

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STEARİDONİK ASİT İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ANNE SÜTÜ YAĞINA
BENZER YAPILANDIRILMIŞ YAĞ ELDESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Alev YÜKSEL

Anabilim Dalı : Gıda Mühendisliği

Programı : Gıda Mühendisliği

OCAK 2011

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STEARİDONİK ASİT İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ANNE SÜTÜ YAĞINA
BENZER YAPILANDIRILMIŞ YAĞ ELDESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Alev YÜKSEL
(506071501)**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20 Aralık 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 25 Ocak 2011

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK (İTÜ)

Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Necla ARAN (İTÜ)

Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN (İTÜ)

OCAK 2011

Ailem'e

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmam süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, birikimleri ile beni yönlendiren tez hocam Yrd. Doç. Dr. Neşe Şahin Yeşilçubuk'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen ve tez çalışmamda da katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Necla Aran'a, çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Güldem Üstün ve Prof. Dr. Selma Türkay'a, laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan Ar. Gör. Zeynep Tacer Caba ve Ar. Gör. Dilek Arduzlar başta olmak üzere İTÜ Gıda Mühendisliği'ndeki tüm hoca ve asistan arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi beni tez çalışmam süresince de yalnız bırakmayan, maddi ve manevi her türlü desteğini esirgemeyen aileme ve özellikle bu tez konusunu seçmemde büyük rolü olan biricik yeğenim Can Yüksel'e çok teşekkür ederim. İyi ki varsınız...

Aralık 2010

Alev YÜKSEL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Yapılandırılmış Yağlar	3
2.1.1 Yapılandırılmış yağların tanımı	3
2.1.2 Yapılandırılmış yağların kullanım alanları	3
2.1.3 Enzimatik sentez yöntemi ile yapılandırılmış yağ eldesi	5
2.2 Lipaz Enzimleri	6
2.2.1 Lipaz enzimlerinin etki mekanizması.....	7
2.2.2 Lipaz enzimlerinin seçiciliği	8
2.2.3 İnteresterifikasyon reaksiyonlarında lipaz aktivitesini etkileyen faktörler ...	10
2.2.3.1 Sıcaklık.....	10
2.2.3.2 Süre.....	11
2.2.3.3 Substrat mol oranı	11
2.3 Yapılandırılmış Yağların Üretiminde Kullanılan Doymamış Yağ Asitleri	12
2.3.1 Omega-9 yağ asitleri	12
2.3.2 Omega-6 yağ asitleri	13
2.3.3 Omega-3 yağ asitleri	13
2.3.4 SDA'nın önemi	16
2.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hammaddeler	17
2.4.1 Fındık yağı.....	17
2.4.2 Omega Vega TM yağ karışımı	18
2.5 Anne Sütü	19
2.5.1 Anne sütündeki yağların yapısı ve bileşimi	19
2.5.2 Anne sütü yağının bebek beslenmesindeki rolü	20
2.5.3 Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağlar üzerine yapılan çalışmalar	21
2.5.4 Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış ticari yağ örnekleri.....	27
2.5.4.1 Betapol TM	27
2.5.4.2 InFat TM	30
2.5.5 Çoklu doymamış yağ asitlerinin bebek mamalarında kullanımına ilişkin mevcut bulunan yasal düzenlemeler	30
3. MATERYAL VE METOT	35

3.1 Materyal.....	35
3.2 Metotlar	35
3.2.1 Substrat yağlardan serbest yağ asitlerinin eldesi.....	35
3.2.2 Asidoliz reaksiyonu.....	36
3.2.3 İnce tabaka kromatografisi ile analiz	36
3.2.4 Yağ asidi metil esterlerinin hazırlanması	36
3.2.5 Yağ asitlerinin gaz kromatografisi ile analizi	37
3.2.6 Yağ asitlerinin sn-2 pozisyonel analizi	38
3.2.7 Ürünün büyük ölçekte üretimi.....	38
3.2.8 Reaksiyon ürünlerinden serbest yağ asitlerinin uzaklaştırılması	39
3.2.9 Oksidatif stabilite analizi.....	39
3.2.10 Erime profili analizi	39
3.2.11 Tepki yüzey yöntemi ve deneysel tasarım	40
3.2.12 İstatistiksel analiz	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	43
4.1 Substratların Yağ Asidi Bileşenleri	43
4.1.1 Fındık yağı.....	43
4.1.2 Omega Vega yağ karışımı	44
4.2 Reaksiyon Koşullarının Tepki Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu	44
4.2.1 Reaksiyon koşullarının stearidonik ve oleik asit katılımına etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi	45
4.2.2 Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması	49
4.2.3 Modelin doğrulanması ve büyük ölçekte üretim.....	56
4.2.4 Yağların oksidatif stabilitesi.....	57
4.2.4 Yağların erime profilleri.....	59
5. SONUÇ	63
KAYNAKLAR.....	65

KISALTMALAR

AA	: Araşidonik Asit
ÇDYA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
DAG	: Diaçilgliserol
DGLA	: Di-Homo γ -Linolenik Asit
DHA	: Dokosahekzaenoik Asit
EPA	: Eikosapentaenoik Asit
GLA	: Gama-Linolenik Asit
GSK	: Gaz Sıvı Kromatografisi
KO	: Kareler Ortalaması
KT	: Kareler Toplamı
LA	: Linoleik Asit
MAG	: Monoaçilgliserol
RSM	: Response Surface Methodology
SD	: Serbestlik Derecesi
SDA	: Stearidonik Asit
SL	: Structured Lipid
SYA	: Serbest Yağ Asidi
TAG	: Triaçilgliserol
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
TYY	: Tepki Yüzey Yöntemi
YA	: Yağ Asidi
YAME	: Yağ Asidi Metil Esterleri
YY	: Yapılandırılmış Yağ

