenolik bileşiktir. Zeytinin yağ ve diğer bileşenlerinin kompozisyonu değişkendir ve bu değişkenlik iklim, toprak, budama, gübreleme, ağaca yapılan işlemler ve hasat yöntemleri gibi birçok faktörden etkilenmektedir. Zeytinin kimyasal bileşimi genel olarak Çizelge 2.1’de gösterilmektedir [8].

Çizelge 2.1 : Zeytinin kimyasal bileşimi [8].

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

2.2 Zeytin Yağı

Akdeniz insanların beslemelerinde önemli bir yere sahip olan zeytinyağı *Olea europea L.* ağacının meyvesinden mekanik ekstraksiyon yolu ile elde edilmektedir [1]. Hiçbir kimyasal işlem görmeden bile doğal hali ile tüketilebilen ve oda sıcaklığında sıvı olan bir yağdır [9].

Zeytinyağı, esas olarak yemeklerde tüketilmekle birlikte ayrıca gıda sanayisinde, sabun yapımında, tekstil yağları üretimi ve sülfonatlı bileşiklerin üretiminde de kullanılmaktadır [9,10].

Zeytin meyvelerinin normal iriliği aldığı ve yağ içeriklerinin maksimum düzeye ulaştığı devrede toplanarak çeşitli işlemlerle yağının meyve suyundan ayrılması,

zeytinyağı üretiminin temelini oluşturmaktadır. Bu şekilde zeytinden ana ürün olarak yağ elde edilmektedir. Meyvenin yağ içeriği, olgunluk ilerledikçe artar ve ağaç üzerinde yeşil meyve kalmayınca en yüksek seviyeye ulaşır [9].

2.2.1 Zeytinyağı çeşitleri

Zeytinyağları temel olarak serbest yağ asitlerinin miktarına göre değerlendirilir. Uluslararası Zeytinyağı Konseyi'nin (UZK) yayınladığı haliyle piyasada bulunan zeytinyağların bilinen 3 tanımı vardır [11].

2.2.1.1 Naturel zeytinyağı

Naturel zeytinyağları zeytin ağacı meyvesinden, yağın doğal özelliklerini değiştirmeyecek bir sıcaklıkta sadece mekanik veya fiziksel işlemler uygulanarak elde edilen, berrak, yeşilden sarıya değişebilen renkte, kendine özgü tat ve kokuda olan doğal hali ile gıda olarak tüketilebilen yağlardır [1, 3, 5].

Direkt tüketime uygun olan naturel zeytinyağları:

- **Naturel sızma zeytinyağı;** Kokusu ve tadında kusur olmayan, duyuşal özellikleri UZK metoduna göre 6.5 veya üzerinde tanımlanmış serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden en çok % 1 olan naturel zeytinyağıdır. Naturel sızma zeytinyağı her tür yemeklere uygun olmakla beraber salatalar için de ideal bir kullanım alanına sahiptir [1, 5, 11].
- **Naturel birinci zeytinyağı;** Kokusu veya tadında çok hafif kusurları bulunabilen, duyuşal özellikleri 5.5 veya daha fazla olarak tanımlanmış, serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok %2 olan naturel zeytinyağıdır.
- **Naturel ikinci zeytinyağı;** Kokusu veya tadında tolere edilebilen kusurları bulunan, duyuşal özellikleri 3.5 veya daha fazla olarak tanımlanmış, serbest asitlik derecesi (oleik asit cinsinden) en çok % 3,3 olan naturel zeytinyağıdır.

Direkt tüketime uygun olmayan naturel zeytinyağı;

- **Lampant zeytinyağı;** Asitlik derecesi oleik asit cinsinden %3.3'ten fazla olan, duyuşal özellikleri 3.5'ten az olarak tanımlanmış, rafinasyon veya teknik amaçlı kullanıma uygun naturel zeytinyağıdır [1, 11].

2.2.1.2 Rafine Zeytinyağı

Ham zeytinyağının doğal trigliserid yapısında değişikliğe yol açmayan metotlarla rafine edilmesi sonucu elde edilen sarının değişik tonlarında rengi olan, kendine özgü tat ve kokuda bir yağdır. Serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden en çok % 0,3'tür. Rafine zeytinyağı elde edebilmek amacı ile yağlar, asiditenin giderilmesi (nötralizasyon), rengin açılması (ağartma) ve koku giderilmesi (deodorization) olarak bilinen üç değişik türde işleme tabi tutulurlar. Rafinasyon işlemleri ile triaçilgliserollerin orijinal yapıları bozulmadan zeytinyağı kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve istenmeyen bileşenler uzaklaştırılmaktadır [5].

2.2.1.3 Riviera zeytinyağı

Rafine zeytinyağı ile doğrudan tüketilebilecek naturel zeytinyağlarının değişik oranlarda karışımından oluşan, yeşilden sarıya değişen renkte, kendine özgü tat ve kokuda bir yağdır. Serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 1.5 gramdan fazla olmamalıdır.[1,3] Kullanılan yağların türü ve karışım oranlarına bağlı olarak bu yağların asitlik dereceleri, renkleri ve organoleptik özellikleri (tat ve aromaları) farklılık göstermektedir [5].

2.2.2 Zeytinyağının bileşenleri

Zeytinyağı, zeytin ağacının meyvesinden sadece mekanik yollarla elde edildiği ve tüketilmeden önce rafinasyon gerektirmediği için karakteristik aromasını korur. Yağın bu kendine has lezzeti ve aroması, yapısındaki fenolik bileşiklerden ve farklı miktarlardaki çok çeşitli uçucu bileşenlerin var olmasından kaynaklanır. Zeytinyağı bileşenleri, sabunlaşabilen ve sabunlaşamayan bileşenler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Zeytinyağının temel yapısını oluşturan triaçilgliseroller ve serbest yağ asitleri ile fosfatidler başlıca sabunlaşabilen bileşenler arasındadır. Sabunlaşmayan bileşenler ise, hidrokarbonlar, steroller, alkoller, aroma maddeleri ve pigmentler ile diğer bileşenlerden oluşmaktadır. Zeytinyağının %99'u gliserole bağlı yağ asitlerinden (diğer adı ile trigliserit) oluşmaktadır. Zeytinyağındaki yağ asitlerinin büyük bir kısmı doymamış yapıdadır [12].

Zeytinyağının başlıca yağ asitleri oleik (18:1), linoleik (18:2), palmitoleik (16:1), palmitik (16:0) ve stearik (18:0) asittir [5]. Zeytinyağında en yüksek oranda bulunan yağ asidi oleik asittir. Bunun yanında zeytinyağı diğer bitkisel yağlara göre daha çok

oleik ve daha az linoleik ve linolenik asit içermektedir. Bu durum zeytinyağını oksidasyona karşı daha dirençli kılmaktadır. Zeytinyağının yağ asidi bileşenleri ve içerikleri, zeytinin yetiştirme ve ekim alanının iklim koşulları, zeytinyağı çeşidi ve daha birçok faktöre bağlı olarak değişim gösterebilir [11,13]. Zeytinyağında yağ asitlerinden başka küçük miktarlarda bulunan bileşenler vardır. Azınlık bileşenler olarak adlandırılan bu bileşenler oldukça önemlidir. Bu bileşenlerden bazılarının insan sağlığı için yararlı olduğu bildirilmiş, diğer bir kısmının yağın kararlılığına olumlu yönde etki ettiği gözlenmiş ve azımsanmayacak bir kısmının da yağın kendine has lezzetini oluşturduğu saptanmıştır. Zeytinyağının azınlık bileşenlerini hidrokarbonlar, tokoferoller, aldehytler, alkoller, fenoller, esterler, ketonlar, furanlar, fosfatidler, steroller, fosfolipitler, aroma maddeleri ve renk vericiler oluşturmaktadır. Bu bileşenler toplam zeytinyağı bileşiminin en çok %1'ini oluşturmaktadırlar [11,14,15]. Çizelge 2.2'de değişik ülkelere ait zeytinyağının yağ asidi bileşimi verilmiştir.

Çizelge 2.2 : Çeşitli ülkelere ait zeytinyağının % yağ asidi bileşimi [1].

Yağ Asidi	KAN^a	Avrupa	Türkiye	Tunus	Limit
Palmitik	16:0	8.4	12.1	15.3	7.5-20.0
Palmitoleik	16:1	0.7	0.7	1.6	0.3-3.5
Heptadekanoik	17:0	0.1	0.2	0.1	0.0-0.3
Heptadekenoik	17:1	0.1	0.2	0.1	0.0-0.3
Stearik	18:0	2.5	3.1	2.1	0.5-5.0
Oleik	18:1	78.0	71.3	62.5	55-83
Linoleik	18:2	8.3	10.6	16.5	3.5-21
Linolenik	18:3	0.8	0.7	0.8	0.3-0.9
Araşidik	20:0	0.5	0.4	0.5	0.2-0.6
Eikosenoik	20:1	0.3	0.3	0.3	0.1-0.4
Behenik	22:0	0.1	0.2	0.1	0.0-0.2

KAN ^a= Karbon atom numarası

2.2.3 Türkiye ve Dünya’da zeytincilik ve zeytinyağı sektörü

Ülkemiz zeytinin anavatanıdır. Dünyanın en önemli zeytin üreticileri arasında yer alan Türkiye, tane zeytin üretimi bakımından dünyada 4.sırada yer almakla birlikte özellikle siyah zeytin üretiminde 1.sıradadır. Elde edilen ürünün yaklaşık %75’i yağlık, %25’i ise sofralık olarak değerlendirilmektedir [14].

Zeytinciliğin merkezi olan Akdeniz havzasının doğusunda yer alan ülkemizde zeytin, Ege ve Marmara sahillerimiz başta olmak üzere tüm sahil şeritlerimizde ve Güneydoğu Anadolu Bölgemizde yetiştirilmektedir. Ülkemizde zeytin üretiminin %80.5’i Ege Bölgesinde yapılmaktadır. Bu bölgeyi %11.8 ile Akdeniz, %6.1 ile Marmara Bölgesi izlemektedir. Ülkemizde birçok ailenin geçim kaynağı zeytinciliktir ve zeytinyağı tüketimi, üretim bölgelerinde yoğunluk kazanmış durumdadır [8].

Dünyada zeytin alanları 30–40 derece enlemler arasında yayılım göstermekte ve toplam 35 ülkede tarımı yapılmaktadır. Ağaç varlığının %98 ‘i Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerde yer almakta ve yaklaşık 13 milyon ton olan dünya dane üretiminin büyük bir miktarı yine Akdeniz’e kıyısı olan ülkelerde gerçekleştirilmektedir. Dünya zeytinciliğindeki büyük üretici ülkeler AB çatısı altındadır. Avrupa Birliği ülkelerinden sonra diğer zeytinci Akdeniz ülkeleri arasında Türkiye, Tunus, Fas, Cezayir, Libya, Mısır, Ürdün, Suriye; Amerika kıtasında ise ABD ve Arjantin önde gelmektedir. Dünya zeytinyağı üretiminin %60’ı Avrupa ülkeleri, %40’ı da diğer ülkeler tarafından gerçekleştirilmektedir. Dünya dane zeytin üretiminde İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus ilk beş ülke olarak yer alırken zeytinyağı üretiminde bu sıralamada Türkiye, Tunus ile sırasını değiştirmektedir [16].

Çizelge 2.3’te Dünya’daki önemli zeytin üreticilerine ait üretim istatistikleri ve Türkiye’nin bu üreticiler arasındaki üretim durumu verilmiştir [17].

Çizelge 2.3 : Dünya zeytin üretimi (bin ton) [17].

Ülke	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09
AB	759,0	739,5	623,5	714,5	720,5	671,5
ABD	100	87,0	116,0	18,0	109,0	48,0
Arjantin	70,0	60,0	85,0	75,0	100,0	95,0
Avusturalya	2,0	4,0	4,0	2,5	2,0	2,0
Cezayir	70,0	60,0	85,0	75,0	100,0	95,0
Fas	120,0	80,0	100,0	90,0	100,0	100,0
İran	12,0	18,0	24,0	39,5	39,5	30,0
İsrail	7,5	18,5	10,0	24,0	9,0	16,5
Libya	3,5	4,5	3,0	3,0	3,0	3,0
Lübnan	7,0	6,0	6,0	6,0	22,5	52,5
Meksika	2,5	2,5	2,0	0,0	0,0	0,0
Mısır	95,0	194,5	200,0	436,0	432,0	440,0
Suriye	120,0	200,0	120,0	200,0	100,0	120,0
Tunus	26,0	13,0	26,5	15,0	18,0	18,0
Türkiye	125,0	240,0	280,0	240,0	200,0	300,0

2.2.4 Zeytinyağının fonksiyonel özellikleri ve insan sağlığı üzerindeki etkileri

Zeytinyağının sadece mekanik sistemler kullanılarak elde edilmesi insan sağlığı açısından birçok olumlu etkiye yol açmaktadır. Antioksidan içeriği yüksek olan naturel sızma zeytinyağı, tarihsel gelişim süreci içinde sadece gıda maddesi olarak tüketilmemiş aynı zamanda farklı hastalıkların tedavisinde de kullanılmıştır [8]. Naturel zeytinyağının bu önemi içeriğindeki yüksek seviyelerdeki tekli doymamış yağ asitlerinden (özellikle oleik asit) ve alifatik, triterpenik alkol, sterol, hidrokarbon, uçucu bileşikler gibi azınlık bileşenler ile birçok antioksidandan kaynaklanır. Zeytinyağının temel antioksidanları hem lipofilik hem de hidrofilik özelliği olan karotenoidler ve fenolik bileşiklerdir [18]. Zeytinyağının yüksek oranda içerdiği ve antioksidan özelliği gösteren fenolik bileşenler sayesinde kalp ve damar sağlığı korunmakta ve kalp ve damar hastalıklarının oluşum riski azalmaktadır. Fenolik bileşikler, antioksidan aktiviteleri sayesinde lipid peroksidasyonunu ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidatif modifikasyonunu önlerler. Bunun yanında fenolik bileşikler anti-inflammatuar, antiallerjik, anti-mikrobiyal, anti-karsinojenik ve anti-viral etkileri dolayısıyla insan sağlığı üzerinde önemli etkiye sahiptir. [19].

Owen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada zeytinyağının içerdiği oleik asit ve fenolik bileşenlerin bağırsak, göğüs ve cilt kanseri ile koroner kalp hastalığını önlediği ve oksidatif stresi yok ederek yaşlanmaya karşı koruyucu etki yaptığını belirtmiştir [20].

Zeytinyağının insan sağlığına çok çeşitli faydaları bulunmasına karşın, 0-1,5 mol/mol linolenik asit içeriği ile omega 3 esansiyel yağ asitleri bakımından fakir bir yağ çeşididir. Bu özelliğinin geliştirilmesi amacı ile yapılandırılmış yağ üretiminde zeytinyağı kullanılabilmektedir [8].

2.3 Nar Bitkisi ve Nar yağı

Nar (*Punica granatum L.*), İran, Hindistan, ABD ve birçok yakın ve uzak doğu ülkelerinde yetişen yenilebilir en eski meyvelerdendir. Narın 1000'in üstünde değişik kültürü olduğu bilinmektedir. Hastalık riskini azaltmaya yönelik önemli bileşikler içermesi sebebiyle insanların beslenmesinde yarar sağlayan fonksiyonu bu meyveye olan ilgiyi günden güne arttırmaktadır [21].

1 - 5 m boyunda çalı yada ağaççık şeklinde çok dallı bir taca sahip olan nar sıcak ve kurak iklim meyvesidir. Genellikle -10 °C'ye kadar dayanır. Nar çok değişik topraklarda yetiştirilebilmekle birlikte; yetiştiricilik için en uygun topraklar derin, tınlı, geçirgen, hafif alkali ve organik maddece zengin topraklardır. Narlar sıcak ve kuru hava şartlarının yanı sıra, nemli ve serin toprak şartları isterler. Yağışların yeterli olmadığı dönemlerde narlarda sulama şarttır. Yaygın çeşitleri: Deve dişi, Kadı, Lefon, Misk, Zivzik, Çekirdeksiz ve Hicaz narıdır [22]. Şekil 2.2'de nar meyvesi görülmektedir.



Şekil 2.2 : Nar meyvesi [22].

Nar yağının linoleik, oleik ve palmitik asitten oluşan yağ asidi bileşiminin % 65'ini punisik asit (18:3n-5) oluşturur. Ayrıca 150 ppm toplam fenolik bileşik içerir ve antioksidan etkiye sahiptir. Çizelge 2.4'te nar yağının yağ asidi bileşimi görülmektedir [21].

Çizelge 2.4 : Nar yağının yağ asidi bileşimi [21].

Yağ asidi	Bileşim (%)
16:0	4.8
18:0	2.3
18:1	6.3
18:2n-6	6.6
18:3n-5	65.3

Çoklu doymamış yağ asitlerinin, kolesterolü düşürmeyi destekleyen etkisi, kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalıkları önlemeye yardımcı olması bu yağ asitlerince zengin olan nar yağına tüketicinin ilgisini arttırmıştır [23].

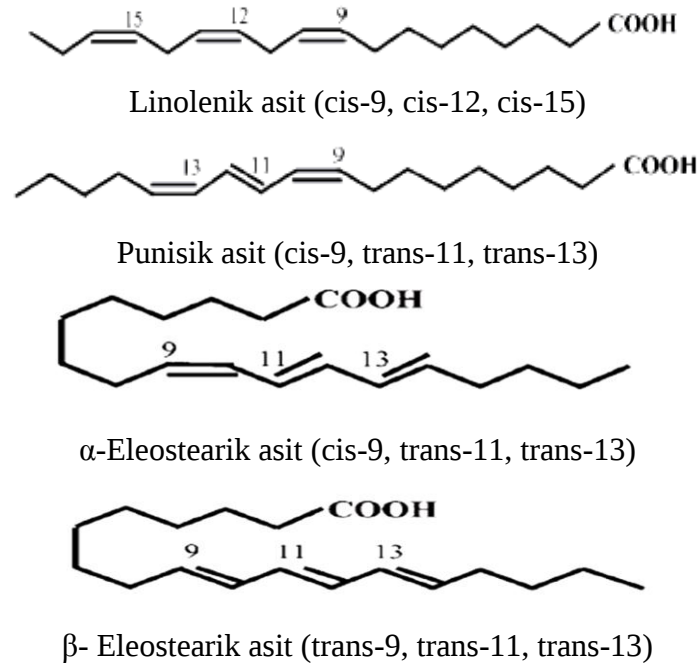
Nar çekirdeklerinden elde edilen nar yağı yağ asitlerinin (NYYA'nın) insan sağlığına olumlu etkileri vardır. Yapılan çalışmalar sonucunda, nar kabuğunun yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, antimikrobiyal, antibakteriyel ve antimutajenik özelliklere de sahip olduğu belirtilmektedir. Narın özellikle kalp-damar hastalıklarını önleyici rolünden ve kötü kolesterol olarak bilinen LDL'yi azaltıcı etkisinden de bahsedilmektedir [24,25].