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Ticari yapılandırılmış yağların gıda ve tıbbi uygulamaları	4
Çizelge 2.2 : Anne sütü yağ asidi kompozisyonu.....	20
Çizelge 2.3 : Betapol'ün yağ asidi kompozisyonu (%) ve pozisyonel dağılımı	27
Çizelge 2.4 : Bazı ticari bebek formüllerinin yağ asidi bileşenleri.....	32
Çizelge 2.5 : Uzun zincirli ÇDYA'nın prematüre bebek formüllerine eklenmesi için önerilen değerler.....	33
Çizelge 2.6: ESPGAN tarafından bebek formülleri için önerilen yağ asidi miktarları	33
Çizelge 3.1 : Gaz kromatografisindeki analiz koşulları ve kolon özellikleri	37
Çizelge 3.2 : Merkezil Bileşik Deney Tasarımı için kullanılan değişkenler (faktörler) ve seviyeleri	41
Çizelge 4.1 : Fındık yağının yağ asidi bileşimi ve literatürde yer alan değerler	43
Çizelge 4.2 : Omega Vega yağının ve engerek otunun (<i>Echium plantagineum</i>) yağ asidi bileşimi.	44
Çizelge 4.3 : Tepki Yüzey Yöntemi ile geliştirilen deney tasarımı ve gözlenen tepkiler	45
Çizelge 4.4 : Modelin SDA katılımına ait regresyon katsayıları ve önem dereceleri	46
Çizelge 4.5 : Modelin oleik asit katılımına ait regresyon katsayıları ve önem dereceleri	46
Çizelge 4.6 : SDA ve oleik asit katılımı için varyans analizi sonuçları.	47
Çizelge 4.7 : Optimum koşullarda küçük ölçek ve büyük ölçekte üretilen YY'lerin yağ asidi kompozisyonu (%mol).....	56
Çizelge 4.8 : Deneysel çalışmalarda kullanılan yağ kaynaklarının ve büyük ölçekte üretilen YY'nin indüksiyon süreleri	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Yapılandırılmış yağların genel yapısı; K, O ve U sırasıyla kısa, orta ve uzun zincirli yağ asitlerini göstermektedir	3
Şekil 2.2 : <i>sn</i> -1,3 spesifik lipaz tarafından katalizlenen, orta zincirli yağ asitleri içeren bir TAG ve uzun zincirli yağ asitleri içeren bir TAG arasında gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu (O: Orta zincirli yağ asidi (YA), U: Uzun zincirli YA).....	5
Şekil 2.3 : <i>sn</i> -1,3 spesifik lipaz tarafından katalizlenen, orta zincirli yağ asidi ile uzun zincirli yağ asitleri içeren bir TAG arasında gerçekleşen asidoliz reaksiyonu (O: Orta zincirli yağ asidi (YA), U: Uzun zincirli YA).....	6
Şekil 2.4 : Gliserol ve çoklu doymamış yağ asidi arasında (A) ve gliserol ile orta zincirli yağ asitleri içeren bir TAG arasında (B) gerçekleşen, <i>sn</i> -1,3 spesifik lipaz tarafından katalizlenen asidoliz reaksiyonları (O: Orta zincirli yağ asidi (YA), ÇDYA: Çoklu doymamış YA).....	6
Şekil 2.5 : <i>Thermomyces lanuginosus</i> lipazının açık ve kapalı haldeki yapısı.....	7
Şekil 2.6 : Lipaz enzimleri tarafından katalizlenen enzimatik interesterifikasyon reaksiyonlarının katalitik mekanizması.....	8
Şekil 2.7 : N-6 ve n-3 ÇYDA'larının metabolik yolu	14
Şekil 2.8 : Kabuklu ve kabuksuz fındık.....	17
Şekil 2.9 : Engerek otu (<i>Echium plantagineum</i>).....	19
Şekil 2.10 : Betapol'ün endüstriyel ölçekteki üretim akış şeması	28
Şekil 4.1 : Reaksiyon sonuçları ile SDA katılımına ait modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki	48
Şekil 4.2 : Reaksiyon sonuçları ile oleik asit katılımına ait modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki	49
Şekil 4.3 : SDA katılımının sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği	50
Şekil 4.4 : SDA katılımının süre ve mol substrat oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	50
Şekil 4.5 : SDA katılımının mol substrat oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	51
Şekil 4.6 : Oleik asit katılımının sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği	52
Şekil 4.7 : Oleik asit katılımının süre ve mol substrat oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.....	52
Şekil 4.8 : Oleik asit katılımının mol substrat oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği	53
Şekil 4.9 : Tripalmitin ve büyük ölçekte üretilen YY'ye ait DSC termogramı	59

STEARİDONİK ASİT İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ ANNE SÜTÜ YAĞINA BENZER YAPILANDIRILMIŞ YAĞ ELDESİ

ÖZET

Bebek formüllerinde kullanılmak üzere anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların geliştirilmesi gıda üreticileri tarafından büyük ilgi görmektedir. Bunun nedeni anne sütünün bitkisel yağlarda olmayan ve emilim esnasında besinsel kayıpları önleyen kendine özgü bir yağ yapısına sahip olmasıdır. Günümüzde bebek formüllerinin büyük bir kısmı bitkisel yağlar ile hazırlanmakta ve dolayısıyla anne sütündeki yağların yapısını içermemektedir. Ancak, bitkisel yağ kaynaklarının kullanıldığı spesifik lipaz enzimlerince katalizlenen interesterifikasyon reaksiyonları ile anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ (YY) üretimi mümkün olmaktadır.

Bu çalışmada, tripalmitin, fındık yağı serbest yağ asitleri ile engerek otu (*Echium plantagineum*) yağı ve alg (*Schizochytrium sp.*) yağının karışımından oluşan Omega Vega™ serbest yağ asitleri arasında gerçekleşen enzimatik asidoliz tepkimeleriyle stearidonik asit (SDA) ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların üretilmesi ve tepki-yüzey yöntemi (TYY) ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Enzimatik asidoliz tepkimelerinde *Thermomyces lanuginosus*'dan elde edilen ve ticari olarak tutuklanmış sn-1,3 spesifik bir lipaz olan Lipozyme® TL IM enzimi kullanılmıştır. Tepki-yüzey yönteminde seçilen farklı faktörlerin etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla, 5 seviyeli Merkezli Bileşik Deney Tasarımı (CCC) kullanılarak reaksiyon sıcaklığı (T, °C) [55-65 °C], reaksiyon süresi (t, saat) [4-12 saat] ve substrat mol oranı (Sr, yağ asitleri/triaçilgliserol, mol/mol) [3-5 mol/mol] değişken (faktör) olarak seçilmiştir. Reaksiyonlar sonucunda seçilen tepkiler [stearidonik asit miktarı (%) ve oleik asit miktarı (%)] için, “çoklu regresyon” ve “geriye dönük eleme” yöntemleri uygulanarak başarılı kuadratik modeller elde edilmiştir.

Deney parametrelerinin etkileşimini gösteren tepki yüzey izdüşüm grafikleri incelenerek sıcaklığın 60°C, reaksiyon süresinin 8 saat ve substrat mol oranının 4 mol/mol olduğu koşullar optimum olarak belirlenmiş ve bu koşulda gerçekleştirilen deneylerle modelin doğruluğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, belirlenen optimum koşulda büyük ölçekte üretim gerçekleştirilerek elde edilen YY'nin karakterizasyonu yapılmıştır. Büyük ölçekte üretilen YY'nin SDA miktarının %2,0 ve oleik asit miktarının ise %22,9 olduğu ve sn-2 pozisyonunda %46,2 palmitik asit içerdiği bulunmuştur. Ayrıca, büyük ölçekte üretilen YY'nin oksidatif stabilite analizi yapılarak indüksiyon süresinin 6,08 saat olduğu; erime profili analizi sonucunda da geniş bir erime profiline sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışma ile elde edilen YY'lerin anne sütü ile benzer yağ asidi kompozisyonu ve dağılımı göstermesi, ayrıca sağlık üzerine olumlu etkileri olan SDA'nın yanısıra diğer omega-3 ve omega-6 yağ asitlerince zenginleştirilmesi sonucunda bebek beslenmesi ve gelişimi açısından son derece önemli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, elde edilen bu YY'lerin endüstriyel ölçekte üretilmesi durumunda fındık yağının beklenmektedir.

PRODUCTION OF HUMAN MILK FAT SUBSTITUTES (HMFS) CONTAINING STEARIDONIC ACID

SUMMARY

Food producers have a great interest to develop structured lipids resembling human milk fat to use in infant formulas. Because human milk has a unique lipid structure other than vegetable oils and it protects nutritional loss during absorption in human body. Nowadays, infant formulas are prepared with vegetable oils and so they are lack of human milk fat structure. However, production of structured lipids resembling human milk fat is possible via interesterification reactions catalyzed by specific lipase enzymes with the use of vegetable oil sources.

In this study, production of human milk fat substitutes enriched with stearidonic acid by enzymatic acidolysis reactions between tripalmitin, hazelnut oil fatty acids and Omega VegaTM oil, a physical mixture of *Echium plantagineum* oil and DHA-rich algal oil from *Schizochytrium* sp., fatty acids, and also optimization of reaction conditions with response surface methodology (RSM) were aimed. Lipozyme[®] TL IM, commercially immobilized sn-1,3 specific lipase derived from *Thermomyces lanuginosus*, was used in enzymatic acidolysis reactions. Circumscribed central composite (CCC) design with five levels was used to investigate the effects of chosen different factors in RSM, and the variables (factors) studied were: reaction temperature (T, °C) [55-65 °C], reaction time (t, hour) [4-12 hour] and substrate molar ratio (Sr, free fatty acids/triacylglycerol, mol/mol) [3-5 mol/mol]. Good quadratic models were obtained by the application of "multiple regression" and "backward elimination" methods for chosen responses [amount of stearidonic acid (%) and amount of oleic acid (%)] after the reactions.

After the investigation of contour plots of the interactions between the parameters, optimal conditions were determined as 60°C of reaction temperature with 8 hours of reaction time and 4 mol/mol of substrate molar ratio. Further experiments were done at these optimal conditions in order to verify the models. In addition, the optimal conditions were used for gram-scale synthesis to characterize the obtained structured lipid. Stearidonic and oleic acid contents of the final structured lipid were 2,0% and 22,9%, respectively, with 46,2% of palmitic acid content at sn-2 position. Besides, determination of oxidative stability and melting profile revealed the final structured lipid had 6,08 hours of induction time, and also had a wider melting range.

In this study, since the produced structured lipids (SLs) have the same fatty acid composition and distribution, in addition, its enrichment with stearidonic acid which has positive health effects, as well as other omega-3 and omega-6 fatty acids, obtained SLs have the potential use as an important ingredient of infant formulas for infant nutrition and development. Besides, production of these structured lipids at industrial scale is expected to be beneficial our country's economy via the use of hazelnut oil, an important trade of our country.

1. GİRİŞ

Yağların yağ asidi kompozisyonlarının değiştirilerek, özelliklerinin ve besinsel değerlerinin artırılması ve yeni uygulamalar için geliştirilmiş yapılandırılmış yağların eldesi, günümüzde sıklıkla çalışılan konular arasında yer almaktadır. “Yeni jenerasyon yağlar” olarak da adlandırılan “yapılandırılmış yağlar” kimyasal veya enzimatik interesterifikasyon yöntemleriyle elde edilebildiği gibi fraksinasyon, hidrojenasyon, genetik modifikasyon gibi yöntemler ile de üretilmektedir. Enzimatik interesterifikasyon yöntemlerinin kimyasal yöntemlere göre daha ılımlı koşullarda gerçekleşmesi, spesifik kompozisyona sahip ürünler elde edilmesi, reaksiyonlar sonucunda çok az yan ürün oluşması veya hiç oluşmaması gibi nedenlerden ötürü enzimatik modifikasyona olan eğilim giderek artmaktadır (Osborn ve Akoh, 2002; Bornscheuer ve diğ., 2003).