Aviram ve çalışma arkadaşlarının erkek fareler üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada, düzenli olarak nar suyu tüketiminin lipoprotein oksidasyonu üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca çalışmada, aterosikleroz hastalıklı farelerin, nar suyu ile düzenli beslenmeleri sonucunda dokularında oluşan bozulmaların % 44 oranında azaldığı belirtilmektedir [26]. Amerika'da yapılan bir araştırmada, üç ay süreyle günde yaklaşık olarak tüketilen 226 gram narın kalp kaslarına giden oksijen miktarını arttırarak kalp atardamarı ile ilgili rahatsızlığı olan hastalarda iyileşmeye yardımcı olabileceği belirtilmektedir [27]. Amerika'da yapılan diğer bir araştırmada ise narın prostat kanserini önleyebilecek ya da ilerlemesini yavaşlatabilecek özelliklere sahip olabileceği belirtilmiştir. Fareler üzerinde yapılan araştırmalar, narla yapılan tedavilerde, tümörlerin gelişimini engelleyebilecek ve yaşama şansını yükseltebilecek özellikler göstermiştir. Başka bir gelişme ise göğüs kanseri riskini azaltabilecek niteliğe sahip olabileceği yönündedir [28].

2.4 Konjuge Linolenik Asit

Konjuge Linolenik Asit (KLNA), üç konjuge çift bağ içeren oktadekatrienoik asidin pozisyonel (8,10,12-18:3; 9,11,13-18:3, vb.) ve geometrik (ttt, ctt, ctc, vb.) izomerlerinin oluşturduğu bir gruptur. Diğer adı oktadekatrienoik asit olan KLNA, çoklu doymamış bir yağ asididir [29,30].

Yedi farklı KLNA izomerinin olduğu bilinmektedir Hayvansal yağlarda kayda değer miktarda KLNA bulunmazken çeşitli çekirdek yağlarında yüksek miktarlarda bulunur. Örneğin, α -elostearik asit (9cis, 11trans, 13trans-18:3) tung çekirdeği yağında (*Aleurites fordii*) % 68, kabak çekirdeği yağında % 52 oranında bulurken, esas itibariyle Türkiye'ye özgü olan mahlep çekirdeğinden (*Prunus mahaleb* L.) elde edilen mahlep yağında % 35 oranında bulunur. Nar çekirdeği yağı (*Punica granatum* L.) %8 3 punisik asit (9c,11t,13c-18:3) içerirken, katalpa çekirdeği yağı (*Catalpa bignonioides*) yaklaşık % 42,3 katalpik asit (9t,11t,13c-18:3) içerir. Aynısafa bitkisinin (*Calendula officinalis* L.) çekirdeğinden elde edilen yağda % 62 kalendik asit (8t,10t,12c-18:3) bulunurken, *Jacaranda mimosifolia* çekirdeği yağında jakarik asite (8c,10t,12c-18:3) rastlanır [29,30]. Şekil 2.3'te bazı KLNA izomerlerine ait kimyasal yapılar görülmektedir.



Şekil 2.3 : Linolenik, punisik, α -Eleostearik ve β - Eleostearik asidin kimyasal yapıları [31,32].

Bu tür yağ asitlerini içeren yağlar organik kaplama maddeleri ve polimer üretimi için önemli ham maddelerdir. Doymamış konjuge yapı iyi polimerizasyona yardım ederken doğru şekilde uygulandığında yapışkan özelliği verir [33]. Son yıllarda, boya formüle etmede reaktif seyreltici olarak aynısefa çiçeği yağının kullanılması önem kazanmıştır. Bu uygulamayla, aynısefa çiçeği yağı içerdiği reaktif konjuge C-18 trien sayesinde insan sağlığına ve doğaya zararlı solvent emülsiyonunu azaltmaktadır [29].

Suzuki ve arkadaşları tung, katalpa ve nar çekirdeğinden elde edilen KLNA'nın insandaki monosit lösemi hücreleri için güçlü sitotoksik etkisinin olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca punisik asit, α -eleostearik asit ve katalpik asitin kalendik asitten daha güçlü sitotoksik etkiye sahip olduğunu açıklamışlardır [34].

Igarashi ve Miyazawa konjuge trans trienoik yağ asitlerinin, α -eleostearik asitin alkali muamelesi sonucu elde edilen diğer konjuge trienoik ve dienoik asitten daha güçlü olarak, insandaki tümör hücrelerinin büyümesini önleyici etkisini ortaya koymuştur [35].

Başka bir çalışmada ise, Tsuzuki ve arkadaşları KLNA'nın insandaki farklı tümör çeşitlerine olan baskılayıcı etkisini araştırmak üzere insandan alınan çeşitli tümör hücrelerini farelere nakletmişlerdir. Sonuçta tung yağında bulunan ve bir KLNA izomeri olan α -eleostearik asitin iki çeşit konjuge linoleik asit (KLA) türünden, 9c11t-KLA ve 10t12c-KLA, daha güçlü antitümör etkisini ortaya koymuştur [32].

Dhar ve arkadaşları karela çekirdeği yağından elde ettikleri KLNA'nın (9c,11t,13t-18:3) diyetler üzerindeki etkisini araştırmak üzere ayçiçeği yağından elde edilen KLA'dan oluşan kontrol numunesi ve %0,5,%2 ve %10 oranındaki KLNA-KLA karışımlarından oluşan yağ numuneleri ile 4 hafta boyunca fareleri beslemişlerdir. Sonuçta en yüksek toplam kolesterol saf KLA ile beslenen farelerde görülürken bu oran diğer 3 deney grubunda artan KLNA miktarıyla artış göstermiştir. Aynı şekilde yüksek yoğunluklu lipid kolesterolü (HDL-kolesterol) en yüksek %0 9c,11t,13t-18:3 numunesinde görülürken diğer 3 deney grubunda önemli bir değişim gözlenmemiştir [36].

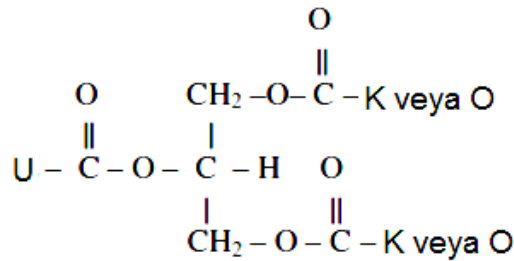
2.5 Yapılandırılmış Yağlar

Yenilebilir yağlar bitkilerden, hayvanlardan ve deniz kökenli canlılardan elde edilirler. İnsanların ve hayvanların beslenmesinde esansiyel önemi olan yağların sağladığı enerji (9kcal/g) aynı miktardaki protein ve karbonhidratların sağladığı enerjiden (4kcal/g) iki kat daha fazladır [37].

Yağların temel yapısını gliserol ve yağ asitlerinden oluşan triaçilgliseroller (TAG) oluşturur. Yağlar triaçilgliseroller dışında, monoaçilgliseroller (MAG), diaçilgliseroller (DAG), fosfolipidler, pigmentler, steroller, serbest yağ asitleri, yağ alkolleri, yağda çözünen vitaminler ve diğer bileşenleri içerir [37].

Yağların fiziksel ve kimyasal yapısı, triaçilgliserol üzerindeki yağ asitlerinin yapısına ve yağ asitlerinin gliserol iskelet üzerindeki dağılımına bağlıdır. Yağ asitleri, zincir uzunluğuna ve çift bağın sayısına, pozisyon ve konfigürasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Bitkisel ve hayvansal yağların fiziksel ve kimyasal yapılarının bu kadar farklı olması yağların bir takım kimyasal ve biyoteknolojik uygulamalar ile değişik şekilde modifiye edilmesine olanak sağlar. TAG'lerin besinsel ve fonksiyonel özelliklerinin geliştirilmesi amacı ile çeşitli yöntemler kullanılarak yapılandırılmış yağlar elde edilmektedir [8].

Yapılandırılmış yağlar (YY) triaçilgliserollerin yapısı üzerine kimyasal ya da enzimatik yollarla yeni yağ asitlerinin yerleştirilmesi veya doğal yapısındaki yağ asitlerinin pozisyonlarının veya bileşimlerinin değiştirilmesi ile modifiye edilmiş özgün triaçilgliserollerdir [38]. Şekil 2.4'te yapılandırılmış yağların genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2.4 : Yapılandırılmış yağların genel yapısı (U: uzun zincirli yağ asidi, O: orta zincirli yağ asidi ve K: kısa zincirli yağ asidini ifade etmektedir) [39].

2.5.1 Yapılandırılmış yağ sentezlenmesinin nedenleri

Yağlar önemli enerji sağlayıcı besinler olmalarının yanında esansiyel yağ asitleri ve vitamin (A,D,E,K, vs) kaynağı olması açısından da önemlidir. Oysaki son zamanlarda gıdalardaki bitkisel ve hayvansal yağların azaltılması giderek önem kazanmaktadır. Bunun ana nedeni yağların kolesterol ve obezite gibi birçok sağlık sorununa yol açmalarıdır. Bunun sonucu olarak daha az kalorili yapılandırılmış yağların üretimi önem kazanmaktadır [40].

Yapılandırılmış yağlar tedavi edici veya ürünün fonksiyonel özelliklerini iyileştirme amaçlı olarak kullanılabilirler. Bunun yanında bu yağlar “nutraceutical” olarak adlandırılan sağlığı kuvvetlendirici yeni bir lipid çeşidi olarak bilinmektedirler. “Nutraceutical”, beslenme etkisinin yanında sağlığa faydası olan gıda maddelerinin tanımlanmasında kullanılan bir terimdir. Bu ürünlerin normal bir gıdaya katılması, katıldığı gıdaya sağlık yönünden faydalı özellikler kazandırır [41]

Yapılandırılmış yağ üretiminde farklı yağ asitleri kullanılarak her birinin özellikleri sayesinde YY’ların fizyolojik yararları da arttırılmış olmaktadır. Yapılandırılmış yağlar bağışıklık sistemini geliştirmek, kandaki kolesterol miktarını düşürmek, beyin gelişimini olumlu yönde etkilemek gibi çeşitli faydalara sahiptirler. Sindirim ve emilim özellikleri değiştirilerek hazırlanan yapılandırılmış yağlar, belirli diyet yağlarını metabolize edemeyen veya pankreatik rahatsızlıkları olan kişiler için faydalı olmaktadır. Yapılandırılmış yağlar kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu özelliklerinin yanında kanser oluşumunu inhibe edebilme ve trombozu önleyebilme etkisine de sahiptirler [39,42].

Yapılandırılmış yağlar, insan sağlığına olan faydalarının yanı sıra yağların kullanım fonksiyonlarını geliştirmek amacı ile üretilmektedirler. Yapılandırılmış yağlar, TAG’ın erime sıcaklığı, katı yağ miktarı, iyot ve sabunlaşma değerleri gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilmek için kullanılırlar. Farklı nitelikte özel yağlar üretmek, doymamış yağ asidi içeren margarin üretmek, yağın kristal yapısını değiştirmek ve yağların erime özelliklerini geliştirmek yapılandırılmış yağların üretilmesinin diğer nedenleri arasındadır [43].

2.5.2 Yapılandırılmış yağların sentezlenmesinde kullanılan yağ asitleri

Yapılandırılmış yağ sentezinde çeşitli yağ asitleri kullanılmaktadır. Yapılandırılmış yağların istenilen özelliklere sahip olması için yağ asitlerinin hepsinin fonksiyon ve özelliklerini göz önünde bulundurmak son derece önemlidir. Yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan yağ asitleri kısa zincirli yağ asitleri, orta zincirli yağ asitleri ve uzun zincirli yağ asitleri şeklinde sıralanabilir. Ayrıca çoklu ve tekli doymamış yağ asitleri de yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılmaktadır. Kullanılan yağ asidi ve bunların TAG içindeki konumu yapılandırılmış yağların fiziksel, fonksiyonel ve metabolik özelliklerini belirler [8].

2.5.2.1 Kısa zincirli yağ asitleri (KZYA)

Zincir uzunluğu 2-6 karbon atomu arasında değişim göstermektedir. Bu yağ asitleri uçucu yağ asitleri olarak da bilinmektedir. Kısa zincirli yağ asitlerinin (KZYA) geleneksel kaynakları, inek sütü ve tereyağıdır. Suda çözünebilme özellikleri, moleküler yapıları ve kısa zincir uzunluğu sayesinde bu yağ asitleri diğer yağ asitlerine göre midede daha çabuk adsorbe olmaktadır. KZYA'lar diğer yağ asitlerine göre daha az yanma ısısına sahip olduklarından daha az kalori değerine sahiptirler [8].

2.5.2.2 Orta zincirli yağ asitleri (OZYA)

6–12 karbon atomu arasında değişim gösteren zincir uzunluğuna sahiptirler. Hindistan cevizi ve hurma yağı başlıca orta zincirli yağ asidi (OZYA) kaynaklarıdır. OZYA'lar vücutta glukoz kadar çabuk metabolize olabilmektedir. Obeziteyle mücadelede faydalı olabilecekleri halde serum içerisindeki kolesterol miktarını da belirgin şekilde arttırabilirler [8].

2.5.2.3 Uzun zincirli yağ asitleri (UZYA)

14–24 karbon atomu arasında değişim gösteren zincir uzunluğuna sahiptirler. Uzun zincirli yağ asitleri (UZYA), hayvansal ve bitkisel yağlarda yaygın olarak bulunmaktadır. KZYA ve OZYA'lara göre daha yavaş adsorbe ve metabolize olmaktadır. Büyük bir çoğunluğu da kalsiyumla birleşerek dışkı ile atılmaktadır. KZYA ve OZYA'lara göre daha fazla hidrofobik özellik göstermeleri dolayısıyla UZYA'lar kan içinde taşınmaz ya da adsorbe edilemezler. Çok değişik tipte UZYA

bulunmaktadır. Bu yağ asitlerinin içinde en önemli olanlar insanlar tarafından üretilmeyen esansiyel yağ asitleridir (EYA). Linoleik asit (18:2n-6) ve Linolenik asit (18:3n-3), EYA grubu yağ asitleridir [39].

UZYA'lar doymuş ve doymamış yağ asitleri olarak iki gruba ayrılabilirler. ω -3, ω -6 ve ω -9 yağ asitleri doymamış yağ asitleri arasındadır. n-3 yağ asitleri olarak da bilinen ω -3 yağ asitlerinin en çok bilineni linolenik asittir. Balık yağında bulunan eikosapentenoik asit, 20:5n-3 (EPA), dokosahekzaenoik, 22:6n-3 (DHA), yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan diğer omega-3 yağ asitleridir. γ -linolenik asit (GLA) diğer önemli ω -3 yağ asitleri arasındadır [39].

ω -6 (n-6) yağ asitleri arasında en çok bilinen yağ asidi linoleik asittir. Linoleik asit hindistan cevizi, kakao ve palm cevizi gibi pek çok bitki tohumunda bulunur. Oleik asit ise ω -9 (n-9) yağ asitleri arasında en yaygın olarak bilinen yağ asididir. Oleik asit insan vücudunda sentezlenebildiği için esansiyel yağ asidi grubu içinde yer almamaktadır [39].

2.6 Yapılandırılmış yağ sentezlenmesinde kullanılan yöntemler

Yapılandırılmış yağlar (YY) kimyasal veya enzimatik reaksiyonlar yardımıyla sentezlenebilirler. YY sentezi için literatürde bahsedilen en yaygın yöntem, iki TAG arasındaki reaksiyondur (interesterifikasyon-iç esterleşme). Kimyasal olarak, sodyum metoksit gibi alkali kullanılarak katalizlenen iç esterleşme, maliyet açısından daha ucuz ve yürütülmesi kolaydır. Fakat istenen triağılglicerollerin yanında kolay giderilemeyen ve istenmeyen yan ürünler de açığa çıkar. Ayrıca, kimyasal reaksiyon belirsizlikler içerir ve son ürünlerdeki yağ asidi dağılımının kontrolü zordur [44].

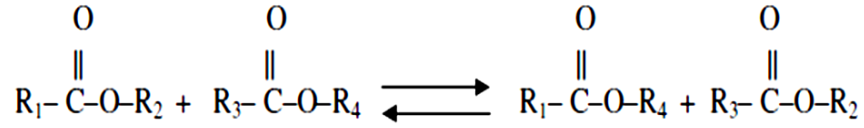
2.6.1 İnteresterifikasyon

Kimyasal interesterifikasyon reaksiyonları, endüstride hayvansal ve bitkisel yağların modifikasyonunda kullanılan başlıca reaksiyonlardır. Hayvansal ve bitkisel yağlardaki TAG karışımlarının fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini modifiye etmeye yarayan prosestir. Hem kimyasal hem de enzimatik olarak interesterifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilebilmektedir. En basit tanımıyla interesterifikasyon, başlangıçtaki TAG'dan farklı fiziksel ve kimyasal özellikleri olan bir yeni bir TAG yapısı vermek üzere iki TAG arasındaki açıl grubu değişimidir. Bunun yanında

interesterifikasyon terimi çoğunlukla bir ester ve asit (asidoliz), bir ester ve alkol (alkoliz) veya bir ester ve başka bir ester arasındaki açıl değişimi reaksiyonlarını ifade etmekte kullanılmaktadır [8,37].

2.6.1.1 Transesterifikasyon

Transesterifikasyon, iki ester arasında, yani iki triaçilgliserol arasında, gerçekleşen açıl grupları değişimidir. TAG içindeki yağ asitlerinin pozisyonel dağılımlarını değiştirip bitkisel ve hayvansal yağların veya bitkisel-hayvansal yağ karışımlarının fiziksel özelliklerini değiştirmek amacıyla transesterifikasyon reaksiyonu kullanılır. Gıda endüstrisinde en çok kullanılan interesterifikasyon reaksiyonudur [37,43]. Şekil 2.5 transesterifikasyon reaksiyonunu göstermektedir.

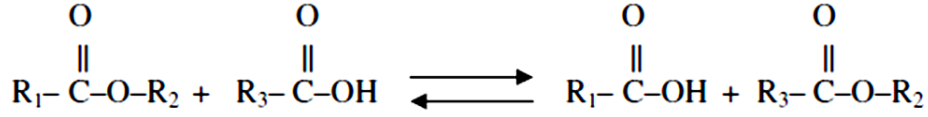


Şekil 2.5 : İki farklı triaçilgliserol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu [43].

2.6.1.2 Asidoliz

Asidoliz bir serbest yağ asidi (SYA) ve bir ester arasındaki açıl grup değişiminin gerçekleştiği interesterifikasyon reaksiyonudur. Reaksiyon asidik koşullarda gerçekleşir. Ortama ilave edilen asit TAG' dan serbest yağ asitlerinin hidrolizini katalizleyerek istenen DAG ve MAG'ların oluşumunu gerçekleştirir. Böylece serbest yağ asitleri elde edilen DAG ve MAG'ların serbest hidroksil gruplarına etkiyerek yeni TAG'ın sentezine yol açar. Bu reaksiyonlar reaktan ve ürünlerin denge karışımını verebileceği gibi reaksiyon ürünlerinden birinin fiziksel olarak ortamdan çekilmesi ile de tamamlanabilir. Teorik olarak reaksiyon serbest yağ asitlerinin fazlası kullanılarak yüksek verimlere zorlanabilir. Bununla birlikte, SYA'ların yüksek maliyeti ve asidoliz reaksiyonu tamamlandıktan sonra final üründen büyük miktarlardaki SYA'ları ayırma işleminin zorluğu açısından bu durum pratikte kabul gören bir uygulama değildir. Yaygın olarak bitkisel yağların ve balık yağlarının besin değerlerini arttırmak üzere, asidoliz reaksiyonu yardımıyla eikosapentanoik asit (EPA) ve dokosahekzanoik asidin (DHA) serbest yağ asitleri veya etil ester formları bu yağlara bağlanılır. Yağların besinsel özelliklerinin zenginleştirilmesinin yayında

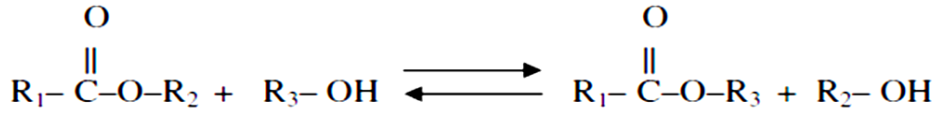
EPA ve DHA kullanılan asidoliz reaksiyonları yapılandırılmış yağların sentezlenmesinde kullanılan önemli bir yöntemdir [37,43]. Şekil 2.6 asidoliz reaksiyonunu göstermektedir.