Son yıllarda, bebek formüllerinde kullanılmak üzere anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların geliştirilmesi gıda üreticileri tarafından büyük ilgi görmektedir. Anne sütünde bulunan yağlar, diğer hayvansal veya bitkisel kaynaklı yağların yapısından oldukça farklı olup, anne sütündeki triaçilgliseroller sn-2 pozisyonunda oldukça yüksek oranda palmitik asit içerirken, diğer yağlar palmitik asidi çoğunlukla sn-1,3 pozisyonunda içermektedir. Bu durum, yağ asitlerinin ve kalsiyum, magnezyum gibi bebekler için önemli bazı minerallerin emilimi açısından farklılıklara neden olmaktadır. Günümüzde bebek formüllerinin büyük bir kısmı bitkisel yağlar ile hazırlanmaktadır, ayrıca anne sütüyle beslenemeyen bebeklerde besinsel kayıpların olduğu yapılan çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır (Jensen,2001; Akoh ve Xu,2002).

Bu çalışmada, ülkemize özgü bir ürün olan fındık yağı kullanılarak sn-1,3 spesifik lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimeleri ile bebeklerin büyümesi ve gelişimi açısından önemli özelliklere sahip, aynı zamanda çoklu doymamış omega-3 yağ asitlerinden olan, eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA)’nın öncü yağ asidi olan stearidonik asit ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların üretilmesi

amaçlanmıştır. Ayrıca, reaksiyon parametreleri olarak seçilen sıcaklık, süre ve substrat mol oranının elde edilen ürünler üzerindeki etkileri incelenerek, tepki yüzey yöntemi kullanılarak reaksiyon parametrelerinin modellenmesi gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, modelin doğruluğu optimum koşullarda küçük ölçekte gerçekleştirilen reaksiyonlar ile araştırılmıştır. Aynı zamanda bu koşullarda gerçekleştirilen daha büyük ölçekteki üretim ile elde edilen YY'nin yağ asidi kompozisyonları, sn-2 pozisyonundaki yağ asidi kompozisyonu, erime profili ve oksidatif stabilitesi belirlenmiştir.

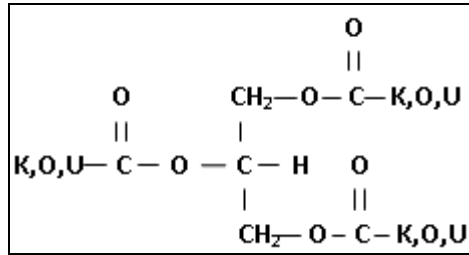
Ülkemiz için büyük öneme sahip olmasının yanı sıra sağlık açısından da önemli bileşikleri içeren fındık yağının çalışmada kullanılması ve anne sütü yağına benzer YY'lerin stearidonik asit ile zenginleştirilmesi bu alanda yapılan çalışmaların ilkini oluşturması açısından önemlidir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Yapılandırılmış Yağlar

2.1.1 Yapılandırılmış yağların tanımı

“Yapılandırılmış yağlar” gliserol molekülündeki yağ asidi kompozisyonu ve/veya pozisyonel dağılımı kimyasal/enzimatik sentez, hidrojenasyon, fraksinasyon veya genetik modifikasyon yöntemleri kullanılarak değiştirilmiş triaçilgliserol (TAG)’lerdir (Osborn ve Akoh, 2002; Bornscheuer ve diğ., 2003). Bu yağlar kısa zincirli, orta zincirli ve uzun zincirli doymuş veya doymamış yağ asitleri karışımını aynı gliserol molekülünde bulundurabilirler (Akoh ve diğ., 1998). Şekil 2.1’de gliserol molekülü ve ona bağlı olan üç yağ asidinin yer aldığı yapılandırılmış yağın şematik gösterimi yer almaktadır.



Şekil 2.1 : Yapılandırılmış yağların genel yapısı; K, O ve U sırasıyla kısa , orta ve uzun zincirli yağ asitlerini göstermektedir (Akoh ve diğ., 2002).

2.1.2 Yapılandırılmış yağların kullanım alanları

Yapılandırılmış yağlar, yağların erime davranışı ya da plastisite gibi fiziksel özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla gıda formülasyonları için dizayn edilebildikleri gibi, özel hastalıklar ve metabolik durumlar için besleyici ve tedavi edici amaçlar için de tasarlanabilirler. Bundan dolayı, yapılandırılmış yağlar çoğunlukla “yeni jenerasyon yağlar” ya da “nutrasötikler” olarak da adlandırılmaktadır (Akoh ve diğ., 1998). Yapılandırılmış yağların fonksiyonel gıda uygulamaları kapsamında yer alan uygulamaları plastik yağlar (margarin, modifiye tereyağı ve fırıncılık endüstrisinde kullanılan yarı-katı yağlar), kakao yağı alternatifleri ve kızartma yağları üretiminde yağların erime noktası, sürülebilirlik, erime davranışı, kristalizasyonun

karakterizasyonu, kızartma stabilitesi gibi özellikleri modifiye edilmiştir (Akoh ve diğ., 2002; Osborn ve Akoh, 2002). Tıbbi ve nutrasötik uygulamalar için tasarlanan yapılandırılmış yağlar, bebek formüllerinde ve enteral (ağızdan tüple beslenme) ve parenteral (damardan serumla beslenme) beslenmede yüksek kalori sağlaması amacıyla sn-2 pozisyonunda doymuş yağ asidi içerecek şekilde tasarlanırken; tüketicilerin yüksek miktarda yağ alımına bağlı risklere ilişkin farkındalığının artması sonucu oluşan pazar ile ortaya çıkan düşük kalorili yağlar ise uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin sınırlı emilinden veya kısa zincirli yağ asitlerinin düşük kalori değerinden yararlanılarak dizayn edilmektedir (Osborn ve Akoh, 2002). Çeşitli yöntemler kullanılarak üretilen ticari yapılandırılmış yağlar ve uygulamaları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir.