Şekil 2.6 : Bir açılgliserol ve bir asit arasındaki asidoliz reaksiyonu [43].

2.6.1.3 Alkoliz ve gliseroliz

Alkoliz bir alkol ve ester arasındaki esterifikasyon reaksiyonudur. Bitkisel yağların alkolizinde TAG, bir alkolle güçlü bir asit veya baz varlığında gliserol ve alkil ester karışımı oluşturmak üzere reaksiyona girer. Bu alkoliz prosesi ara ürün olarak DAG ve MAG veren birtakım ardışık ileri ve geri denge reaksiyonlarından oluşur. Reaksiyon stokiyometrisi bir mol TAG ve üç mol alkolden oluşur. Alkolün fazlası alkil ester verimini artırarak gliserolle faz ayrımı sağlar [37]. Şekil 2.7 alkoliz reaksiyonunu göstermektedir.



Şekil 2.7 : Bir açılgliserol ve bir alkol arasındaki alkoliz reaksiyonu [43].

Gliseroliz, triaçilgliserol ve gliserol arasındaki açıl grup değişimidir. DAG ve MAG'lerin büyük çoğunlu TAG'ın kimyasal katalizli gliserolizi sonucunda üretilir. Bu proseste TAG'lar, yüksek sıcaklıklarda alkali katalizör varlığında, genellikle sodyum hidroksit, gliserolün fazlasıyla karıştırılır. Reaksiyon gliserolün hidroksil gruplarıyla TAG'ın yağ asitlerinin yeniden dağılımı gerçekleşene kadar yüksek sıcaklıklarda tutulur. Dengeye ulaşan reaksiyon soğutulup asit eklenerek, çoğunlukla fosforik asit, katalizör inaktive edilir. Bu katalizör filtrasyonla uzaklaştırılır. Reaksiyonda çözünen gliserolün fazlası sonradan vakum distilasyonu ile uzaklaştırılır [37].

2.7 Enzimatik Yöntemle Yapılandırılmış Yağ Üretimi

Enzimatik yöntemle yapılandırılmış yağ reaksiyonlarını hidrolaz grubu enzimi olan lipazlar katalizlemektedir. Yapılandırılmış yağ üretiminde uzun yıllar kimyasal interesterifikasyon kullanılmış fakat şimdilerde araştırmalar bunun yerini enzimatik interesterifikasyonla değiştirmeye doğru yönelmiştir. Bunun için iki sebep ortaya konulabilir. Kimyasal interesterifikasyon daha ağır reaksiyon koşulları gerektirir ve açıl gruplarının TAG yapısında rastgele dağılımını sağlar. Tersine enzimatik interesterifikasyon için daha tercih edilebilir faktörler sıralanabilir. Enzimler daha ılımlı koşullarda çalışırken, daha özellikli ürünler verirler ve daha az atık üretirler. Tekrar kullanılabilir immobilize enzimler ise daha ekonomik proseslerin uygulanabilirliği için öncülük etmektedirler[45].

2.7.1 Enzimatik yöntemle yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan lipazlar

Enzimlerin desteklediği proseslerin kullanılması antik medeniyetlere kadar uzanır. Bugün yaklaşık 4000 kadar enzimin var olduğu bilinmektedir ve bunların yaklaşık 200'ü ticari kullanıma uygun enzimlerdir. Endüstriyel enzimlerin büyük çoğunluğu mikrobiyal orijinlidir [46].

Lipazlar yaygın olarak doğada oluşurlar fakat sadece mikrobiyal lipazlar ticari önem taşır. Triaçilgliserol açıl hidrolazları olarak da bilinen lipazlar hayvansal ve bitkisel triaçilgliserollerini diaçilgliserol, monoaçilgliserol, serbest yağ asitleri ve gliserole hidroliz eden enzimlerdir. Ayrıca esterifikasyon reaksiyonlarını da katalizleyebilirler [8,46].

Esterazların aksine yağ-su ara yüzeyinde absorbe olduklarında aktif hale gelirler ve sıvının büyük kısmında çözünen substratları hidrolize etmezler. Birçok lipaz organik çözücülerde aktiftir ve aralarında esterifikasyon, transesterifikasyon, glikollerin ve mentollerin bölge seçici açılınmaları, peptitlerin sentezleri gibi birçok reaksiyonu katalizler [46].

Lipazlar yaygın olarak hayvansal ve bitkisel yağ proseslerinde, deterjan ve yağ giderme formülasyonlarında, gıda proseslerinde, kaliteli kimyasal ve ilaç sentezinde, kağıt imalatında ve kozmetik sanayinde kullanım bulmaktadır [46].

2.7.2 Enzimatik prosesi ve ürün verimini etkileyen faktörler

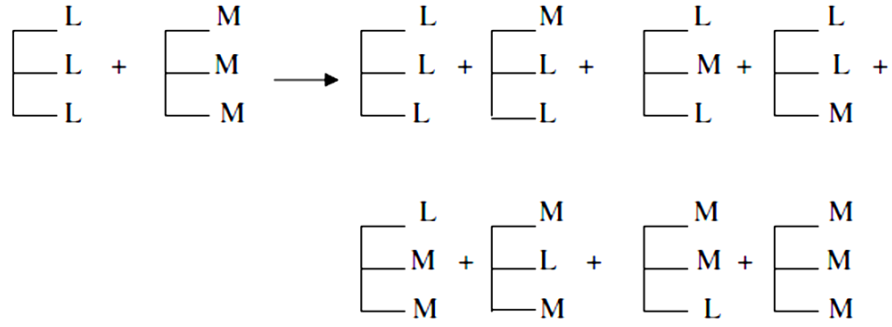
Enzimatik yöntemle yapılandırılmış yağ üretiminde reaksiyonlarda kullanılacak enzimin çeşidi, aktivitesi, miktarı, yükü, seçiciliği ve diğer özellikleri elde edilecek verim açısından son derece önem taşımaktadır. Ayrıca ortamdaki su miktarı, çözücü çeşidi, ortamın pH'sı, substrat mol oranı, inkübasyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı, prosesi ve ürün verimini etkileyen diğer faktörlerdir. Reaksiyonların hangi şartlar altında yürütüleceği substratın çeşidine ve istenen son ürünün özelliklerine bağlı olarak belirlenir [43,47].

2.7.2.1 Lipaz seçiminin etkisi

Lipazlar kimyasal yollarla kolay elde edilemeyecek yağ modifikasyonlarına neden olurlar. Onlara bu önemi kazandıran özellikleri TAG içindeki yağ asitlerine karşı pozisyonel seçiciliklerinin (1,3 seçici, rastgele seçici vs.) yanı sıra lipazların belirli yağ asidi türüne özgü olmasıdır. Yağ asitlerine karşı seçici ve spesifik olmaları TAG molekülü içinde spesifik yerleştirilmiş yağ asitlerinin olduğu yapılandırılmış yağların formüle edilmesine yarar [47].

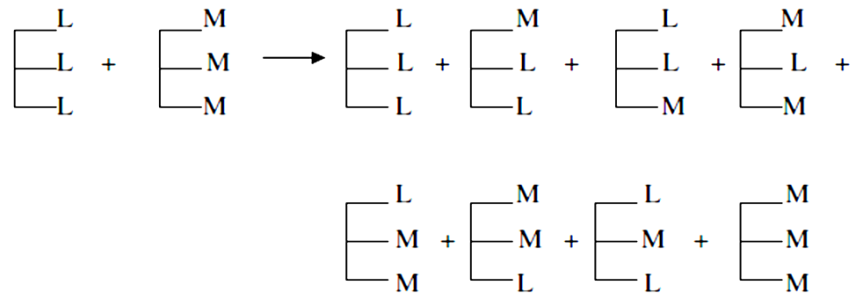
Lipazların pozisyon seçiciliği, substrat seçiciliği ve stereospesifliği sayesinde daha verimli bir şekilde istenen özelliklerde yapılandırılmış yağ üretmek mümkündür. Lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilen reaksiyonlarda en yüksek verimle en yüksek saflıkta ve istenen özellikte ürün elde etmek amaçlanmaktadır. Bu yüzden reaksiyon ve ürün veriminin artırılmasında enzim seçimi son derece önemlidir [43].

Bazı lipazlar yağ asitleri ile gliserid iskeleti arasındaki bağları gelişigüzel şekilde parçalarlar. Pozisyonel seçiciliğe sahip olmayan bu tür lipaz kaynaklarına örnek olarak *Candida sp.* ve *Pseudomonas sp.* gösterilebilir. Şekil 2.8'de pozisyonel seçiciliğe sahip olmayan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonlarının genel yapısı görülmektedir [8]. Burada MLL, LML, LLM, LMM, MLM ve MML yapılandırılmış yağları ifade etmektedir.



Şekil 2.8 : Pozisyonel seçiciliğe sahip olmayan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonları (L: Uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi) [48].

Pozisyonel seçicilikleri olan lipazlar ise sadece sn-1 ve sn-3 pozisyonundaki yani dıştaki ester bağlarını parçalamaktadırlar. *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus* ve *Rhizopus delemar*, sn-1 ve sn-3 pozisyonunda seçiciliğe sahip olan lipazlara örnek olarak gösterilebilir [8]. Şekil 2.9’da, sn-1 ve sn-3 pozisyonunda seçiciliğe sahip olan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonlarının genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2.9 : sn-1 ve sn-3 pozisyon seçiciliğine sahip olan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonları (L: Uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi) [48].

Yağ asidinin zincir uzunluğuna göre seçici olan lipazlar da bulunmaktadır. Örneğin, *Penicillium cyclopium* lipazı uzun zincirli yağ asitlerini parçalamaktadır. Bunun yanında *Aspergillus niger* ve *Aspergillus delemar* lipazları ise kısa zincirli yağ asitlerine seçicilik göstermektedir. Ayrıca yağ asidi seçici özelliğine sahip lipazlar da mevcuttur. Bu lipazlar cis-9 pozisyonuna karşı duyarlıdırlar. *Geotrichum candidum* lipazı cis-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun yağ asitlerine yönelik seçici özellik göstermektedir [48,49].

2.7.2.2 Su miktarının etkisi

Enzimatik reaksiyonlarda ortamda su bulunması gerekmektedir. Su varlığında enzimlerin aktivasyonu sağlanmakta, enzimin ve reaktanların difüzyonu istenilen düzeyde gerçekleşmektedir. Genel olarak ortamdaki su miktarının artması ile enzim aktivitesinde artış olduğu görülmektedir. Ortamdaki su miktarı reaksiyon hızını, ürün verimini, ürün seçiciliğini ve reaksiyon stabilitesini etkilemektedir. Kataliz için gerekli su miktarı enzimin kaynağına ve reaksiyonun gerçekleştiği çözücüye bağlı olarak değişmektedir. Bu nedenle maksimum verim elde edilebilmesi için optimum su miktarının tespit edilmesi gerekmektedir [50].

Lipaz varlığında gerçekleştirilen reaksiyonlarda aşırı miktarda su bulunmaması gerekmektedir. Az miktarda bulunan su ile yağ-su ara yüzeyi oluşmakta, bu da enzimin çalışması için uygun yapıyı meydana getirmektedir. Ayrıca esterifikasyon ve hidroliz tersinir reaksiyonlar olduklarından ortamdaki su miktarı reaksiyonun yönünü belirlemektedir. Su konsantrasyonunun artması dengenin hidroliz yönüne kaymasına neden olmaktadır. Bazı reaksiyonlarda az miktarda su ile ürün verimi artmakta ancak reaksiyon hızı düşmektedir. Su miktarının yüksek olduğu bazı durumlarda ise reaksiyon hızı artarken ürün veriminde düşüş gözlenmektedir [50,51].

2.7.2.3 Sürenin etkisi

Enzimatik yöntemle yapılandırılmış yağ üretiminde üretim maliyetlerini düşürme açısından reaksiyonların en kısa sürede en verimli şekilde gerçekleşebilmeleri son derece önemlidir. Genelde uzun reaksiyon sürelerinin, açıl göçünün arttırmasından dolayı daha etkili oldukları bilinmektedir. Enzimatik reaksiyonlarda triaçilgliserollere yağ asitlerinin katılımı belli bir süreden sonra sabitlenmektedir. Kullanılan enzimlere ve substratlara göre hem yağlara hem katılan yağ asidi yüzdeleri hem de reaksiyonların gerçekleşme süreleri değişim göstermektedir [50].

2.7.2.4 Sıcaklığın etkisi

Sıcaklık, biyokatalizin gerçekleşmesi için reaktanların çözünmesine yardım eder. Enzimlerin çalışabilecekleri en ideal sıcaklık, optimum sıcaklık olarak ifade edilir ve her enzimin optimum sıcaklık değeri farklıdır. İmmobilize lipazların çoğunluğu için optimum sıcaklık 30–62°C arasındadır. Genel olarak sıcaklık artışı reaksiyon hızının artmasına neden olur. Sıcaklık arttıkça hem enzim aktivitesi artış gösterir hem de açıl

göçü hızlanır. Fakat çok yüksek sıcaklıklarda enzimler bozunurlar, düşük sıcaklıklarda ise enzimlerin etkinlikleri azalır. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda yağ asitlerinin ısıl bozunmaya uğramaları da reaksiyon hızını azalmaktadır. Bu nedenle reaksiyonlarda optimum çalışma sıcaklığının seçilmesi, enzimin etkinliğini en iyi şekilde gösterebilmesi ve maksimum verimin elde edilmesi açısından son derece önemlidir [50].

2.7.2.5 Substrat mol oranının etkisi

Yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan orijinal yağın ve yağ asitlerinin aralarındaki mol oranları yeni oluşturulan TAG'ın verimini etkilemektedir. Seçilen substrat mol oranı enzimin inhibisyonuna neden olmayacak bir aralıkta seçilmelidir. Belli bir değere kadar substrat mol oranının artırılması istenen yağ asidinin TAG yapısına katılım miktarını artırırken aşırı substrat kullanmak inhibisyona neden olabilir. Reaksiyonlardaki substrat mol oranı genellikle prosesin maliyeti ve serbest yağ asitlerinin veya diğer açıl kaynaklarının uzaklaştırılmalarındaki güçlükler göz önünde bulundurularak seçilmelidir [48,50].

2.7.2.6 Çözücü sisteminin etkisi

Enzimlerin aktivitesini belirlemede çözücü çeşidi önemli bir faktördür. Seçilen çözücü enzim aktivitesini ve reaksiyonun denge konumunu etkilemektedir. Reaktanların çözünürlüklerinin farklı olmasından dolayı organik çözücülerde gerçekleşen reaksiyonlarda denge konumunun sağlanabilmesi su fazındaki çözücülere göre farklılık göstermektedir. Aynı zamanda çözücü çeşidi enzimin inhibisyonuna ya da inaktivasyonuna neden olabilmektedir. Çözücü seçimi yapılırken reaktanların çözünürlük derecelerine ve çözücünün reaksiyona etkisi olup olmadığına dikkat edilmesi gerekmektedir [50].

Enzimatik interesterifikasyon reaksiyonlarında çözücü kullanılması ile enzimlerin homojen dağılmaları sağlanmakta, ortamdaki su enzimin çevresinde tutulmakta ve reaksiyon ortamının viskozitesi azalmaktadır. Ancak çözücünün yanıcı ve patlayıcı olmamasına ve reaksiyon bitiminde üründen kolay ayrılabilmesine dikkat edilmelidir [52].

2.7.3 Kimyasal ve enzimatik yöntem ile yapılandırılmış yağ üretiminin kıyaslanması

Son zamanlardaki araştırmalar kimyasal interesterifikasyon uygulamalarının yerini, doğasından gelen birçok avantajdan dolayı, enzimatik interesterifikasyonla değiştirmeye yönelmiştir. Enzimatik interesterifikasyon daha spesifiktir, daha az katı reaksiyon koşulu gerektirir ve sonucunda daha az atık açığa çıkar. Enzimatik reaksiyonların diğer reaksiyonlara göre en önemli avantajı reaksiyonun daha ılımlı koşullar altında yürütülebilmesidir. Enzimatik reaksiyonlar kimyasal reaksiyonlara oranla daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşirler. Böylece enzimatik yöntem ile substratın bozunma olasılığı azalır ve enerji tasarrufu sağlanır [39,45,53,54].

Enzimatik interestrifikasyonda enzimlerin seçicilik özellikleri sayesinde istenen bir açıl grubunu TAG'ın spesifik bir pozisyonuna yerleştirmek mümkündür. Enzimlerin seçicilik özellikleri sayesinde yağ asitlerinin TAG yapısındaki dağılımları kontrol edilebilir. Oysaki kimyasal interesterifikasyon doğasındaki gelişigüzel reaksiyon verme özelliğinden dolayı buna sahip değildir. Kimyasal katalizörler seçicilik özelliğine sahip olmadıklarından, TAG karışımlarında yağ asitlerini rastgele dağıtırlar. Bunun yanında kimyasal reaksiyonlarda istenen özelliklere sahip ürün haricinde, istenmeyen pek çok yan ürün oluşumu da gerçekleşmektedir. Enzimatik reaksiyonla oluşan ürünler ise kolay saflaştırılabilir ve reaksiyon sonunda daha az atık oluşur. Enzimatik yöntemde istenmeyen yan reaksiyonlar daha az sayıda oluşur, proses kolay bir şekilde kontrol edilebilir [39, 51].

Enzimatik yöntem ile yapılandırılmış yağ üretiminin birçok avantajı olmasına rağmen pratikte ticari olarak uygulanması yaygın değildir. Bu durumun başlıca nedeni enzimlerin ekonomik olmayan fiyatlarıdır. Ancak son zamanlarda yaygınlaşan immobilize tekniklerle lipazların immobilize edilerek kullanılmaları prosesleri daha ekonomik hale getirirken, endüstriyel olarak da uygulanmalarına olanak sağlamaktadır. İmmobilizasyon enzimlerin pH ve sıcaklığa karşı kararlılığını arttırırken, lipazın geri kazanımını kolaylaştırarak tekrar kullanılmasını sağlar. Böylece toplam maliyeti azaltarak enzimatik prosesi kimyasalla rekabet edecek dereceye getirir [51].

2.8 Yapılandırılmış Yağların Kullanım Alanları

Yapılandırılmış yağlar, insan sağlığına olumlu etkileri ve besinlerin kullanım fonksiyonlarına olan katkıları dolayısıyla birçok kullanım alanı bulmaktadır. Yapılandırılmış yağların kullanım alanları arasında margarinler, tereyağları, kızartma yağları, düşük kalorili yağlar bulunmaktadır. Bu yağ çeşitlerinin birçok özelliği insan sağlığını olumlu ya da olumsuz yönde etkilemektedir. Doymuş yağ asidi içeriği yüksek olan margarinlerin tüketimi kalp ve damar hastalıklarına neden olabilmektedir. Yapılandırılmış yağların sentezi ile doymamış yağ asidi içeriği yüksek margarinler üretebilmek ve olası hastalıkları önleyebilmek mümkündür. Bunun yanında tereyağı ve margarinin erime özellikleri de tüketici tarafından oldukça önemlidir. Yüksek oranda doymuş yağ asidi içeren yağlar oda sıcaklığında katı, yüksek oranda doymamış yağ asidi içeren yağlar ise oda sıcaklığında sıvı olmaya eğilimlidirler. Tereyağı ve margarinin erime özelliklerini istenen şekilde olumlu yönde değiştirmek için yapılandırılmış yağ üretimi gerçekleştirilir [39].

Yapılandırılmış yağların en çok ilgi çeken uygulama alanlarından biri de, bir TAG molekülüne kısa zincirli yağ asitleri (KZYA), orta zincirli yağ asitleri (OZYA) ve uzun zincirli yağ asitleri (UZYA) katılımı ile elde edilen düşük kalorili yağ sentezidir. Yapıya bağlanan kısa zincirli yağ asitlerinin uzun zincirli yağ asitlerine oranla daha az kalori vermeleri, düşük kalori değerine sahip yağların üretilmesini sağlamaktadır [39,47].

Kakao yağı ikameleri, şekerlemeler, yumuşak şekerler, bebek mamaları, cipsler, unlu mamuller, soslar, çerez gıdalar ve günlük süt ürünleri yapılandırılmış yağların diğer kullanım alanları arasındadır. Kalorisi düşürülmüş yapılandırılmış yağlar unlu gıdalarda, süt ürünlerinde, soslarda ve kakao ikame yağlarında kullanılır. Kakao yağının yüksek olan fiyatı üreticileri kakao benzeri yağları üretmeye yöneltmiştir. Kakao eşdeğeri yağlar kimyasal ya da enzimatik interesterleşme reaksiyonları ile üretilir. Bu amaçla, palm yağı veya ayçiçeği yağı ile stearik asit arasında interesterifikasyon reaksiyonu gerçekleştirilebilir [39,47,53].

Anne sütünün yanında mama ile beslenen bebekler için mamadaki yağın bileşiminin anne sütü ile aynı veya yakın yağ asidi bileşimi ve dağılımına sahip olması gerekmektedir. Bu amaçla anne sütü TAG'larına benzer yapıda yapılandırılmış

triaçilgliserol üretimi, sn-1 ve sn-3 spesifik lipaz kullanılarak, palm yağından elde edilen tripalmitin ile oleik asidin asidolizi ile gerçekleştirilir [54,55,56].

Yapılandırılmış yağlar tıbbi uygulamalarda da son derece önemlidir. Enteral ve parenteral beslenme tıp alanında hastaya uygulanan beslenme çeşitleridir. Enteral beslenme bir hortum aracılığı ile hastaya mide-bağırsak sisteminden besinin iletilmesidir. Parenteral beslenme ise besinin hastaya damardan verilmesidir. Orta zincirli triaçilgliserol (OZT) ve uzun zincirli triaçilgliserollerden (UZT) oluşan fiziksel karışımlarının enteral ve parenteral beslenmede faydalı oldukları bilinmektedir. Bünyesinde UZYA ve OZYA bulunduran yapılandırılmış yağlar, OZYA'ların daha yavaş ve kontrollü bir şekilde kan dolaşımına katılmasını kolaylaştırmak amacı ile tasarlanmışlardır. OZYA içeren yapılandırılmış TAG'lar uzun zincirli TAG'lara kıyasla daha küçük molekül büyüklüğüne sahiptirler ve sudaki çözünürlükleri daha iyidir. Bu yüzden OZYA içeren yapılandırılmış lipidler, çok çabuk hidroliz olurlar ve absorpsiyonları daha yüksektir [54,57].

Sağlık değeri yüksek yapılandırılmış yağ üretimi gıda ve sağlık açısından olumlu etkileri bilinen bazı yağ asitlerinin TAG moleküllerine katılması ile gerçekleştirilir. Bu amaçla yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan yağ asitlerine örnek olarak *n*-3 ve *n*-6 yağ asitleri gösterilebilir. Yapılarında *n*-3 ve *n*-6 yağ asitleri bulunduran yapılandırılmış yağlar, trombozun engellenmesinde, kalp hastalıklarında, bağışıklık sistemini güçlendirmede, alerjik vakalarda, diyabet ve kireçlenme ile mücadelede ve kanser riskini azaltmada kullanılabilir [39].

2.9 Literatürde KLNA İle Yapılandırılmış Yağ Üretimi Üzerine Yapılan

Çalışmalar

Literatürde enzimatik modifiye yağ üretimi ile ilgili çok sayıda çalışmalar bulunsa da KLNA ile yapılandırılmış yağ üretimi üzerine yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bitkisel yağlara KLNA katılımı ile ilgili çalışmalara İ.T.Ü Kimya Mühendisliği bölümünde bitirme ödevleri kapsamında başlanılmış, daha sonra yüksek lisans tez konuları kapsamında daha ayrıntılı çalışmalar yürütülmüştür.

İlk olarak Öztürk ve Ergün tarafından 2007'de gerçekleştirilen bir bitirme ödevinde zeytinyağına (ZY) nar çekirdeği yağından elde edilen nar yağı yağ asitlerinin (NYYA) katılımı incelenmiştir. Çalışmada *Thermomyces lanuginosa* lipaz enzimi

kullanılmıştır. Asidoliz reaksiyonları 1:1, 1:3, 1:5, ZY:NYYA mol oranlarında, 50 °C’de, toplam substrat miktarının %12’si kadar enzim oranında, 2, 4, 6 saatlik reaksiyon sürelerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada mol oranının ve reaksiyon süresinin etkileri incelenmiştir. Sonuçta optimum mol oranı 1:5 ZY:NYYA ve optimum reaksiyon süresi 4 saat olarak belirlenmiş, bu koşullarda %45 KLNA katılımına ulaşılmıştır [58].

Özdoğan ve arkadaşları 2008 yılında soya yağından (SY) KLNA ile modifiye lipid üretimi konusunda hazırladıkları bitirme ödevinde KLNA kaynağı olarak nar yağı yağ asitlerini (NYYA) kullanmışlardır. Reaksiyonlar 50 °C sıcaklıkta, 1:3,1:4,1:5 SY:NYYA mol oranlarında ve 1, 3, 5 saatlik sürelerinde yürütülmüştür. Substrat ağırlığının %10’unu kadar *Thermomyces lanuginosa* lipaz enzimi kullanılmıştır. Daha sonra enzim miktarının etkisini incelemek üzere, asidoliz reaksiyonları 1:5 SY:NYYA mol oranı sabit alınarak 3 saatlik reaksiyon süresinde ve %10,%15 ve %20 enzim oranlarında yürütülmüştür. Çalışmada en fazla KLNA katılımı ağırlıkça %20 enzim miktarında, 50 °C sıcaklıkta ve 1:5 SY:NYYA mol oranında %45 olarak elde edilmiştir [59].

Gezen tarafından yapılan bir çalışmada mısır yağının (MY), nar yağı yağ asitleri (NYA) ile asidoliz reaksiyonu sonucunda yapılandırılmış yağların elde edilmesi amaçlanmıştır. MY ve NYYA arasında üç seri asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Birinci deney serisinde, MY/ NYYA mol oranı 1:3, ikinci deney serisinde 1:4, üçüncü deney serisinde de 1:5 alınmıştır. Enzim miktarı, tüm reaksiyonlarda substrat miktarının ağırlıkça % 10’u olacak şekilde sabit alınıp, sıcaklık 50°C’de sabit tutularak MY/ NYYA mol oranı ve reaksiyon süreleri değiştirilmiştir. Bu sayede, asidoliz ürünü olan triaçilgliserollere (TAG) konjuge linolenik asit (KLNA) katılımının, mol oranı ve reaksiyon süresine göre değişimi incelenmiştir. Yürütülen bu çalışmada en uygun reaksiyon süresi 3 saat olarak belirlenmiş, bu reaksiyon süresinde en yüksek KLNA katılımı 1:5 MY/NYYA mol oranında % 37.7 olarak elde edilmiştir [60].

Başka bir çalışmada ise bir önceki çalışmaya benzer şekilde Haytışev kanola yağından (KY) KLNA ile yapılandırılmış yağ üretimini amaçlamış, KLNA kaynağı olarak yine nar yağı yağ asitlerini (NYYA) kullanmıştır. Bu çalışmada da en uygun reaksiyon süresi 3 saat olarak belirlenmiştir. Bu reaksiyon süresinde en yüksek toplam KLNA

katılım oranı 1:4 KY/NYYA mol oranında % 30.6 olarak elde edilmiştir. Daha yüksek KY/KLNA mol oranı kullanımının KLNA katılım oranını arttırmadığı görülmüştür [61].

Elden, 2009 yılında yürüttüğü yüksek lisans tezinde mahlep yağ asitleri (MYA) ile soya yağından (SY) yapılandırılmış yağ üretimi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu üzerine bir çalışma yürütmüştür. Yapılan ön denemeler 50 °C sıcaklık, SY:MYA mol oranları 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, reaksiyon süreleri 1,3,5 saat ve enzim miktarı substratın ağırlıkça %10'nu olacak şekilde yürütülmüştür. Sonuç olarak 1:5 mol oranından daha fazla olan substrat mol oranının ve 3 saatten fazla olan reaksiyon süresinin KLNA katılımına çok fazla bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Böylece 1:5 mol oranı ve 3 saat reaksiyon süresi sabit tutularak KLNA katılımına enzimin etkisini araştırmak üzere, ağırlıkça % 7, % 10, % 13, % 16 ve % 19 enzim miktarlarıyla tekrar ön denemeler yapılmıştır. Bu ön denemelere göre de enzim miktarındaki artışın KLNA katılımına pratikte etkisi olmadığı görülmüştür. Son olarak sıcaklığın etkisini incelemek üzere 1:5 mol oranı, %10 enzim miktarı ve 3 saat reaksiyon süresinde 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C'de asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda sıcaklıktaki artışın, KLNA miktarının artışına enzim miktarındaki artışa göre daha etkili olduğu gözlenmiştir. Tüm ön denemelerden elde edilen sonuçlarla reaksiyon koşullarının optimizasyonu Tepki Yüzey Metodolijisine (TYM) göre yürütülmüş, sonuçta optimum koşullar 1:6,4 SY:MYA mol oranı ve 36,8 °C sıcaklık olarak belirlenmiştir [62].

Başka bir çalışmada 2009 yılında Elibal, Lipozyme TL IM lipazı katalizörlüğünde kanola yağı (KY) ve kudret narı yağ asitleri (KNYA) arasında gerçekleştirilen asidoliz reaksiyonu sonucu konjuge linolenik asitçe zenginleştirilmiş yapılandırılmış yağlar elde etmiştir. Reaksiyon parametrelerinin belirlenmesi ve optimum koşulların saptanması amacıyla TYM yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla 2 faktörlü ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp deney tasarımı uygun olarak 11 asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. KNYA:KY oranı 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1 olarak seçilmiş ve en uygun mol oranı aranmıştır. Reaksiyona sıcaklığın etkisini araştırma amacıyla 6 farklı sıcaklık değerinde (35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C) çalışılmıştır. 1,3 ve 5 saatlik deneyler yürütülerek sürenin katılım üzerindeki etkisi incelenmiştir. Enzim miktarı ise substrat ağırlığının %7, %10, %13, %16, %19'u olacak şekilde

seçilmiştir. Sonuçta en yüksek katılımın %10 enzim miktarında olduğu gözlenmiştir. Yapılan diğer ön denemelerin sonuçlarından yararlanılarak reaksiyon koşullarının optimizasyonuna geçilmiş, TYM kullanılarak belirlenen optimum koşullar 6,8:1 KNYA: KY mol oranı ve 54,2 °C, sıcaklık olarak bulunmuştur [63].

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

2.10 Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM)

Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM), optimum proses koşullarını, özel deney tasarımları ile birleştirerek birinci ve ikinci dereceden polinom denklemleri ile birlikte bir ardışık deney prosedürü içerisinde kararlaştıran bir optimizasyon tekniğidir. Prosesler bağımlı ve bağımsız değişkenlerden oluşmaktadır. TYM bağımsız değişkenleri parametre veya faktör, bağımlı değişkenleri ise tepki veya çıktı olarak değerlendirmektedir. Bağımlı değişkenin çok sayıda bağımsız değişkenden etkilendiği proseslerin analizinde, modellenmesinde ve tepkinin optimizasyonunda uygulanan bir seri deney prosedürüdür. Kısacası, TYM tepkinin en iyi değerini (optimum değerini) bulmak için oluşturulmuş teknikler bütünüdür. TYM ile bir seferde, seçilen bağımsız değişkenlerin tepki üzerindeki etkileri görülebilmekte ve özel deney tasarımları kullanılarak optimizasyon için gerekli deney sayısı azaltılabilmektedir [64-66].

Prosesten en verimli sonucun alınabildiği tepki değerini bulabilmek amacı ile oluşturulmuş bir teknikler bütünü olan TYM ile ilgili ilk çalışmalar 1951 yılında Box ve Wilson tarafından yürütülmüştür. Daha sonra, 1957 yılında Box ve Hunter'in,

1958 yılında Bradley'in, 1960 yılında Davies'in, 1987 yılında Khuri ve Cornell'in ve 1995 yılında Myers ve Montgomery'in TYM üzerindeki çalışmaları kullanılan teknikleri geliştirmiştir. Bu tekniklerin tümünde deneylerin tasarımı ve elde edilen deneysel sonuçların analizi yer almaktadır [67,68].

Proseslere TYM uygulanırken tepki üzerine etki eden çok sayıda değişkenden ilk olarak, ölçülmek istenen tepkiye en fazla etki ettiği düşünülen değişkenlerin seçilmesi en doğru sonucun alınması açısından önemlidir. Değişkenlerin seçiminden sonra ön denemeler ve literatür araştırması ile bu değişkenlerin ölçülebilecekleri değer aralıkları belirlenir. Daha sonra proses için en uygun model denkleminin seçilmesi gerekir. Model denklem, ölçülen tepkiyi proses değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak ifade eder. TYM'de kullanılan model denklemler birinci veya ikinci dereceden olabilir. TYM ile yapılan çalışmalarda daha çok ikinci dereceden model denklemler tercih edilmektedir [65,69,70].

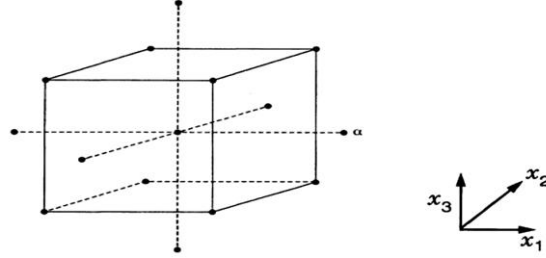
Model denklem belirlendikten sonra uygun deney tasarımı seçilir. En çok kullanılan deneysel tasarımlara Merkezi Bileşik veya Box Behnken Deney Tasarımları örnek olarak gösterilebilir. Bu tasarımlar ikinci dereceden terimler içeren modellerdir, yani bağımsız değişkenler ile çıktı değeri arasında doğrusal yaklaşımın ötesinde bir bağlantı ifade etmektedirler. Bu modeller ile elde edilen sonuçlar tepki yüzey ve izdüşümü (contour) grafikleri ile gösterilerek yorumlanabilir. Tüm bu tasarımlar ile optimizasyon için gerçekleştirilmesi gereken deneylerin koşulları ve deney sayıları belirlenmiş olur [65].

Tepki yüzey ve izdüşüm grafiklerinde iki bağımsız değişkenin çeşitli seviyelerinde elde edilen tepki değerleri y ekseninde gösterilmektedir. Bu şekilde optimizasyon için önemli bir veri olan iki faktörün çıktı üzerindeki etkileri bir cevap yüzeyi şeklinde gösterilmiş olur [65,70].

2.10.1 Merkezi bileşik deney tasarımları

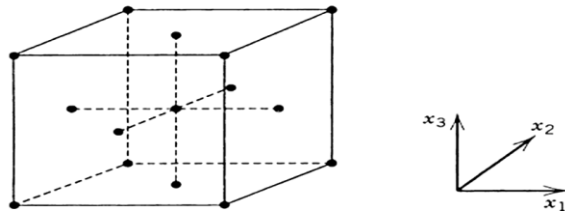
Merkezi bileşik deney tasarımları (MBDT) uygulanırken çeşitli deneysel noktalar kullanılmaktadır. Bu deneysel noktalar, küp noktalar (cube points), yıldız noktalar (star points) ve merkez noktalar (center points) olmak üzere üç çeşitten oluşmaktadır. Küp noktaları için kodlanan bağımsız değişken değerleri ± 1 'dir. MBDT'da ikinci nokta grubunu oluşturan yıldız noktalarının $(\pm\alpha, 0, 0, \dots, 0)$, $(0, \pm\alpha, 0, \dots, 0)$, $(0, 0, \dots, 0, \pm\alpha)$ ve merkez noktalarının $(0, 0, \dots, 0)$ olarak kodlanmaktadır.

$\pm\alpha$) olmak üzere değişik koordinatları bulunmaktadır. Diğer nokta grubunu ise koordinatları her zaman (0, ...0) olan ve tasarım merkezinde yerleşen merkez noktalar oluşturmaktadır [65,68,71]. MBD’da üç faktörlü bir sistem için deney noktaları Şekil 2.10’da görülmektedir. Faktörler x_1 , x_2 ve x_3 şeklinde ifade edilmektedir.



Şekil 2.10 : Merkezi bileşik deney tasarımında üç değişkenli bir sistem için deney noktaları örneği [65].

Merkezi bileşik deney tasarımları içinde sınırlandırılmış, dışından çemberlenmiş ve yüzey merkezli olmak üzere kendi içlerinde farklı türlere ayrılırlar. Bu tasarım türlerinin birbirlerinden ayrılmasında deneyler için kullanılan faktörlerin seviye değerleri etkili olmaktadır. Üç faktörlü bir tasarımda eksensel noktalar küpün yan yüzeylerinin merkezlerinde ise bu tasarım yüzey merkezli tasarım olarak adlandırılır [71,72].Şekil 2.11’de üç değişkenli bir sistem için Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarım (YMMBDT) noktaları görülmektedir. Faktörler x_1 , x_2 ve x_3 şeklinde ifade edilmektedir.



Şekil 2.11 : Yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarımında üç değişkenli bir sistem için deney noktaları örneği [65].

YMMBDT’da en az iki merkez noktanın olması gerekmektedir. Yüzey merkezli küp deney tasarımında (Face Centered Design) $\alpha=1$ ’dir. Tasarım merkezi ise (0, 0, 0) koordinatlarına sahip merkez noktadır. Bu deney tasarımında, yıldız noktaları küpün yüzlerinin tam ortasında bulunmaktadır. YMMBDT bağımsız değişkenlerin alt ve üst seviye değerlerinin kesin olarak belirlendiği sistemlerde en doğru sonuçları

vermektedir [69,71,72]. Çizelge 2.5'te üç faktörlü sistem için YMMBDT görülmektedir.

Çizelge 2.5 : Üç faktörlü sistem için yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarımı [65].

Deney No	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1	0	0
10	1	0	0
11	0	-1	0
12	0	1	0
13	0	0	-1
14	0	0	1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

2.10.2 Varyans analizi (ANOVA)

Varyans analizi özellikle birçok değişkenin bulunduğu çok seviyeli modellerde kullanılan bir analizdir. Varyans analizi deneysel sonuçların tamamının toplu olarak yorumlanmasını sağlar. Kısaca ANOVA (Analysis of variance) olarak da bilinen varyans analizi, istatistiksel tekniklerin genel toplamıdır. ANOVA nicel ölçümleri kapsayan deneysel verilerin analizi ve elde edilen model hakkında karar verebilmek için geliştirilmiş bir tekniktir [65,69,72].