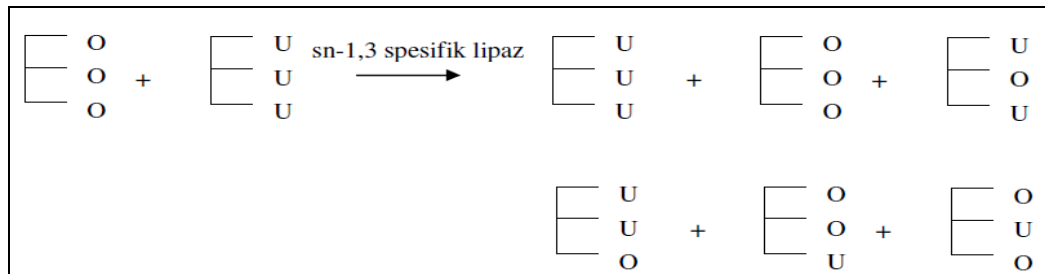
Çizelge 2.1 : Ticari yapılandırılmış yağların gıda ve tıbbi uygulamaları (Lee & Lee, 2006).

Marka	Yağ Asidi Bileşenleri	Uygulama Alanı	Üretici Firma
Benefat	C18:0 (yüksek miktar) ve C2:0, C4:0 veya C6:0	Kalorisi azaltılmış fırıncılık ürünleri, çikolata kaplamaları	Cultor Food Science Inc.
Betapol	C16:0 (%45)	Bebek formülleri	Loders Croklaan
Bohenin	C18:1 ve C22:0	Çikolata ve çikolata kaplama üretiminde temperleme yardımcısı ve köpük önleyici ajan	Fuji Oil Company Ltd.
Captex	C8:0/C10:0 (%60)ve C12:0 (%30) ya da C8:0/C10:0 (%40) ve C18:2 (%40)	Farmasötikler ve kozmetik endüstrisi	Abitec Corp.
Caprenin	C8:0, C10:0 ve C22:0	Şekerleme kaplama yağı	Procter & Gamble
Impact	Yüksek-laurik asit yağı ve yüksek linoleik asit yağı ile interesterifikasyon	Travma ya da ameliyat, sepsi ya da kanser hastaları için farmasötikler	Novartis Nutrition Corp.
Laurical	C12:0 (%40) ve doymamış yağ (C18:1, C18:2 ve C18:3)	Tıbbi besin ürünleri, şekerleme kaplamaları, kahve beyazlatıcıları, dolgu yağları	Calgene Inc.
Neobee	C8:0, C10:0 ve ÇDYA (n-6 ve n-3)	Tıbbi ve besinsel içecekler	Stepan Corp.
Structo-lipid	Uzun zincirli TAG (%63) ve orta zincirli TAG (%37)	Parenteral beslenme ve hastalar için hızlı enerji kaynağı	Fresenius Kabi

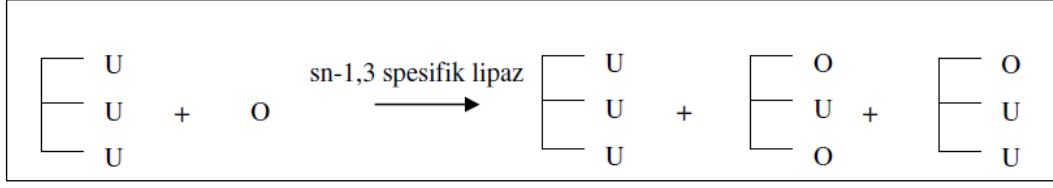
2.1.3 Enzimatik sentez yöntemi ile yapılandırılmış yağ eldesi

Doğal kaynakların kullanıldığı yeşil kimya ve doğal prosesler, çevresel ve sağlıksal kaygılardan ötürü günümüzde oldukça tercih edilmektedir. Yapılandırılmış yağların enzimatik sentezi lipit modifikasyonunda oldukça yeni bir kavramdır. Çoğunlukla, bu amaç için lipaz enzimleri kullanılmaktadır. Enzimlerin yer aldığı herhangi bir proses ve elde edilen ürünler doğal olarak nitelendirilmektedir. Bu nedenle enzimler, daha doğal ve daha az sentetik gıda ürünleri ve gıda katkıları talep eden tüketiciler tarafından kimyasal katalistlere tercih edilmektedir (Akoh, 1996; Akoh ve diğ., 2002).