Varyans analizinde kurulan modele ait keyfi bir anlamlılık düzeyi seçilmektedir ve anlamlılık düzeylerine göre hazırlanmış F tablolarında serbestlik derecelerinin

kesişim noktasında bulunan F oranı değerleri ile kıyaslanmaktadır. F oranı, ANOVA tablosunda model varyansının hata varyansına oranını ifade etmektedir. Modelin geçerliliği $F_{hesaplanan}$ ve F_{tablo} değerleri kıyaslanarak anlaşılmaktadır. Modelin geçerli olabilmesi için $F_{hesaplanan} > F_{tablo}$ olması gerekmektedir [69,72].

2.10.3 Regresyon analizi

Regresyon analizinde bağımlı ve bağımsız değişkenler arasında en uygun bağlantı tespit edilmektedir. Bunu gerçekleştirmek için en uygun deneysel tasarım seçilmektedir. Yapılan deneylerle elde edilen veriler, regresyon analizi sonucunda matematiksel bir formül şeklinde ifade edilmektedir [65,69].

2.10.4 Kalanların toplamı

Deneysel gözlenen tepki değerleri ile deneysel tasarımdan elde edilen tepki değerlerinin birbirine yakınlıkları, oluşturulan modelin doğruluğunu göstermektedir. Deneysel gözlenen çıktı değerleri y , deneysel tasarımdan elde edilen çıktı değerleri ise $\hat{y}$ şeklinde gösterilmektedir. Kalanların toplamı, bu değerlerin arasındaki farkların toplamını oluşturmakta ve seçilen modelin doğru bir model olduğunun göstergesi olarak bu toplamın sıfır ya da sıfıra yakın bir değer olması gerekmektedir [65,69,70]. Matematiksel ifadesi aşağıdaki gibidir:

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

2.10.5 Korelasyon katsayısı

Tasarımda kullanılan değişkenler arasında etkileşimin olup olmadığı, varsa etkileşimin kuvvetli ya da zayıf korelasyon katsayısı ile belirlenebilmektedir. Korelasyon katsayısı (R), tasarımdan elde edilen değerler ($\hat{y}$) ile deneysel değerlerin (y), deneysel sonuçların ortalama değerinden ($\bar{y}$) uzaklaşma derecesini vermekte ve aşağıdaki ifadeden bulunmaktadır [69,70].

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

R^2 değeri -1 ile +1 arasında değişim göstermektedir. R^2 'nin -1 olması değişkenler arasında negatif tam doğrusal ilişkinin varlığını ortaya koymakta, R^2 'nin +1 olması durumunda ise değişkenler arasında pozitif tam doğrusal ilişki söz konusu olmaktadır [65].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Hammaddeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan Kristal marka Riviera türü zeytinyağı piyasadan temin edilmiştir. KLNA içeren nar yağı yağ asitleri Akdeniz bölgesinde bulunan bir meyve suyu fabrikasından küspe şeklinde alınan nar çekirdeklerinden elde edilmiştir. Asidoliz reaksiyonlarında Lipozyme TL IM ticari lipaz enzimi kullanılmıştır. *Thermomyces lanuginosa* orijinli ve 1,3 pozisyon seçiciliği olan enzim, Novo-Nordisk A/S (Copenhagen, Danimarka) firması tarafından hediye edilmiştir. Reaksiyon ürünlerinin analizlerinde, yağ asitlerinin bileşimlerinin saptanması ve tanımlanmasında kullanılan tüm çözücüler ve kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiş analitik saflıkta ürünlerdir.

3.2 Çalışma Yöntemi

3.2.1 Nar yağının ekstraksiyonu

Küspe halinde temin edilen nar çekirdekleri oda sıcaklığında 3 gün süreyle kurutulup elekten geçirildikten sonra içlerindeki kabuk ve yabancı cisimlerden temizlenmiştir. Nar yağı, nar çekirdeklerinden soxhlet ekstraksiyonu yolu ile elde edilmiştir. Bu amaçla 35 gr nar çekirdeği kahve değirmeninde öğütülerek hazır soxhlet kartuşlarına doldurulmuş ve soxhlet ünitesine yerleştirilmiştir. Çözücü olarak hekzan kullanılmıştır. Ekstraksiyon, 4 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonucu elde edilen yağ-hekzan karışımı Na_2SO_4 ilave edilerek kurutulduktan sonra karışım adi süzgeç kağıdından süzülerek çözücüsü döner buharlaştırıcılı evaporatörde uçurulmuştur. Elde edilen nar yağı ortam sıcaklığında ve karanlıkta saklanmıştır.

3.2.2 Nar yağından serbest yağ asitlerinin hazırlanması

Nar yağındaki yağ asitlerinin ve sabunlaşmayan maddelerin ayrıştırılması için sabunlaşma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 250 mL'lik cam balona 9 g nar yağı, 90 mL 1N etanollü KOH çözeltisi ve kaynamanın homojen olması için bir

miktar kaynama taşı konup balon su banyosuna yerleştirilmiştir. Karışım geri soğutucu altında 1 saat sabunlaşma reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda balon su banyosundan alınmış ve üstüne 90 mL distile su, 90 mL hekzan eklenmiş, karışım 500 mL'lik ayırma hunisine alınıp çalkalanmıştır. Böylece sabunlaşmayan maddeler hekzan fazında (üst faz) kalırken oluşan yağ asitleri potasyum sabunları ise sulu fazda (alt faz) kalmıştır. Ayırma işlemi gerçekleştikten sonra sulu faz bir kez daha 90 mL hekzan ile çalkalanıp üzerine 34 mL 3N HCl eklenerek yağ asitlerinin serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu karışım 2x100 mL hekzan ile çalkalanmış ve yağ asitleri hekzan fazına geçmiştir. Hekzan fazı daha sonra 100 mL distile su ile pH'ı 6-7 arasında olana kadar yıkanmıştır. Yıkanan faza Na₂SO₄ eklenip kurutulduktan sonra darası belli olan bir balona alınıp, döner buharlaştırıcıda hekzanın uçurulması sağlanmıştır. Böylece serbest yağ asitleri elde edilmiştir.

3.2.3 Kullanılan hammadde ve reaksiyon ürünlerinin karakterizasyonu

Deneyisel çalışmada kullanılan nar yağı, zeytinyağı ve reaksiyon ürünlerinin yağ asitleri bileşimi kapiler gaz kromatografisi (GC) ile saptanmıştır. Bileşimi belirlemek amacıyla öncelikle substratların metil esterleri hazırlanmış ve Hewlett-Packard 5890 Seri II (Hewlett-Packard, Waldron, Almanya) gaz kromatografi cihazına beslenmiştir. Kromatogramlarda elde edilen piklerin tanımlanmasında, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3, 20:0 ve 20:1,22:0 yağ asitlerinden ibaret standart yağ asitlerinin metil esterleri karışımı (Sigma-Aldrich) ile standard KLNA metil esterleri karışımı (Arkansas Üniversitesi, Gıda Bilimleri Bölümü, Amerika Birleşik Devletleri)'nin aynı cihaz ve koşullarda yapılan analizlerinden elde edilmiş kromatogramlar kullanılmıştır [73]. Uygulanan kromatografik analiz koşulları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Gaz kromatografisi analiz koşulları.

Dedektör Tipi	FID ⁽¹⁾
Dedektör Sıcaklığı (°C)	280
İnjesiyon Sıcaklığı (°C)	250
Gaz Hızları (mL/dak)	
Azot	1,6
Hidrojen	33
Hava	460
Dağıtma oranı	88:1
Fırın Sıcaklığı	150 °C (5 dak) 150-275 °C (5 °C/dak) 275 °C (10 dak)
Kolon Tipi	HP-INNOWAX 19091N-213 ⁽²⁾

(1) Alev iyonizasyon dedektörü

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

3.2.4 Zeytinyağı ile KLNA'nın asidoliz reaksiyonunda uygulanan yöntem

Asidoliz reaksiyonları 30 mL'lik koyu kahverengi, kapaklı ve ısıya dayanıklı cam reaksiyon şişelerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şişesine yaklaşık 1 gram substrat karışımı konulmuştur. Bu karışım belirli reaktan mol oranlarında zeytinyağı ve NYYA'lerden oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Karışıma 10 mL hekzan eklenmiş ve üzerine toplam substrat miktarının ağırlıkça belli orandaki yüzdesi kadar Lipozyme TL IM enzimi ilave edilmiştir. Böylece reaksiyonun gerçekleşeceği karışım hazırlanmış ve bu karışım sıcaklığın belirlenen değerlerde sabit tutulduğu orbital çalkalayıcıya (Edmund Bühler, KS-15, Almanya) yerleştirilmiştir. Reaksiyon sırasında reaksiyon karışımı 200 rpm sabit hızla karıştırılmıştır. Karışımdan belirli

zaman aralıklarında 8'er mL'lik numuneler alınmıştır. Bu numunelerin analizleri yapılarak asidoliz reaksiyonun ilerleyişi incelenmiş ve değerlendirmeler yapılmıştır.

3.2.5 Asidoliz ürünlerinin analizi

Reaksiyon karışımından alınmış numunelere önce reaksiyonu durdurmak amacı ile 10 mL etanol ilave edilmiştir. Asidoliz reaksiyonun ana ürünü, zeytinyağı triaçilgliserollerinden türemiş yeni bir yağ asidi profiline sahip triaçilgliseroller (TAG'lar) dır. Bu TAG'lar ortamda reaksiyona girmemiş KLNA ve zeytinyağından açığa çıkmış yağ asitleri ile birlikte bulunurlar. Yeni oluşmuş yapılandırılmış TAG'ların en doğru şekilde analizlerinin yapılabilmesi için, ortamdaki serbest yağ asitlerinin nötralize edilerek uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla 10 mL etanol ilave edilmiş numunelere 10 mL hekzan eklenmiştir. Bu karışım fenolftalein indikatörlüğünde 0,02 M NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Böylece numune içerisindeki serbest yağ asitlerinden sodyum sabunları elde edilmiştir. Titrasyon işlemi tamamlanan numuneler, ekstraksiyon işlemini gerçekleştirebilmek amacı ile 500 mL'lik ayırma hunisine alınmıştır. Ayırma hunisindeki numune üzerine 50 mL destile su ve 50 mL hekzan ilave edilmiş ve iyice çalkalanmıştır. TAG'lar hekzan fazında çözünürken, su fazına ise yağ asitlerinin sodyum sabunları geçmiştir. Bu iki fazın birbirinden en iyi şekilde ayrılabilmesi için bir süre beklenilmiştir. Hekzan fazı tamamen nötr olana kadar su ile birkaç kez yıkanmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra ayırma hunisinden alınan yapılandırılmış TAG içeren hekzan fazı döner buharlaştırıcıda çözücüsü tamamen uçurulana kadar evapore edilmiştir. Bu şekilde saf olarak TAG ürünleri elde edilmiştir.

Elde edilmiş olan TAG fraksiyonlarının metil esterleri hazırlanmış ve yağ asidi bileşimleri kapiler gaz kromatografisinde Bölüm 3.2.3'te açıklanan analiz koşullarında belirlenmiştir. Gaz kromatogramlarının değerlendirilmesi sonucunda yapılandırılmış TAG'ların yağ asidi bileşimleri ve zeytinyağına katılan konjuge linolenik asit yüzdesi tespit edilmiştir.

3.2.6 Deneyisel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi

Bu çalışmada, enzimatik asidoliz reaksiyonu ile zeytinyağından KLNA'ca zenginleştirilmiş TAG'ların eldesinde, reaksiyon parametrelerinin (değişkenlerin)

ürün bileşimi üzerine olan etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacı ile deneysel tasarımdan yararlanılmıştır. Bu amaçla Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılmıştır. 3 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak asidoliz deneylerinin tasarımı yapılmıştır. Literatür verilerine göre, yapılandırılmış yağların enzimatik yöntemle üretiminde substrat mol oranı, enzim miktarı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı en önemli değişkenler arasındadır. Optimizasyonun en verimli ve doğru şekilde uygulanabilmesi için değişkenlerin ve değişken etki aralıklarının seçimi son derece önemlidir. Bu seçim yapılırken reaksiyon sistemi dışında, ekonomiklik ve uygulanabilirlik faktörleri de göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmada ön denemelerde substrat mol oranı, reaksiyon sıcaklığı, reaksiyon süresi, ve enzim miktarı değişken olarak seçilmiştir. Zeytinyağı ve nar yağı yağ asitleri belirli oranlarda bir araya getirilerek 1 gramlık substratlar oluşturulmuştur. Yapılan deneylerde zeytinyağı: nar yağ asidi (ZY:NYYA) mol oranı 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 olarak seçilerek ve en uygun substrat mol oranı aranmıştır. Reaksiyonlara sıcaklığın etkisini değerlendirmek için 35°C, 40°C, 50 °C ve 60 °C’de çalışılmıştır. 2, 3, 4 ve 6 saatlik deneyler yürütülerek sürenin ürün üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Enzim miktarı ise substrat ağırlığının %5, %10 ve %15’i olacak şekilde seçilerek en uygun koşul aranmıştır. Belirlenen değişkenler doğrultusunda gerçekleştirilen ön deneyler doğrultusunda optimum reaksiyon koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

3.2.7 Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu

Reaksiyon koşullarının optimizasyonu Tepki Yüzey Metodolojisine (TYM) göre yapılmıştır. Bu amaçla, 3 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak 17 asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Deneysel sonuçların istatistiksel analizleri Statistica 9.0 (Stat Soft® Inc.) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçların varyans analizleri ve tepki değerlerinin incelenen değişkenlere göre değişimlerini gösteren izdüşüm (Contour plot) grafikleri değerlendirilerek reaksiyon koşulları optimize edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada zeytinyağından sağlığa daha yararlı olabilecek, vücut metabolizmasını ve bağışıklık sistemini olumlu yönde etkileyecek, hızlı metabolize edilebilen, uzun zincirli konjuge linolenik asitçe zenginleştirilmiş triaçilgliserollerin, enzimatik yöntem ile üretimi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yürütülen bu çalışmalara ait veriler ve sonuçlar aşağıda açıklanmıştır.

4.1 Nar Çekirdeklerinin Yağ İçeriği

Nar çekirdeklerinin yağ yüzdesi Bölüm 3.2.1’de açıklanan Soxhlet ekstraksiyonu yöntemine göre belirlenmiştir. Çalışma paralel iki numune ile yürütülmüş ve sonuçta nar çekirdeklerinin ortalama olarak % 15,5 oranında yağ içerdiği saptanmıştır. Nar çekirdeklerin yağ içeriği Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : Nar çekirdeklerinin yağ içeriği.

Numune	Çekirdek miktarı (g)	Elde edilen yağ miktarı (g)	% Yağ içeriği
1	35,09	5,3	15,1
2	35,09	5,6	15,9

4.2 Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri

Çalışmada kullanılan zeytinyağı ve nar yağı yağ asitlerinin bileşimi Bölüm 3.2.3’te belirtilen koşullarda kapiler gaz kromatografisi yöntemi ile belirlenmiştir. Çizelge 4.2’de zeytinyağının yağ asidi bileşimi, Çizelge 4,3’de ise nar yağının yağ asidi bileşimi verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Zeytinyağının yağ asitleri bileşimi.

Yağ asidi	Bileşim (%)
16:0	13,45
16:1	0,93
18:0	2,15
18:1	71,73
18:2	11,12
20:0	0,16
22:0	0,45
KLNA	—

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi orijinal zeytinyağında % 71,7 oleik, % 13,45 palmitik,% 11,2 linoleik, % 2,15 stearik asit bulunurken yağın orijinalinde KLNA bulunmamaktadır.

Çizelge 4.3 : Nar yağının yağ asitleri bileşimi.

Yağ asidi	Bileşim (%)
16:0	3,01
18:0	1,99
18:1	5,75
18:2	5,40
18:3 (KLNA)	78,41
Punisik asit	59,48
α -eleostearik asit	9,36
Katalpik asit	6,92
β -eleostearik asit	2,65
Diğer	5,44

Çizelge 4.3’te görüldüğü gibi deneylerde kullanılan nar yağında %3,0 palmitik, % 1,9 stearik, %5,7 oleik, %5,4 linoleik ve %78,4 konjuge linolenik asit bulunmaktadır.

4.3 Tepki Yüzey Metodolojisi'nde Kullanılacak Değişken Seviye Değerlerinin Belirlenmesi

Tepki Yüzey Metodolojisine göre optimizasyonu gerçekleştirebilmek için deneylerin tasarımında seçilen bağımsız değişkenlerin seviye değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla sıcaklık, substrat mol oranı, enzim konsantrasyonu ve reaksiyon süresinin etkisini incelemek için bir takım ön deneyler yapılmıştır.

4.3.1 Asidoliz reaksiyonuna substrat mol oranı ve reaksiyon süresinin etkisi

Başlangıç olarak, substrat mol oranının katılım üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, literatürdeki benzer çalışmalar doğrultusunda belirlenen 50 °C sıcaklık ve substratın ağırlıkça %10'nu kadar enzim miktarı sabit tutularak 1:3, 1:4, 1:5 ve 1:6 ZY:NYYA substrat mol oranlarında 2, 3, 4 ve 6 saatlik asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlardan elde edilen yapılandırılmış TAG'ların yağ asidi bileşimleri Çizelge 4.4 - Çizelge 4.7'de görülmektedir.

Çizelge 4.4 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin ZY:KLNA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (T=50 °C, %10 enzim, 1:3 mol oranı).

Yağ asidi	Yağ asidi bileşimi(%)				
	Orijinal Zeytinyağı	Yapılandırılmış TAG			
		2 saat	3 saat	4 saat	6 saat
16:0	13,5	10,1	9,7	9,1	9,0
16:1	0,9	0,5	0,5	0,4	0,4
18:0	2,2	2,7	2,9	2,7	2,5
18:1	71,7	44,1	41,8	40,2	39,3
18:2	11,1	9,5	9,0	9,2	9,7
18:3 (KLNA)		33,1	36,1	38,4	39,1
Punisik asit		23,1	25,3	27,5	28,7
α -eleostearik asit	—	4,2	4,4	4,6	3,9
Katalpik asit		3,1	3,4	3,6	3,7
β -eleostearik asit		0,7	0,8	0,9	1,1
Diğer		2,0	2,1	1,8	1,7

Çizelge 4.5 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin ZY:KLNA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (T=50 °C, %10 enzim, 1:4 mol oranı).

Yağ asidi	Yağ asidi bileşimi(%)				
	Orijinal Zeytinyağı	Yapılandırılmış TAG			
		2 saat	3 saat	4 saat	6 saat
16:0	13,5	8,8	9,0	8,9	8,8
16:1	0,9	0,5	0,4	0,5	0,4
18:0	2,2	2,5	2,7	3,6	2,3
18:1	71,7	40,1	39,3	39,5	38,2
18:2	11,1	9,2	8,4	8,3	8,4
18:3 (KLNA)	—	38,9	40,2	41,2	41,9
Punisik asit		28,4	28,5	29,7	29,8
α -eleostearik asit		4,9	5,1	5,2	5,4
Katalpik asit		3,8	3,9	3,7	3,9
β -eleostearik asit		0,8	1,2	1,1	1,2
Diğer		1,0	1,5	1,5	1,6

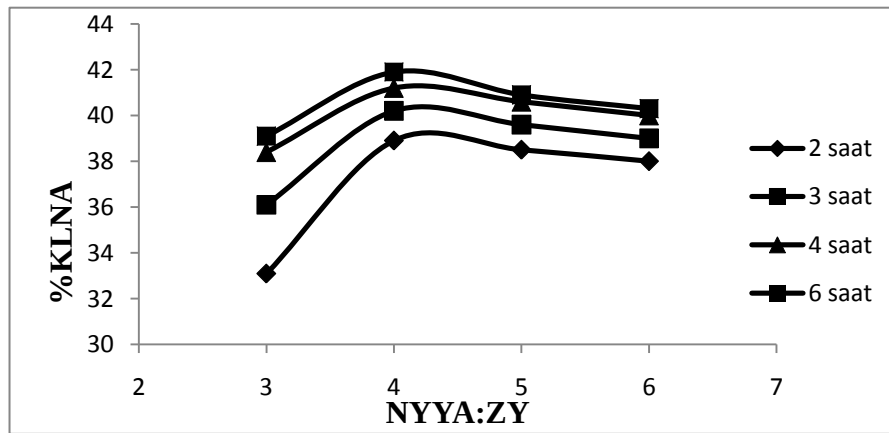
Çizelge 4.6 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin ZY:KLNA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (T=50 °C, %10 enzim, 1:5 mol oranı).