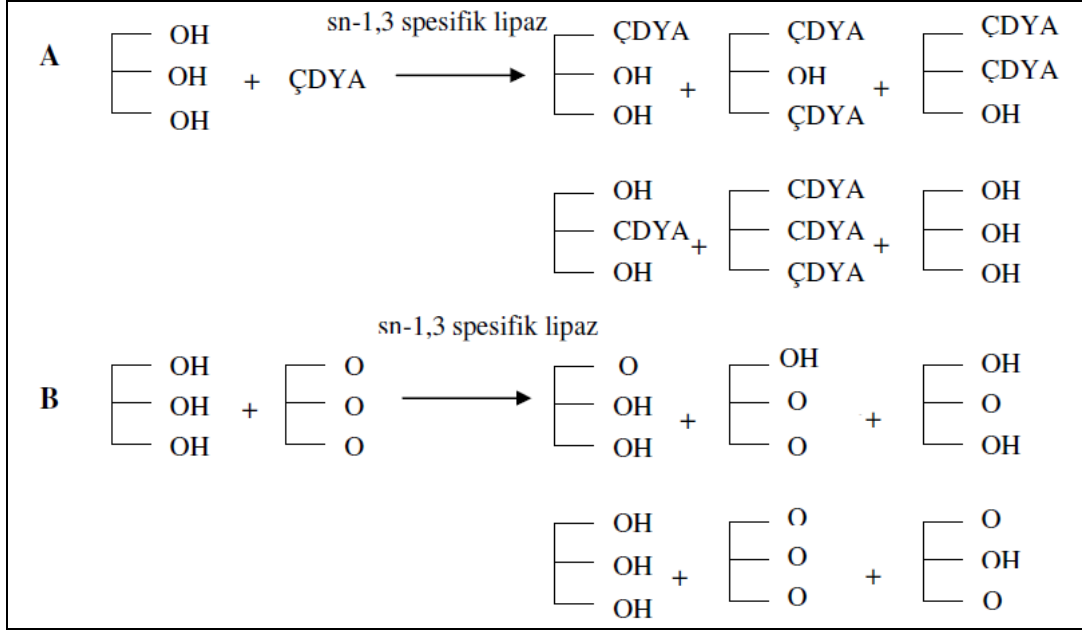
Kimyasal sentez ucuz bir yöntem olmasına karşın, seçici olmamasından dolayı son ürünlerdeki yağ asitlerinin pozisyonel dağılımı kontrol edilememektedir. Ayrıca, kimyasal sentez yönteminde sıcaklık, basınç ve pH gibi reaksiyon koşullarının oldukça yüksek değerlerde gerçekleşmesi sonucu çoklu doymamış yağ asitlerinin parçalanması ve çevre kirliliği gibi sorunlarla karşılaşmaktadır (Osborn ve Akoh, 2002; Bornscheuer ve diğ., 2003). Oldukça ılımlı reaksiyon koşullarına sahip olan enzimatik interesterifikasyon, kimyasal interesterifikasyona göre daha az çevresel kirliliğe yol açmaktadır (Bornscheuer ve diğ., 2003). İnteresterifikasyon reaksiyonları arasında transesterifikasyon, asidoliz ve alkoliz reaksiyonları ticari ilginin olduğu reaksiyonlardır. Transesterifikasyon açıl gruplarının iki ester arasındaki değişimi ile gerçekleşirken, asidoliz bir açıl grubunun, bir asit ve bir ester arasındaki transferi şeklinde gerçekleşmektedir. Diğer bir deyişle, yeni yağ asitlerinin TAG yapısına katılmasıdır. Alkoliz ise bir alkol ve bir ester arasında gerçekleşen esterleşme reaksiyondur (Willis ve Marangoni, 2007). Aşağıda yer alan Şekil 2.2, Şekil 2.3 ve Şekil 2.4'te sırasıyla transesterifikasyon, asidoliz ve alkoliz reaksiyonları gösterilmiştir.



Şekil 2.2 : *sn*-1,3 spesifik lipaz tarafından katalizlenen, orta zincirli yağ asitleri içeren bir TAG ve uzun zincirli yağ asitleri içeren bir TAG arasında gerçekleşen transesterifikasyon reaksiyonu (O: Orta zincirli yağ asidi (YA), U: Uzun zincirli YA) (Marangoni, 2002).



Şekil 2.3 : *sn*-1,3 spesifik lipaz tarafından katalizlenen, orta zincirli yağ asidi ile uzun zincirli yağ asitleri içeren bir TAG arasında gerçekleşen asidoliz reaksiyonu (O: Orta zincirli yağ asidi (YA), U: Uzun zincirli YA) (Marangoni, 2002).



Şekil 2.4 : Gliserol ve çoklu doymamış yağ asidi arasında (A) ve gliserol ile orta zincirli yağ asitleri içeren bir TAG arasında (B) gerçekleşen, *sn*-1,3 spesifik lipaz tarafından katalizlenen asidoliz reaksiyonları (O: Orta zincirli yağ asidi (YA), ÇDYA: Çoklu doymamış YA) (Marangoni, 2002).

2.2 Lipaz Enzimleri

Lipazlar (EC 3.1.1.3, triaçilgliserol açilhidrolaz) yağların hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar lipaz enzimi üretmektedirler. Günümüzde, bakteri ve küfler tarafından üretilen lipazlara olan ilgi artmaktadır. Çünkü, mikrobiyal lipazlar yüksek aktivite ve stabiliteye sahip olmaları, büyük ölçekte temin edilebilmeleri ve çeşitli reaksiyonları katalizleyebilmeleri gibi bir çok avantaja sahiptir (Akoh ve diğ., 2002; Hou, 2002).

Doğada çokça bulunan lipaz enzimleri, yapılandırılmış yağların üretiminde kullanılan direkt esterifikasyon, asidoliz ve alkoliz gibi reaksiyonları katalizlemektedir. Bu reaksiyonlarda, lipazların yağ asidi seçiciliğinden ötürü, son

üründeki yağ asitlerinin pozisyonel dağılımı kontrol edilebilmektedir (Osborn ve Akoh, 2002). Genetik mühendisliği, yönlendirilmiş evrim veya protein mühendisliği uygulamaları ile özelliklerinin geliştirilmesine olanak sağlayan lipazlar, tutuklanarak defalarca kullanılabilirler (Xu, 2000; Bornscheuer ve diğ., 2003).

Lipazların katalizlediği reaksiyonlar ile kako yağı ikameleri, düşük kalorili yağlar, anne sütü yağına benzer yapılandırılmış triaçilgliseroller, margarin yağları, kısmi açilgliseroller, modifiye balık yağı ürünleri ve çeşitli lipid ürünleri üretilebilmektedir (Xu, 2000; Şahin ve diğ., 2003).