Yağ asidi	Yağ asidi bileşimi(%)				
	Orijinal Zeytinyağı	Yapılandırılmış TAG			
		2 saat	3 saat	4 saat	6 saat
16:0	13,5	9,2	9,2	8,9	8,5
16:1	0,9	0,4	0,5	0,3	0,4
18:0	2,2	2,7	2,5	2,6	2,9
18:1	71,7	40,2	39,9	38,7	38,1
18:2	11,1	9,0	8,3	8,9	9,2
18:3 (KLNA)	—	38,5	39,6	40,6	40,9
Punisik asit		27,5	28,2	29,1	29,8
α -eleostearik asit		4,5	4,4	4,7	4,9
Katalpik asit		3,5	3,6	3,6	4,0
β -eleostearik asit		0,9	1,1	1,3	1,4
Diğer		2,1	2,3	1,9	1,4

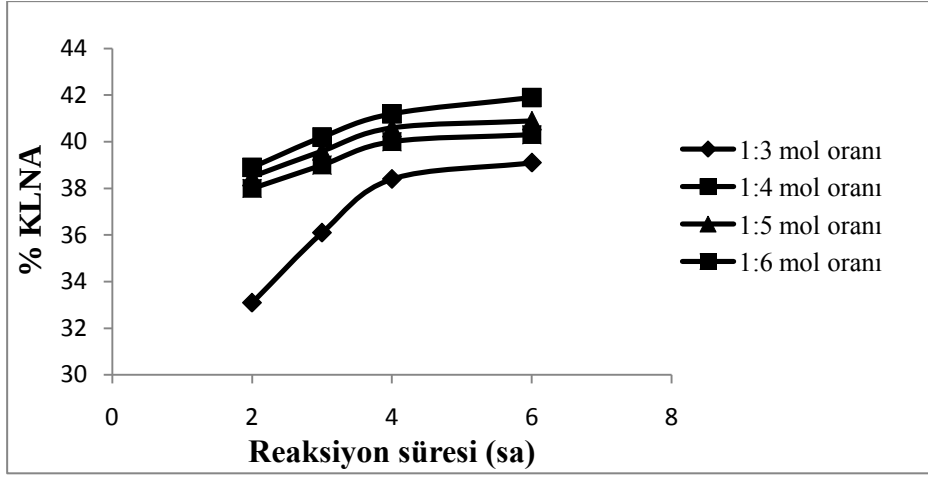
Çizelge 4.7 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin ZY:KLNA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (T=50 °C, %10 enzim, 1:6 mol oranı).

Yağ asidi	Yağ asidi bileşimi(%)				
	Orijinal Zeytinyağı	Yapılandırılmış TAG			
		2 saat	3 saat	4 saat	6 saat
16:0	13,5	8,5	8,3	8,4	8,3
16:1	0,9	0,4	0,3	0,5	0,7
18:0	2,2	2,7	2,3	2,5	2,6
18:1	71,7	40,8	40,8	39,9	39,5
18:2	11,1	9,6	9,3	8,7	8,6
18:3 (KLNA)	—	38,0	39,0	40,0	40,3
Punisiik asit		29,0	29,4	29,8	29,6
α -eleostearik asit		4,6	4,2	4,9	4,7
Katalpik asit		2,5	2,6	3,4	3,5
β -eleostearik asit		0,9	1,1	1,2	1,3
Diğer		1,0	1,7	1,6	1,2

Değişen reaksiyon sürelerinde yapılandırılmış TAG'ların KLNA katılım miktarlarının substrat mol oranı ile değişimi Şekil 4.1'de görülmektedir. En yüksek katılım tüm reaksiyon sürelerinde 1:4 ZY:NYYA mol oranında görülmüştür. Buna göre deneysel tasarımda ilk belirlenen bağımsız değişken substrat mol oranı olurken -1, 0, +1 kodlarına karşılık gelen ZY:NYYA değişken seviye değerleri 1:3, 1:4, 1:5 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1 : Zeytinyağının NYYA ile asidolizinde, KLNA katılımının farklı reaksiyon sürelerinde substrat mol oranı ile değişimi.



Şekil 4.2 : Zeytinyağının NYYA ile asidolizinde, KLNA katılımının farklı substrat mol oranlarında reaksiyon süresi ile değişimi.

Reaksiyon süresinin KLNA katılımı üzerindeki etkisi Şekil 4.2’de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi en yüksek katılım 6 saat sonunda gerçekleşmiş fakat bu katılımların miktarının pratikte 4 saatlik katılımlardan çok farklı olmadığı gözlenmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi optimizasyonun en verimli ve doğru şekilde uygulanabilmesi için değişkenlerin ve değişken etki aralıklarının seçiminde reaksiyon sistemi dışında, ekonomiklik ve uygulanabilirlik faktörleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle optimizasyon deneylerinde reaksiyon süresi değişken olarak alınmamış, 4 saat olarak sabit tutulmuştur.

4.3.2 Asidoliz reaksiyonuna enzim miktarının etkisi

Substrat mol oranının ve reaksiyon süresinin katılım reaksiyonuna etkileri incelendikten sonra bir diğer bağımsız değişken olan enzim miktarı ile ilgili deneylere geçilmiştir. Enzim miktarı substrat ağırlığının %5, %10 ve %15’i olacak şekilde seçilerek 50°C’de, önceki adımda en uygun mol oranı olarak belirlenen 1:4 ZY:NYYA mol oranında farklı reaksiyon sürelerinde bir seri asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Farklı enzim miktarlarında gerçekleştirilen KLNA katılım miktarları Çizelge 4.5, Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9’da verilmiştir.

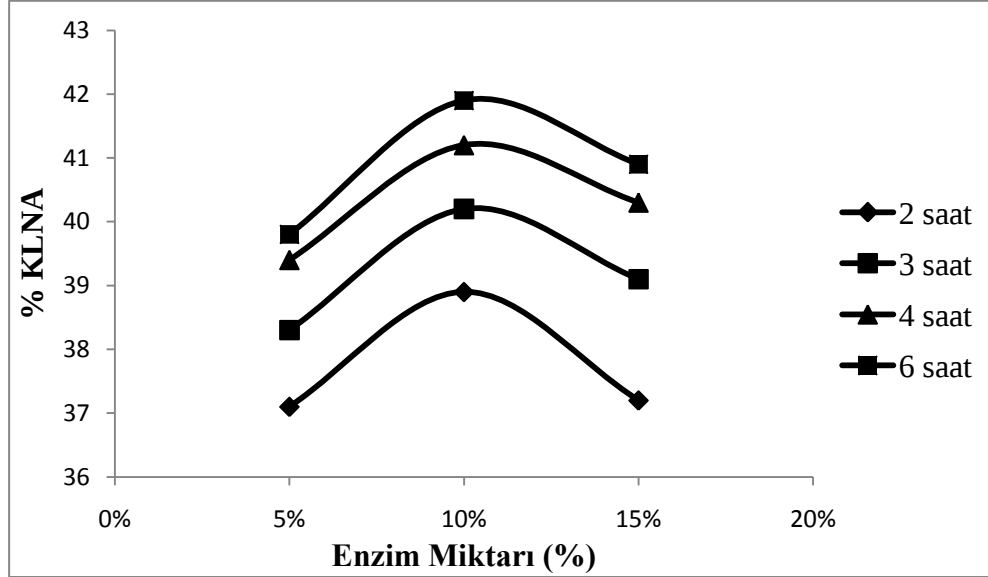
Çizelge 4.8 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin enzim miktarı ile değişimi (ZY:NYYA mol oranı 1:4, sıcaklık 50°C, enzim miktarı % 5).

Yağ asidi	Yağ asidi bileşimi(%)				
	Orijinal Zeytinyağı	Yapılandırılmış TAG			
		2 saat	3 saat	4 saat	6 saat
16:0	13,5	9,0	8,9	8,7	8,5
16:1	0,9	0,5	0,4	0,5	0,6
18:0	2,2	2,5	2,5	2,7	2,6
18:1	71,7	41,0	40,9	40,2	40,1
18:2	11,1	9,9	9,0	8,5	8,4
18:3 (KLNA)		37,1	38,3	39,4	39,8
Punisik asit		27,6	28,4	28,9	28,9
α -eleostearik asit	—	3,9	4,1	4,5	4,6
Katalpik asit		2,6	2,9	3,1	3,2
β -eleostearik asit		0,8	0,9	1,1	1,2
Diğer		2,2	2,0	1,8	1,9

Çizelge 4.9 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin enzim miktarı ile değişimi (ZY:NYYA mol oranı 1:4, sıcaklık 50°C, enzim miktarı %15).

Yağ asidi	Yağ asidi bileşimi(%)				
	Orijinal Zeytinyağı	Yapılandırılmış TAG			
		2 saat	3 saat	4 saat	6 saat
16:0	13,5	9,2	9,1	8,9	8,7
16:1	0,9	0,5	0,4	0,5	0,3
18:0	2,2	2,6	2,5	2,4	2,4
18:1	71,7	41,3	40,8	39,1	39,3
18:2	11,1	9,2	8,1	8,8	8,4
18:3 (KLNA)		37,2	39,1	40,3	40,9
Punisik asit		27,0	28,1	28,8	28,9
α -eleostearik asit	—	4,4	4,5	4,7	4,9
Katalpik asit		3,5	3,6	3,8	3,9
β -eleostearik asit		0,8	0,9	1,1	1,2
Diğer		1,5	2,0	1,9	2,0

Çizelgeler incelendiğinde en yüksek KLNA katılımı %10 enzim miktarında gerçekleşmiştir. Farklı reaksiyon sürelerinde zeytinyağına katılan KLNA miktarının enzim miktarı ile değişimi Şekil 4.3'te görülmektedir.



Şekil 4.3 : Zeytinyağının NYYA ile asidolizinde, KLNA katılımının farklı reaksiyon sürelerinde enzim miktarı ile değişimi.

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi tüm reaksiyon sürelerinde en yüksek KLNA katılımı %10 enzim miktarında gerçekleşmiştir. Enzimatik reaksiyonlarda genelde enzim miktarı arttıkça dönüşümün artması beklenir ancak bu çalışmada enzim miktarı %15'e yükseltildiğinde KLNA katılımında düşme görülmüştür. Bu durum ortamda yeterli substrat kalmadığında KLNA'nın zeytinyağındaki yağ asitleri ile yer değiştirmesinin mümkün olmadığı şeklinde açıklanabilir. Bu nedenle %10'dan fazla enzim miktarlarında enzim etki edecek substrat bulamamakta dolayısıyla dönüşüm azalmaktadır. Sonuçta +1, 0, -1 kodlarına karşılık gelen enzim miktarının değişken seviye değerleri %5, %10 ve %15 olarak belirlemiştir.

4.3.3 Asidoliz reaksiyonuna sıcaklığın etkisi

Optimizasyonu uygulamak amacıyla belirlenen bağımsız değişkenlerden sonuncusu olan sıcaklık parametresinin dönüşüm üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 1:4 ZY:NYYA mol oranında, %10 enzim miktarında farklı reaksiyon sürelerinde 35°C, 50°C ve 60°C sıcaklıklarda reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5, Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.10 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin sıcaklık ile değişimi (ZY:NYYA mol oranı 1:4, enzim miktarı %10, sıcaklık 35°C).

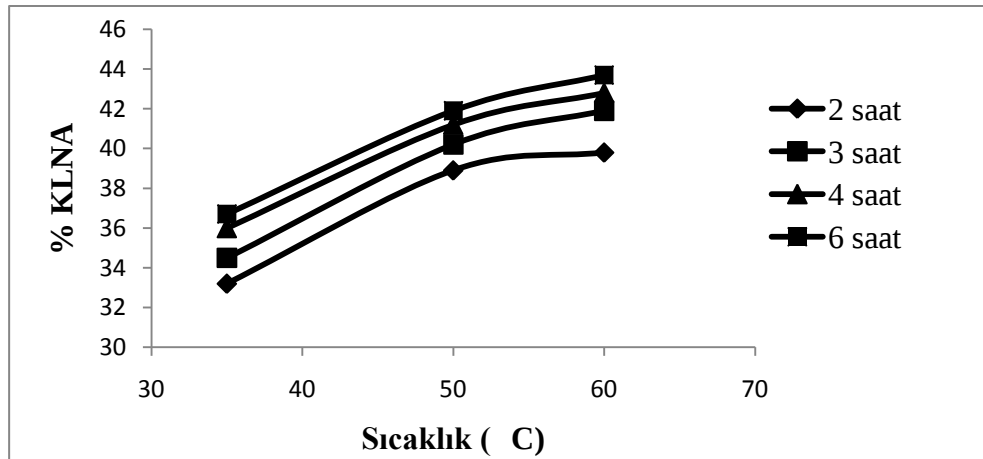
Yağ asidi	Yağ asidi bileşimi(%)				
	Orijinal Zeytinyağı	Yapılandırılmış TAG			
		2 saat	3 saat	4 saat	6 saat
16:0	13,5	10,7	10,5	10,1	9,9
16:1	0,9	0,6	0,5	0,5	0,4
18:0	2,2	2,7	2,6	2,5	2,6
18:1	71,7	42,2	42,0	41,8	41,5
18:2	11,1	9,8	9,9	9,1	8,9
18:3 (KLNA)	—	33,2	34,5	36,0	36,7
Punisik asit		25,1	25,8	26,8	27,0
α -eleostearik asit		3,9	4,0	4,2	4,3
Katalpik asit		2,5	2,7	2,9	2,9
β -eleostearik asit		0,7	0,8	0,9	0,9
Diğer		1,0	1,2	1,2	1,6

Çizelge 4.11 : Zeytinyağının KLNA ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin (TAG) yağ asidi bileşimlerinin sıcaklık ile değişimi (ZY:NYYA mol oranı 1:4 , enzim miktarı %10, sıcaklık 60°C).

Yağ asidi	Yağ asidi bileşimi(%)				
	Orijinal Zeytinyağı	Yapılandırılmış TAG			
		2 saat	3 saat	4 saat	6 saat
16:0	13,5	9,3	8,3	8,1	8,2
16:1	0,9	0,6	0,5	0,4	0,5
18:0	2,2	2,6	2,5	2,4	2,5
18:1	71,7	38,8	38,0	37,9	37,0
18:2	11,1	8,9	8,8	8,4	8,1
18:3 (KLNA)	—	39,8	41,9	42,8	43,7
Punisik asit		28,6	29,2	29,8	30,1
α -eleostearik asit		5,0	5,2	5,6	5,8
Katalpik asit		3,9	4,1	4,5	4,7
β -eleostearik asit		1,1	1,0	1,2	1,2
Diğer		1,2	2,4	1,7	1,9

Çizelgelerde verilenlere göre, değişen sıcaklık ve reaksiyon süresine göre zeytinyağına katılan KLNA miktarları, Şekil 4.4'te görülmektedir.

Şekil 4.4'e göre tüm reaksiyon sürelerinde en yüksek KLNA katılımı 60 °C sıcaklıkta gerçekleşmiştir. Buna göre KLNA katılımının 60°C'den daha yüksek sıcaklıklarda da artış göstereceği tahminini yapılmışsa da çalışma sırasında bu sıcaklıklarda çalışmanın kolay olmaması nedeniyle tercih edilmemiştir. Daha önce de belirtildiği gibi optimizasyonun verimli bir şekilde elde edilmesi reaksiyonların uygulanabilirliklerine de bağlıdır. 68 °C kaynama noktasına sahip olan çözücü hekzanın 60°C'nin üstündeki çalışma sıcaklıklarında reaksiyon şişlerinin kapaklarına basınç yapmasının ve kapakları attırmasının muhtemel olması nedeniyle bu sıcaklıklarda reaksiyon yapılması uygun görülmemiştir. Buna göre deneysel tasarımdaki -1, 0, +1 kodlarına karşılık gelen sıcaklık değerleri 40°C, 50°C, 60°C olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4 : Zeytinyağının NYYA ile asidolizinde, KLNA katılımının farklı reaksiyon sürelerinde sıcaklık ile değişimi.

4.4 Tepki Yüzey Metodolojisi'ne göre Deneysel Tasarım ve Reaksiyon

Parametrelerinin Optimizasyonu

KLNA'ca zenginleştirilmiş zeytinyağının enzimatik üretiminde, enzim miktarı, substrat mol oranı ve sıcaklık parametrelerinin etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesinde Tepki Yüzey Metodolojisi uygulanmıştır. Bu çalışmada, 3 değişkenli, 3 seviyeli ve 17 özel tasarım noktası içeren Merkezi Bileşik Yüzey Merkezli Küp Tasarımı esasları temel alınmıştır. Deneylerin tasarımında seçilen bağımsız değişkenler ve bu değişkenlerin Bölüm 4.3'te belirlenen seviye değerleri

Çizelge 4.12’de verilmiştir. Yüzey merkezli küp tasarımına göre belirlenen 3 değişkenli ve 3 seviye değerli deney tasarımını noktaları, kodları ve değerleri Çizelge 4.13’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.12 : Yüzey Merkezli Küp Tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviye değerleri.

Bağımsız Değişkenler	Kodlanan değişken seviyeleri		
	-1	0	1
NYYA:ZY mol oranı (mol/mol)	3	4	5
Enzim miktarı (% ağırlıkça)	5	10	15
Sıcaklık (°C)	40	50	60

Çizelge 4.13 : Yüzey Merkezli Küp Deney Tasarımındaki deney tasarım noktaları.

Deney No	NYYA:ZY mol oranı		Enzim (%)		Sıcaklık (°C)	
	Kod	Değer	Kod	Değer	Kod	Değer
D1	-1	3	-1	5	-1	40
D2	-1	3	-1	5	1	60
D3	1	3	-1	15	-1	40
D4	1	3	-1	15	1	60
D5	-1	5	1	5	-1	40
D6	-1	5	1	5	1	60
D7	1	5	1	15	-1	40
D8	1	5	1	15	1	60
D9	0	3	-1	10	0	50
D10	0	5	1	10	0	50
D11	-1	4	0	15	0	50
D12	1	4	0	10	0	50
D13	0	4	0	10	-1	40
D14	0	4	0	10	1	60
D15	0	4	0	10	0	50
D16	0	4	0	10	0	50
D17	0	4	0	10	0	50

Çizelge 4.13'te belirlenen koşullarda yürütülen 17 asidoliz reaksiyonu sonunda elde edilen yapılandırılmış TAG ürünlerinin gaz kromatografisi ile belirlenen yağ asitleri bileşimleri Çizelge 4.14– Çizelge 4.17'de gruplar halinde verilmiştir.

Çizelge 4.14 : Zeytinyağı ile konjuge linolenik asidin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri, ZY:NYYA mol oranı 1:3, (Deney No: 1 - 4 sonuçları).

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	%5 Enzim		%15 Enzim	
	Sıcaklık, 40°C	Sıcaklık, 60°C	Sıcaklık, 40°C	Sıcaklık, 60°C
	D1	D2	D3	D4
16:0	9,2	9,1	9,6	9,2
16:1	0,8	0,5	0,5	0,4
18:0	2,7	2,6	2,9	2,7
18:1	41,9	38,3	43,9	38,6
18:2	9,4	9,3	9,3	8,5
18:3 (KLNA)	36,0	40,2	33,7	40,6

Çizelge 4.15 : Zeytinyağı ile konjuge linolenik asidin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri (ZY:NYYA: mol oranı 1:5) (Deney No: 5 - 8 sonuçları).

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	%5 Enzim		%15 Enzim	
	Sıcaklık, 40°C	Sıcaklık, 60°C	Sıcaklık, 40°C	Sıcaklık, 60°C
	D5	D6	D7	D8
16:0	7,9	7,3	8,3	7,5
16:1	0,4	0,3	0,4	0,4
18:0	2,7	2,3	2,6	2,5
18:1	31,8	28,3	34,5	30,1
18:2	8,9	8,3	8,8	8,3
18:3 (KLNA)	48,3	53,5	45,3	51,3

Çizelge 4.16 : Zeytinyağı ile konjuge linolenik asidin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri (Sıcaklık 50°C) (Deney No: 9-12 sonuçları)

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)			
	ZY : NYYA mol oranı 1:3	ZY: NYYA mol oranı 1: 5	ZY: NYYA mol oranı 1:4	
	%10 enzim D9	% 10 enzim D10	%5 enzim D11	%15 enzim D12
16:0	8,0	7,8	9,0	9,3
16:1	0,5	0,3	0,4	0,5
18:0	2,7	2,4	2,7	2,7
18:1	40,0	28,1	39,3	41,0
18:2	8,4	8,3	8,6	8,9
18:3 (KLNA)	40,4	53,1	39,9	37,8

Çizelge 4. 17: Zeytinyağı ile konjuge linolenik asidin asidolizinde elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri (ZY: NYYA mol oranı 1:4, Enzim miktarı %10) (Deney No: 13-17 sonuçları)

Yağ asitleri	Yağ asitleri bileşimi (%)				
	Sıcaklık, 40°C	Sıcaklık, 60°C	Sıcaklık, 50°C	Sıcaklık, 50°C	Sıcaklık, 50°C
	D13	D14	D15	D16	D17
16:0	9,2	8,9	8,6	10,9	8,7
16:1	0,5	0,4	0,4	0,3	0,5
18:0	2,7	2,8	2,7	3,9	2,9
18:1	41,8	35,7	37,6	32,3	37,4
18:2	9,4	9,7	9,0	11,4	9,0
18:3 (KLNA)	36,4	42,5	41,7	41,0	41,5

TYM esaslarına göre yürütülmüş deneylerde konjuge linolenik asitçe zenginleştirilmiş TAG ürünlerindeki KLNA yüzdeleri tepki değeri olarak Çizelge 4.18’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18 : Yüzey Merkezli Küp Tasarımına göre yürütülmüş asidoliz reaksiyonlarından elde edilen tepki değerleri

Deney No	NYYA:ZY mol oranı	Enzim miktarı (%)	Sıcaklık (°C)	Tepki (%KLNA)	
				Gözlenen	Tahmin edilen
1	3	5	40	36,0	35,6
2	3	5	60	40,2	40,4
3	3	15	40	33,7	33,7
4	3	15	60	40,6	40,3
5	3	5	40	48,3	48,5
6	5	5	60	53,5	53,4
7	5	15	40	45,3	45,0
8	5	15	60	51,3	51,6
9	5	10	50	40,4	40,9
10	3	10	50	53,1	53,0
11	5	15	50	39,9	40,0
12	4	10	50	37,8	38,2
13	4	10	40	36,4	36,8
14	4	10	60	42,5	42,5
15	4	10	50	41,7	41,1
16	4	10	50	41,0	41,1
17	4	10	50	41,5	41,1

4.5 Farklı Reaksiyon Koşullarının Zeytinyağı ile KLNA'nın Asidoliz Reaksiyonuna Etkilerinin İstatiksel Açıdan Değerlendirilmesi

Çizelge 4.18'de belirtilen bağımsız değişken değerlerine karşılık elde edilen tepki değerlerinin istatistiksel analizi için Statistica 7.0 (Stat Soft® Inc.) paket programı kullanılmıştır. 3 değişken ve 3 seviye değerli yüzey merkezli deneysel tasarımda elde edilen tepkilerin değerlendirilmesinde aşağıda verilen 2. dereceden polinom eşitliğinden yararlanılmıştır.

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

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

Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerinin tahminleri ve katsayıları programdan elde edilmiştir. Bu değerler Çizelge 4.19'da, varyans analizi sonuçları ise Çizelge 4.20'de görülmektedir.

Çizelge 4.19 : Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları.

	Etki	Standart Hata	t değeri	P değeri	Katsayı
Ortalama/Kesişim	41,09296	0,210966	194,7851	0,000000	41,1
Lineer					
X_1	12,1	0,3	38,9	0,00000	6,1
X_2	-1,8	0,3	-5,9	0,00059	-0,9
X_3	5,7	0,3	18,2	0,00000	2,8
Kuadratik					
X_{11}	11,8	0,6	19,5	0,00000	5,9
X_{22}	-4,0	0,6	-6,7	0,00028	-2,0
X_{33}	-2,8	0,6	-4,7	0,00223	-1,4
Etkileşim					
X_{12}	-0,82	0,3	-2,4	0,04986	-0,4
X_{13}	0,02	0,3	0,07	0,94484	0,01
X_{23}	0,87	0,3	2,5	0,04040	0,4
R^2	0,99				

X_1 = NYA:ZY mol oranı

X_2 = Enzim miktarı (%)

X_3 = Sıcaklık (°C)

X_{11} = NYA:ZY mol oranı * NYA:ZY mol oranı

X_{22} = Enzim miktarı * Enzim miktarı

X_{33} = Sıcaklık * Sıcaklık

X_{12} = NYA:ZY mol oranı * Enzim miktarı

X_{13} = NYA:ZY mol oranı * Sıcaklık

X_{23} = Enzim miktarı * Sıcaklık

(4.1)'deki polinom eşitliğinden yararlanılarak (4.2) eşitliğindeki 2. dereceden polinom olan model denklem oluşturulmuştur.

$$\% \text{ KLNA} = 41,1 + 6,1 \cdot X_1 + 5,9 \cdot X_1^2 - 0,9 \cdot X_2 - 2,0 \cdot X_2^2 + 2,8 \cdot X_3 - 1,4 \cdot X_3^2 - 0,4 \cdot X_1 \cdot X_2 + 0,01 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0,4 \cdot X_2 \cdot X_3 \quad (4.2)$$

Çizelge 4.20 : Varyans analizi sonuçları

Faktör	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F değeri	p değeri
Lineer					
X ₁	367,2	1	367,2	1510,8	0,0000
X ₂	8,5		8,5	34,8	0,0006
X ₃	80,6		80,6	331,8	0,0000
Kuadratik					
X ₁₁	92,9	1	92,9	382,0	0,0000
X ₂₂	10,8		10,8	44,6	0,0003
X ₃₃	5,3		5,3	21,9	0,0022
Etkileşim					
X ₁₂	1,4	1	1,4	5,6	0,05
X ₁₃	0,001		0,001	0,005	0,94
X ₂₃	1,5		1,5	6,3	0,04
Hata	1,7	7			
Kareler Toplamı	555,2	16			

X₁= NYA:ZY mol oranı

X₃₃= Sıcaklık * Sıcaklık

X₂= Enzim miktarı (%)

X₁₂= NYA:ZY mol oranı *Enzim miktarı

X₃= Sıcaklık (°C)

X₁₃= NYA:ZY mol oranı * Sıcaklık

X₁₁= NYA:ZY mol oranı * NYA:ZY mol oranı

X₂₃= Enzim miktarı* Sıcaklık

X₂₂= Enzim miktarı * Enzim miktarı

Varyans analiz sonuçları incelendiğinde lineer ve kuadratik değerlerin %99 güven aralığında anlamlı olduğu ancak etkileşim değerleri açısından bakıldığında NYA:ZY mol oranı*enzim miktarı ve enzim miktarı*sıcaklık etkileşiminin % 95 güven aralığında anlamlı olduğu görülmektedir Ancak NYA:ZY mol oranı*sıcaklık etkileşim değerleri istatistiksel açıdan anlamlı değildir.

Zeytinyağına bağlanan konjuge linolenik asit için oluşturulan model denklemin korelasyon katsayısı (R^2) 0,99 olarak bulunmuştur. Ayrıca deneysel değerler ve tahmin edilen değer arasındaki kalanlar toplamı 0,2 olarak bulunmuştur. Bölüm 2.10.4 ve Bölüm 2.10.5'te anlatıldığı gibi korelasyon katsayısının 1'e yakın olması ve kalanlar toplamının neredeyse sıfır olması oluşturulan model denklemin uygunluğunu desteklemektedir.

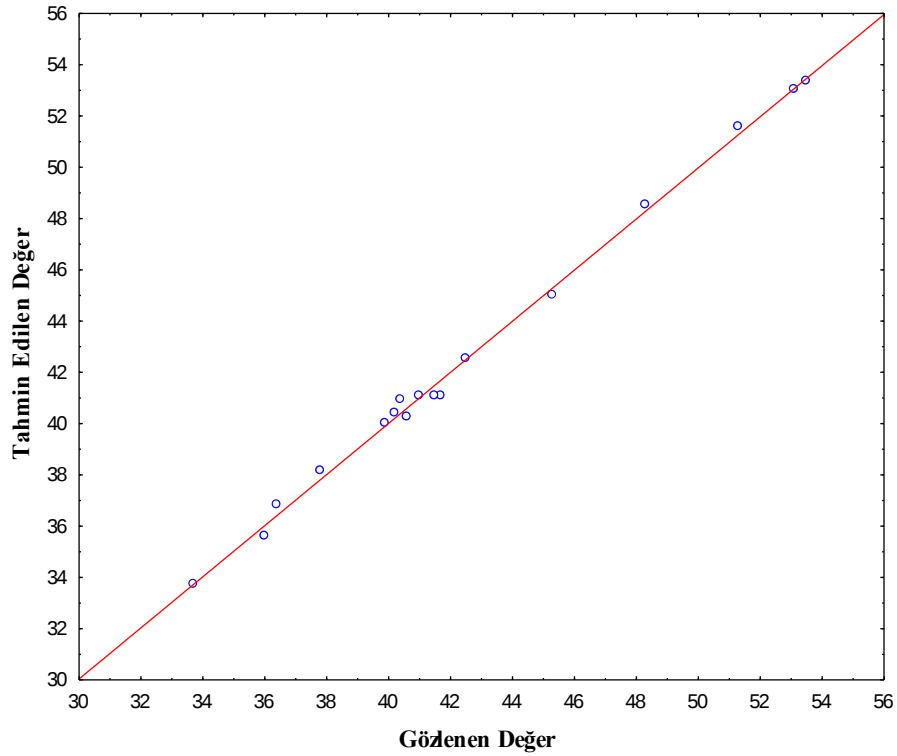
Oluşturulan Tepki-Yüzey modelinde NYYA:ZY mol oranı, enzim miktarı ve sıcaklık olmak üzere 3 farklı bağımsız değişken için gözlenen minimum ve maksimum değerler ile kritik değerler Çizelge 4.21’de görülmektedir.

Çizelge 4.21 : Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri.

	Gözlenen minimum değer	Kritik değer	Gözlenen maksimum değer
NYA:ZY mol oranı	3,0	3,5	5,0
Enzim miktarı (%)	5,0	9,7	15,0
Sıcaklık (°C)	40,0	59,9	60,0

Tepki yüzey metodolojisine göre elde edilecek kritik tepki değeri % 41 olarak bulunmuştur.

Daha önce elde edilmiş olan model denklemden yararlanarak, gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki Şekil 4.5’te verilmiştir.



Şekil 4.5 : Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki

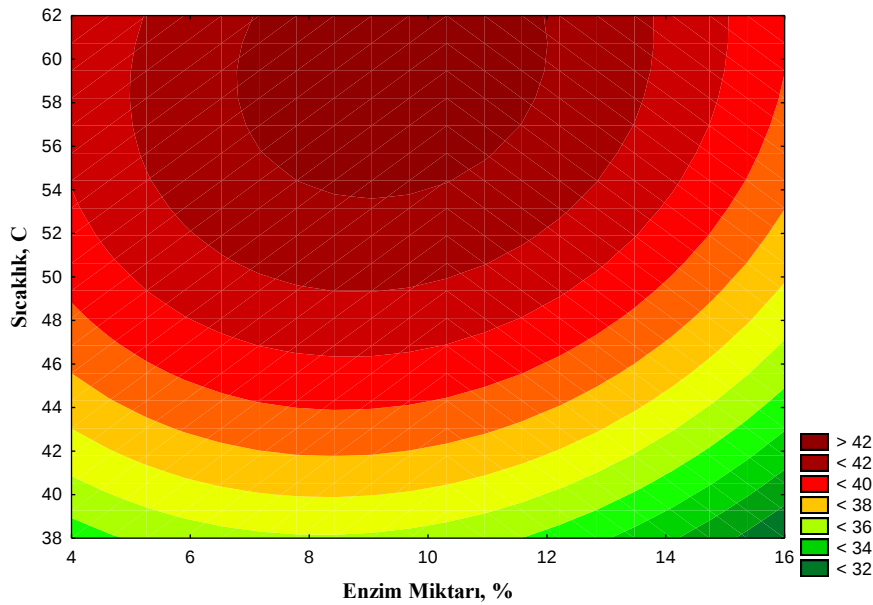
Şekil 4.5’ten de görüldüğü gibi gözlenen değerlerle tahmin edilen değerlerin dağılımı büyük ölçüde lineerlik göstermektedir. Bu durum korelasyon katsayısının 0,99

olmasını doğrulamakla beraber oluşturulan model denklem ile reaksiyon parametreleri arasındaki gerçek ilişkiyi de göstermektedir.

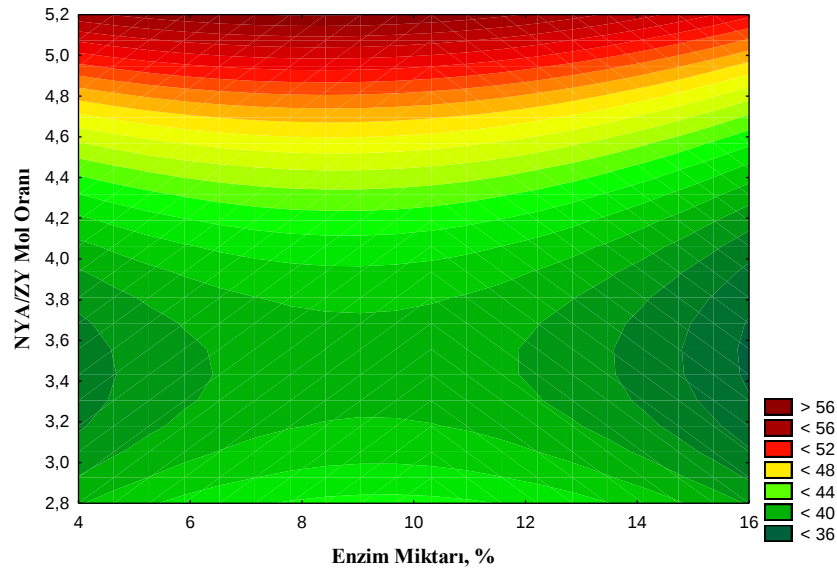
4.6 İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması

Zeytinyağının KLNA ile enzimatik asidoliz reaksiyonu sonucu elde edilen ürünün KLNA içeriğinin, NYYA/ZY mol oranı, enzim miktarı ve sıcaklığa göre değişimini gösteren izdüşüm (Contour Plot) grafikleri Şekil 4.6 - Şekil 4.8’de görülmektedir. İzdüşüm grafiklerinde görüldüğü gibi elde edilen tepki değerlerine ait eğriler bir düzlem üzerinde gösterilir. Bu düzleme ait koordinatlar bağımsız değişkenlerin seviyelerini göstermektedir. Her bir izdüşüm eğrisi, bağımsız değişkenlere ait seviyelerin bir birleşimi olarak ifade edilen bir düzlemle yüzey arasındaki yüksekliği temsil eden özel bir değere sahiptir [65].

KLNA içeriğinin, ZY:NYYA mol oranı, enzim miktarı ve sıcaklığa göre değişimini açıklayan grafiklerden, literatürde maksimum tepki olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir. Şekil 4.6 incelendiğinde yapılandırılmış zeytinyağında KLNA içeriğinin en yüksek olacağı enzim miktarı aralığının % 6-14 ve sıcaklık değerinin 48°C-62°C olduğu görülmektedir.

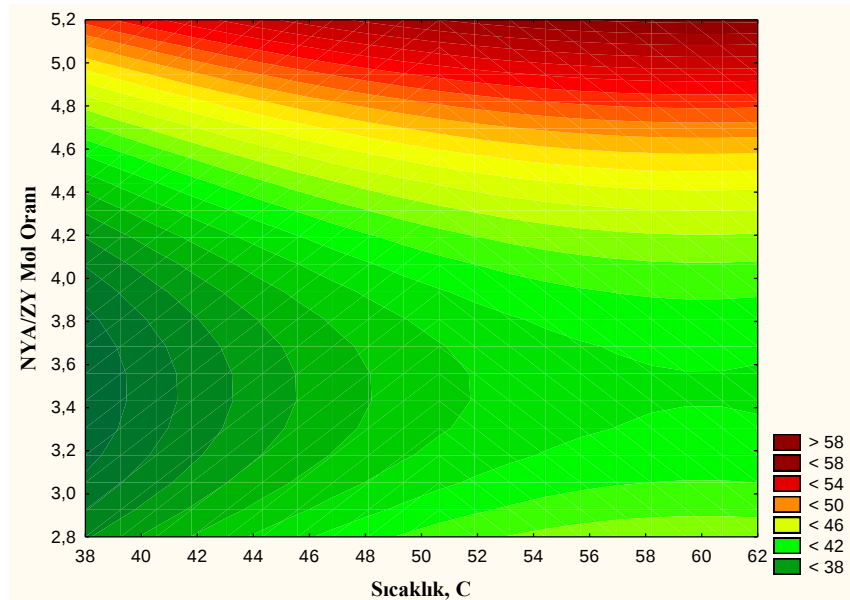


Şekil 4.6 : Ürünün KLNA içeriğinin, sıcaklık ve enzim miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.7 : Ürünün KLNA içeriğinin, NYA:ZY mol oranı ve enzim miktarı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği

KLNA içeriğinin mol oranı ve enzim miktarına göre değişimini gösteren izdüşüm grafiği Şekil 4.7’de görülmektedir. Mol oranı ve enzim miktarının KLNA içeriğine etkileri sonucunda izdüşüm grafiği elde edilmiştir. Çalışmada gözlenen değer aralığında, NYA:ZY mol oranının 5-5.2 ve enzim miktarının % 6-14 aralığında olması durumunda zeytinyağına katılan KLNA yüzdesinin yüksek değerlere ulaşacağı görülmektedir.