2.2.1 Lipaz enzimlerinin etki mekanizması

Farklı kaynaklara ait lipazların yapıları incelendiğinde, hepsinin benzer üç boyutlu yapıya sahip olma eğilimi gösterdiği görülmüştür. Birçok lipazın amino asit dizilerinin karşılaştırılması sonucunda büyük farklılıklar içermelerine rağmen benzer biçimde katlandıkları ve benzer katalitik bölgeler içerdikleri gözlenmiştir.

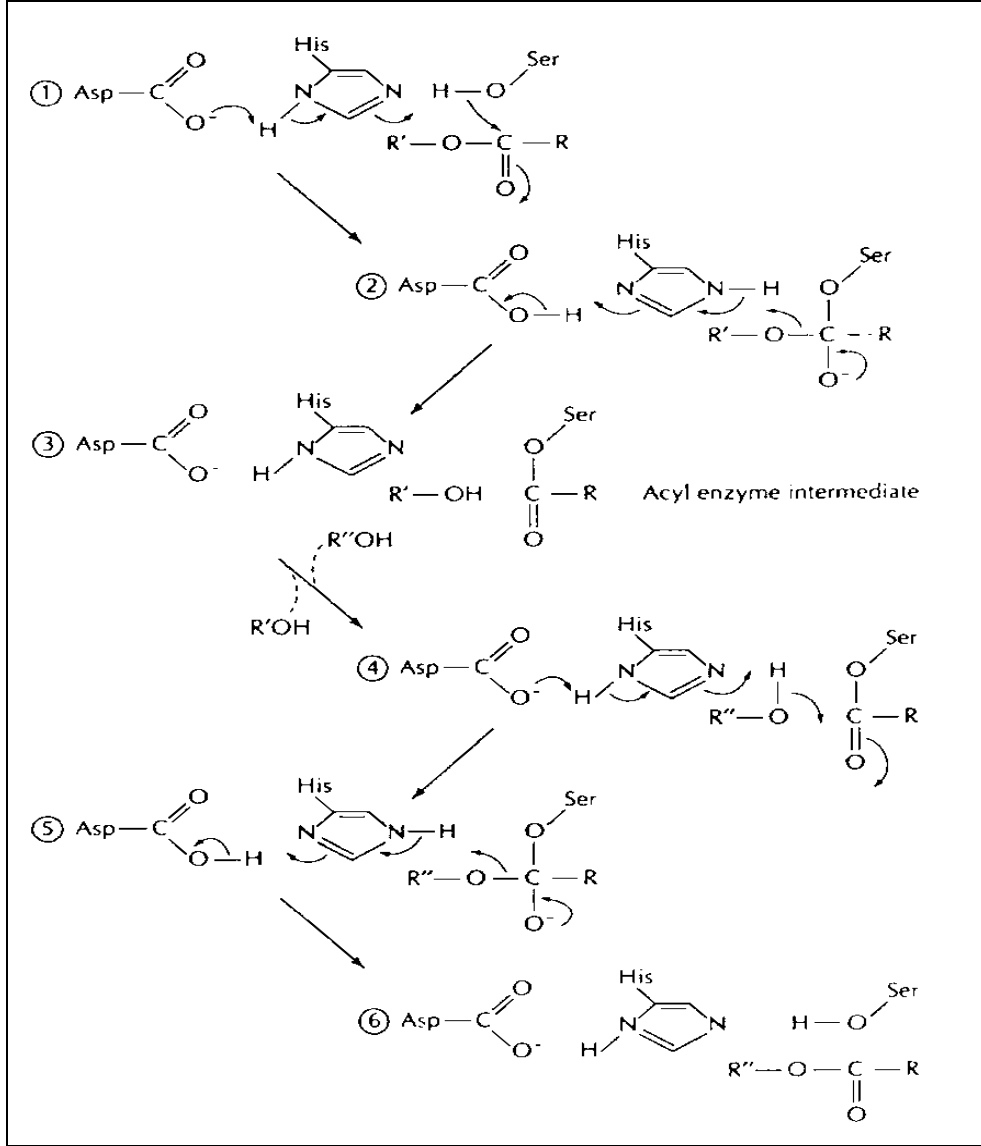
Çözelti içerisinde iken, lipazın aktif bölgesi sarmal bir parça ile kapatılmaktadır. Ancak, yağların veya organik çözücülerin varlığında bu sarmal kapağın ("lid") açıldığı, aktif bölgeyi içeren hidrofobik merkezin açığa çıktığı konformasyonel bir değişim olmaktadır (Willis & Marangoni, 2007). Şekil 2.5'te *Thermomyces lanuginosus*'a ait lipaz enziminin açık ve kapalı formu gösterilmiştir.



Şekil 2.5 : *Thermomyces lanuginosus* lipazının açık ve kapalı haldeki yapısı (Fernandez-Lafuente, 2010).

Lipazın yapısında meydana gelen bu konformasyonel değişim sonucunda aktif bölgede bulunan Asp/Glu-His-Ser (Asparajin/Glutamin-Histidin-Serin) katalitik üçlü grubunun açığa çıkması lipaz aktivasyonunu tetiklemekte ve serin amino asidinde bulunan hidroksil grubunun ester bağlarına nükleofilik atak yapmaktadır. Böylelikle, bir ester bağının hidroliz olması ve bir açıl-enzim ara ürününün oluşması ile

interesterifikasyon reaksiyonu başlatılır, devamında ise açıl değişimi ve yeni ester bağlarının oluşumu sonrasında yeni bir TAG molekülü oluşturulur (Akoh ve diğ., 1998, Camp ve diğ., 1998). Lipazların katalitik döngüsünde yer alan reaksiyonlar Şekil 2.6’da gösterilmiştir.



Şekil 2.6 : Lipaz enzimleri tarafından katalizlenen enzimatik interesterifikasyon reaksiyonlarının katalitik mekanizması (Marangoni, 2002).