Şekil 4.8 : Ürünün KLNA içeriğinin, NYA:ZY mol oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği

Son olarak, NYYA:ZY mol oranının ve sıcaklığın konjuge linolenik asit içeriğine etkileri sonucunda elde edilen izdüşüm grafiği ise Şekil 4.8’de görülmektedir. Buna göre ZY:NYYA mol oranı 5-5.2 ve sıcaklık değerinin 50 °C-60 °C aralığında KLNA katılımının yüksek değerlere ulaşacağı görülmektedir.

5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yağlar, insan sağlığı ve beslenme açısından büyük öneme sahiptir. Günlük diyetle alınan yağın miktarı ve kompozisyonu olası kalp ve damar hastalıkları ile ilişkisi açısından önem taşımaktadır. Bu amaçla son yıllarda yağlara çeşitli modifikasyon işlemleri uygulanarak elde edilen yapılandırılmış yağlarla, tüketiciler için besin içeriği zenginleştirilmiş, istenilen niteliklere sahip yağlar üretilmiştir. Böylece tüketiciye hem sağlığa daha olumlu etkileri olan hem de farklı niteliklerde yeni alternatif yağlar sunulmaktadır.

Zeytinyağı binlerce yıldır Akdeniz havzasında üretilen zeytin bitkisinin meyvesinden mekanik ekstraksiyonla elde edilir. Türkiye, dünya zeytinyağı üretiminde önemli bir yere sahiptir. Zeytinyağı ekonomik değerinin yanında, sahip olduğu yağ asitleri, hidrokarbonlar, steroller ve diğer azınlık bileşenler açısından oldukça önemli bir besindir.

Konjuge linolenik asit (KLNA), üç konjuge çift bağ içeren oktadekatrienoik asidin pozisyonel ve geometrik izomerlerinin oluşturduğu bir gruptur. Hayvansal yağlarda kayda değer miktarda bulunmazken çeşitli çekirdek yağlarında bulunur. KLNA'nın insan sağlığına olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. KLNA, kanser oluşum riskini azaltmakta, bağışıklık sistemini kuvvetlendirmekte, kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu görev yapmakta ve diyabet hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada zeytinyağından sağlığa daha yararlı olabilecek konjuge linolenik asitçe zenginleştirilmiş daha fonksiyonel triaçilgliserollerin, enzimatik yöntem ile üretimi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaçla, zeytinyağı ile NYYA'nın 1,3-spesifik *Thermomyces lanuginosa* lipazı varlığında asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. KLNA katılımı üzerine substrat mol oranı, enzim miktarı, sıcaklık ve reaksiyon süresinin etkileri incelenerek Tepki Yüzey Metodolojisi ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın birinci bölümünde substrat mol oranı, enzim miktarı, sıcaklık ve reaksiyon süresinin KLNA katılımı üzerine etkisini belirlemek üzere değişen reaksiyon koşullarında çeşitli ön denemeler yapılmıştır. Bu amaçla 1:3-1:6 arasında değişen ZY:NYYA mol oranı, substrat miktarının %5'i, %10'u ve %15'i olacak şekilde enzim miktarı, 35°C, 50°C, 60°C sıcaklık değerlerinde ve 2, 3, 4, 6 saatlik reaksiyon sürelerinde asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Sonuçta yapılan ön denemelerde KLNA katılımına 4 saatten fazla olan reaksiyon süresinin önemli bir etkisinin olmadığı saptanırken substrat mol oranı, enzim miktarı ve sıcaklıktaki değişimlerin katılıma etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmanın ikinci kısmında Tepki Yüzey Metodolojisinde kullanılacak bağımsız değişkenler ve seviye değerleri belirlenmiş ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu üzerine deneyler yürütülmüştür. Bağımsız değişkenler olarak substrat mol oranı, enzim miktarı ve sıcaklık seçilmiştir. TYM kullanılacak bağımsız değişkenlerin değerleri 1:3, 1:4, 1:5 ZY:NYYA mol oranları, %5, %10, %15 enzim miktarı, 40 °C, 50°C ve 60°C sıcaklık değerleri olarak belirlenmiştir. 3 faktörlü ve 3 seviyeli yüzey merkezli deney tasarımına uygun olarak 17 asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tepki değerleri Statistica 9.0 programı ile istatistiksel olarak analiz edilmiş ve optimum reaksiyon koşulları elde edilmiştir.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda katılım reaksiyonu için kritik değerler, 1:3,5 ZY:NYYA mol oranı , %9,7 enzim miktarı ve 60 °C sıcaklık değeri olarak saptanmıştır. Bu koşullarda %41 oranında KLNA içeren triaçilgliseroller elde edilebileceği belirlenmiştir.

Zeytinyağının KLNA'ca zenginleştirilmesi amacı ile gerçekleştirilen enzimatik asidoliz reaksiyonları farklı enzimlerle yürütülerek en uygun enzim çeşidi de belirlenebilir.

Zeytinyağının KLNA ile asidoliz reaksiyonunun optimizasyonu üzerinde literatürde benzer bir çalışma bulunmadığından, bu çalışmanın literatüre bilimsel bir katkısı olacaktır.

Türkiye dünya zeytinyağı üretiminde önemli bir yere sahiptir. Bu durum göz önüne alındığında mevcut zeytinyağı potansiyeli en iyi şekilde değerlendirilebilir, zeytinyağının ve sağlığa birçok faydası olan KLNA ile asidolizi sonucu tüketicilere farklı niteliklerde yapılandırılmış yağlar sunulabilir.

KAYNAKLAR

- [1] **Firestone, D.**, 2005. Olive Oil, in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Volume 2, p. 303-331, Ed. Shahidi, F., John Wiley & Sons, Canada America.
- [2] **Garcia, E., Luh,B.,S., Martin,M.,H.**, 2004. *Processing fruits:science and tecnology*,CRC Press,New York
- [3] **Url-1**, Zeytin ve zeytinyağı, <http://www.tariszeztinyagi.com/Default.asp>, alındığı tarih 25.02.2010
- [4] **Url-2**, <www.sifalioitlar.org/wpcontent/upload/zeytin.jpg>, alındığı tarih 25.02.2010
- [5] **Boskou, D.**, 1996. *Olive Oil: Chemistry and Technology*, p. 3-79, AOCS Press, Illinois.
- [6] **Url-3**, <<http://www.samsuntarim.gov.tr/teknikbilgiler/lifletler/bahce/zeytin.pdf>> alındığı tarih 25.02.2010
- [7] **Yemisçioğlu, F., Gümüskesen A. S. ve Otağ R. M.**, 2001. Zeytinyağı üretiminde kullanılan sürekli sistemler ve bu sistemlerin klasik presleme yöntemi ile karşılaştırılması, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **9**, 26-30.
- [8] **Şeleci, D.**, 2007. Zeytinyağından konjuge linoleik asit ile yapılandırılmış yağ üretimi ve optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [9] **Nas, S., Gökalg H. Y. ve Ünsal, M.**, 2001. *Bitkisel Yağ Teknolojisi*, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları Yayını, 10-180.
- [10] **Komili Unilever T.A.S**, 2001. Zeytinyağının Tarihsel Gelişimi, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **9**, 18–20.
- [11] **Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, J. D. R. , Bishop, A. G., Prenzler, P. D. and Robards, K.**, 2007. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review, *Food Chemistry*, **100(1)**, 273-286.
- [12] **Araghipour, N., Colineau, J., Koot, A., Akkermans, W., Rojas, J., Beauchamp, J., Wisthaler, A., Mark, T., Downey, G., Guillou, C., Mannina, L., Ruth, S.**, 2008, Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS, *Food Chemistry*, **108**, 374–383
- [13] **Terral, J. F. and Durand, A.**, 2006. Bio-archaeological Evidence of Olive Tree (*Olea europaea* L.) Irrigation During the Middle Ages in Southern France and North Eastern Spain, *Journal of Archaeological Science*, **33(5)**, 718-724

- [14] **Ünsal, M.**, 2003. Zeytinyağına Lezzet Veren Bileşenler, *Gıda*, **8**, 84-88.
- [15] **Jimenez, M. S., Velarte V. and Castillo, J. R.**, 2007. Direct Determination of Phenolic Compounds and Phospholipids in Virgin Olive Oil by Micellar Liquid Chromatography, *Food Chemistry*, **100(1)**, 8-14.
- [16] **Tunalıoğlu, R.**, 2002. Zeytinyağı Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü, *T.E.A.E-Bakış*, **1**, 1-4. Antities of applied water, *Agricultural Water Management*, **85(1-2)**, 133-140.
- [17] **Url-4**, <<http://www.internationaloliveoil.org/downloads/production1.PDF>>, alındığı tarih 01.03.2010
- [18] **Ocakoglu, D., Tokatlı, F., Ozen, B., Korel, F.**, 2008, Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years, *Food Chemistry*, **113**, 401–410
- [19] **Covas, M. I.**, 2007. Olive oil and the cardiovascular system, *Pharmacological Research*, **55(3)**, 175-186.
- [20] **Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B. and Barthsch, H.**, 2000. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants, *The Lancet Oncology*, **1(2)**, 107-112.
- [21] **Firestone, D.**, 2005. Pomegranate seed oil , in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Volue 3, p. 255, Ed. Shahidi, F., John Wiley & Sons, Canada America.
- [22] **Url-5** Kuleyin A., Nar Yetiştiriciliği, www.samsuntarim.gov.tr, alındığı tarih 10.03.2010
- [23] **P Melgarejo and F Arte's**, Total lipid content and fatty acid composition of oilseed from lesser known sweet pomegranate clones, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**:1452-1454
- [24] **Iqbal, S., Halem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M., Akbar, J.**, 2008. Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions, *Food Research International University of Karachi, Pakistan*, **41**, 194-200.
- [25] **Kaufman, M. And Wiesman, Z.**, 2007. Pomegranate Oil Analysis with Emphasis on MALDI-TOF/MS Triacylglycerol Fingerprinting, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55 (25)**, 10405-10413.
- [26] **Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, R., Hayek, T., Presser, D., Fuhrman, B.**, 2000. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E- deficient mice, *The American Journal of the Clinical Nutrition*, **71**, 1062-1076.
- [27] **Hirshfeld W.**, 2004. Myocardial Ischemia and Infarction , *Journal of the American College of Cardiology*, **45**, 12-16.

- [28] **Malik, A., Aga, F., Sarfaraz, S., Adhami, V., Syed, D., Mukhtar, H.,** 2005. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer, Department of Dermatology, University of Wisconsin, Madison, **102**, 41, 14813-14818
- [29] **Özgül-Yücel, S.,** 2005, Determination of Conjugated Linolenic Acid Content of Selected Oil Seeds Grown in Turkey, *JAOCs*, **82**, 893-897.
- [30] **Ying, C., Hong-Li, G., Jing-Nan, C., Zhen-Yu, C. And Lin Y.,** 2006. Identification and Characterization of Conjugated Linolenic Acid Isomers by Ag⁺-HPLC and NMR, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 9004-9009.
- [31] **Tsuzuki, T., Kawakami, Y., Abe, R., Nakagawa, K., Koba, K., Imamura, J., Iwata, T., Ikeda, I., Miyazawa, T.,** 2006. Conjugated Linolenic Acid Is Slowly Absorbed in Rat Intestine, but Quickly Converted to Conjugated Linoleic Acid, *The Journal of Nutrition*, Tohoku University, Japan, **136**, 2153-2159.
- [32] **Tsuzuki, T., Tokuyama, Y., Igarashi, M., Miyazawa, T.,** 2004, Tumor growth suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation, *Carcinogenesis* **vol.25** no.8 pp.1417—1425
- [33] **Sita Devi, P.,** 2003, TLC as a Tool for Quantitative Isolation of Conjugated Trienoic FA, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**:315–318
- [34] **Suzuki, R., Noguchi, R., Ota, T., Abe, M., Miyashita, M., Kawada, T.,** 2001, Cytotoxic Effect of Conjugated Trienoic Fatty Acids on Mouse Tumor and Human Monocytic Leukemia Cells, *Lipids* **36**, 477–482
- [35] **Igarashi, M., Miyazawa, M.,** 2005, Preparation and Fractionation of Conjugated Trienes from α -Linolenic Acid and Their Growth-Inhibitory Effects on Human Tumor Cells and Fibroblasts, *Lipids* **40**, 109–113
- [36] **Dhar, P., Ghosh, S. and Bhattacharyya, D.K.,** 1999, Dietary Effects of Conjugated Octadecatrienoic Fatty Acid (9 *cis*, 11 *trans*, 13 *trans*) Levels on Blood Lipids and Nonenzymatic *in vitro* Lipid Peroxidation in Rats, *Lipids*, **Vol. 34**, no. 2
- [37] **Senanayake, N.S.P.J., and Shahidi F.,** 2005, Modification of fats and oils via chemical and enzymatic methods in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Vol. 3, p. 555-584, Ed. Shahidi, F., John Wiley & Sons, Canada America.
- [38] **Chopra, R., Reddy, S. R. Y., Sambaiah, K.,** 2008. Structured lipids from rice bran oil and stearic acid using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*, *Eur. J. Lipid Sci. Technology*, **110**, 32-39.
- [39] **Akoh, C. C.,** 2002. Structured Lipids, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biology*, pp.877-901, Ed. Akoh, C. C. and Min, D. B., Marcel Dekker Inc, New York.
- [40] **Triverdi R., Singh, R., P.,** 2005, Modification of oil and fats to produce structured lipids, *Journal of oleo science*, vol **54**, No.8, 423-430

- [41] **Gunstone, F. D.**, 2001. Why are Structured Lipids and New Lipid Sources Required?, in *Structured and Modified Lipids*, pp.1-9, Ed. Gustavo F. D., Marcel Dekker Inc., New York.
- [42] **Bell, S. J. and Bistran, B. R.**, 1998. Structured Triglycerides and Their Medical Applications, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, pp. 189-194, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, America.
- [43] **Willis, W. M. and Marangoni, A. G.**, 2002. Enzymatic Interesterification, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biology*, p.839-875, Ed. Akoh, C. C. and Min, D. B., Marcel Dekker Inc, New York.
- [44] **Hamam, F., Daun, J., Shahidi, F.**, 2005. Lipase-Assisted Acidolysis of High-Laurate Canola Oil with Eicosapentaenoic Acid, *JAACS*, Vol. **82**, no.12
- [45] **Polaina, J., MacCabe, A. P.**, 2007, Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications, p.341-351, Springer, The Netherlands
- [46] **Sharma, R., Chisti Y., Banerjee U. C.**, 2001, Production, purification, characterization, and applications of lipases, *Biotechnology Advances*, **19**, 627–662
- [47] **Camp, J. V., Huyghebaert, A. and Goeman, P.**, 1998. Enzymatic Synthesis of Structured Modified Fats, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, p. 20-42, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, America.
- [48] **Hey, C. E. and Xu, X.**, 2001. Structured Triacylglycerols, in *Structured and Modified Lipids*, p.209-234, Ed. Gustavo F. D., Marcel Dekker Inc., New York.
- [49] **Öztürk, B.**, 2002. Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **12**, 20-38.
- [50] **Akoh, C., Lee, K., Fomuso, L., B.**, 1998. Synthesis of Positional Isomers of Structured Lipids with Lipases as Biocatalyst, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, p.46-72, Ed. Christophe, A., B., AOCS Press, Champaign.
- [51] **Rousseau, D. and Marangoni, A., G.**, 2002. The Effects of Interesterification on the Physical Properties of Fats, in *Physical Properties of Lipids*, p.479-564, Ed. Marangoni, A., B., Narine, S., S., Marcel Dekker Inc., New York.
- [52] **Gilmaz, E. E.**, 2002. Mısır Asidik Yağının Enzimatik Esterleşmesi ile Yağ asidi Esterlerinin Üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul
- [53] **Greyt, W. D. and Huyghebaert, A.**, 1998. Chemical and Physicochemical Modification of Lipids, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, p. 1-17, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, America.

- [54] **Mu, H. and Porsgaard, T.,** 2005. The Metabolism of Structured Triacylglycerols, *Progress in Lipid Research*, **44(6)**, 430-448.
- [55] **Balcao, V. M., Kemppinen, A., Malcata, F. X. and Kalo, P. J.,** 1998. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Butterfat with Oleic Acid: Characterization of Process and Product, *Enzyme and Microbial Technology*, **23**, 118-128.
- [56] **Lai, O. M., Low, C. T. and Akoh, C. C.,** 2005. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Palm Olein and Caprylic Acid in a Continuous Bench-Scale Packed Bed Bioreactor, *Food Chemistry*, **92**, 527-533.
- [57] **Lee, K. T. and Akoh, C. C.,** 1998. Structured Lipids: Synthesis and Application, *Food Res. Inter.*, **14**, 17-34.
- [58] **Öztürk, İ., Ergün G.,** 2006. The Production of Modified Lipids with Conjugated Trienoic Acids, *Lisans tezi*, İTÜ Kimya-Metalurji Fakültesi, İstanbul
- [59] **Özdoğan, B., Bilaloğlu, B., Başhöyük, D.,** 2008. Soya yağından nar konguje linolenik asit (KLNA) ile modifiye lipid üretimi, *Lisans tezi*, İTÜ Kimya-Metalurji Fakültesi, İstanbul
- [60] **Gezen, G.,** 2009. Mısır yağının konjuge linolenik asitçe zenginleştirilmesi, *Lisans tezi*, İTÜ Kimya-Metalurji Fakültesi, İstanbul
- [61] **Haytiyev, M.,** 2009. Kanola yağının konjuge linolenik asitçe zenginleştirilmesi, *Lisans tezi*, İTÜ Kimya-Metalurji Fakültesi, İstanbul
- [62] **Elden, H. Ö.,** 2009. Mahlep yağ asitleri ile modifiye lipidlerin üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [63] **Elibal, B.,** Kanola yağından kudret narı yağ asitleri (KLNA) ile yapılandırılmış yağ üretimi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu, , *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [64] **Ryan,T.P.,** 2007. Modern Experimental Design, p.360-375, John Wiley & Sons; Inc.,Newyork.
- [65] **Myers, R. H. and Montgomery, D. C.,** 2002. *Response Surface MethodologyProcess and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley & Sons; Inc. New York.
- [66] **Khuri,J.A.,** 1996. Response Surface Methodology and Related Topics, p.19-46, World Scientific Publishing.
- [67] **Sambucini, V.,** 2007. A Reference Prior for the Analysis of a Response Surface, *Journal of Statistical Planning and Inference*, **137(4)**, 1119-1128.
- [68] **Dağlı, R.,** 2005. Tripalmitinin Enzimatik Asidoliziyle Düşük Kalorili Yapılandırılmış Lipidlerin Üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [69] **Bektas, İ.,** 2006. Tripalmitinin Kaprik Asit ile Enzimatik Asidolizi: Tepki Yüzey Metodolojisi ile Reaksiyon Kosullarının Optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul

- [70] **Cornell, J. A.**, 1990. How to Apply Response Surface Methodology, Quality Press, Wisconsin, USA.
- [71] **Collins, C. A. and Seeney, F. M.**, 1999. Statistical Experiment Design and Interpretation: an Introduction with Agricultural Examples, Wiley, Chichester.
- [72] **Vuchkov, I. N. and Boyadjieva, L. N.**, 2001. *Quality Improvement with Design of Experiments: a Response Surface Approach*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- [73] **A.O.C.S Official Method**, Ce 2.66, reapproved in 1997

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Eser ARAS

Doğum Yeri ve Tarihi: Iğdır, 23.06.1985

Adres: Yenikent mah. Mutlukent Blokları Bulut 3 D:5 Gebze/Kocaeli

Lisans Üniversite: Uludağ Üniversitesi