2.2.2 Lipaz enzimlerinin seçiciliği

Lipaz enzimlerinin enzimatik esterifikasyonunu kimyasal esterifikasyondan farklı kılan başlıca avantajı enzim seçiciliğidir. Başlıca üç tür lipaz seçiciliği vardır, bunlar pozisyonel seçicilik, yağ asidi seçiciliği ve stereoseçiciliktir. Pozisyonel seçicilik ve yağ asidi seçiciliği, genellikle, sentetik TAG moleküllerinin kısmi hidrolizi ve ince

tabaka kromatografisi ile ayrılması sonrasında ürünlerin ekstraksiyonu ve analizi ile belirlenmektedir. Diğer metotlar ise hidroliz süresince üretilen yağ asitlerinin gaz kromatografisi analizi için metil esterlere dönüştürülmesini içermektedir (Willis ve Marangoni, 2007).

Pozisyonel Seçicilik

Pozisyonel seçicilik, lipaz enzimlerinin TAG molekülünün sn-1,3 pozisyonlarındaki ester bağlarına olan seçiciliği şeklindedir. Bu durum, sterik engellemeden ötürü lipazların TAG molekülünün sn-2 pozisyonuna etki edememesinden kaynaklanmaktadır. Sterik engelleme sn-2 pozisyonunda yer alan yağ asidinin lipaz enziminin aktif bölgesine girmesini önlemektedir. 1,3- spesifik lipazların kullanıldığı bir interesterifikasyon reaksiyonunda ilk olarak TAG, 1,2- ve 2,3-diaçilgliseroller (DAG), ve serbest yağ asitlerinin olduğu bir karışım üretilmektedir. Uzun süreli reaksiyonlardan sonra ise açıl göçü ve TAG molekülünün orta pozisyonunda yer alan yağ asitlerinin rastgele dağılımına izin veren 1,3-DAG oluşumu gerçekleşebilmektedir. *Aspergillus niger*, *M. miehei*, *Rhizopus arrhizus*, ve *Rhizopus delemar* lipazları sn-1,3 pozisyonlarına spesifik lipazlara örnektir (Willis ve Marangoni, 2007).

Stereoseçicilik

Stereoseçicilik, lipazların TAG molekülündeki sn-1 ve sn-3 pozisyonları arasındaki farkı ayırt edebilme özelliğidir (Hou, 2002). TAG molekülündeki sn-1 ve sn-3 pozisyonları sterik olarak birbirinden farklıdır; ve çok az sayıdaki lipaz bu iki pozisyon arasındaki ayrımı gözetmektedir. Stereoseçici lipazların katalizlediği reaksiyonlarda, 1. ve 3. pozisyonlar farklı hızlarda hidrolize olurlar. Stereoseçicilik, lipaz kaynağına ve açıl gruplarına göre belirlendiği gibi, aynı zamanda, arayüzeydeki yağ konsantrasyonuna da bağlı olabilmektedir. Zira arayüzeydeki substrat konsantrasyonundaki bir artış, sterik engellemeden ötürü enzim seçiciliğini düşürebilmektedir. Ayrıca, zincir uzunluğundaki farklılıklar da lipaz seçiciliğini etkileyebilmektedir. *Pseudomonas* türlerine ait lipazlar ile domuz pankreatik lipazı, belli açıl grupları hidrolize olduğu zaman stereoseçicilik özelliği göstermektedir (Willis ve Marangoni, 2007).

Yağ asidi seçiciliği

Lipazlar belirli yağ asitlerine, ya da daha genel olarak, bir yağ asidi sınıfına karşı seçici olabilirler. Bu tür lipazlar seçici olduğu yağ asitletinin gliserit esterlerini, gliserol yapısındaki pozisyonlarına bakmaksızın, hidrolize ederler. Yağ asidi seçiciliği gösteren lipazlardan olan *Penicillium roquefortii* lipazı ve prematür bebeklerdeki gastrik lipazı kısa zincirli yağ asidine karşı seçici olan lipazlardır. Ayrıca *G. candidum* lipazı ise *cis*-9-doymamış yağ asidine karşı seçicilik özelliği olan bir lipazdır. (Hou, 2002). Domuz pankreatik lipazı kısa zincirli yağ asitlerine karşı seçici iken, *Penicillium cyclopium* ise uzun zincirli yağ asitlerine seçici davranmaktadır. Ayrıca, *A. niger* ve *Aspergillus delemar* lipazları ise hem orta hem de kısa zincirli yağ asitlerine karşı seçicidir. Lipazların yağ asidi seçiciliği, tıbbi gıdalar için yapılandırılmış yağ üretmek, ve yağların besinsel özelliklerini geliştirmek amacıyla spesifik yağ asitleri ile zenginleştirmek için kullanılmaktadır (Willis ve Marangoni, 2007).

2.2.3 İnteresterifikasyon reaksiyonlarında lipaz aktivitesini etkileyen faktörler

2.2.3.1 Sıcaklık

Sıcaklık, lipaz aktivitesini etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Genellikle, artan sıcaklık miktarı interesterifikasyon hızını da arttırmakta; ancak çok yüksek sıcaklıklarda, enzim denatürasyonu nedeniyle reaksiyon hızı azalmaktadır. Bitkisel ve hayvansal kaynaklı lipazların ısıya olan dayanıklılıkları hücre-dışı mikrobiyal lipazlardan daha azdır. Enzimler için optimum sıcaklık enzim kaynağına göre değişkenlik göstermektedir. Çoğu tutuklanmış enzim için optimum sıcaklık aralığı 30°C-62°C arasında olmakla birlikte serbest enzimler için bu sıcaklık aralığı daha düşük olma eğilimindedir. Tutuklanmış lipazlar ısı bozunmaya karşı daha dayanıklıdır, çünkü tutuklama işlemi, enzim hareketini kısıtlayarak enzim denatürasyonunu önlemektedir (Camp ve diğ., 1998; Willis ve Marangoni; 2007).

Reaksiyon sıcaklığını arttırmak açıl katılımını artırabilir, fakat aynı zamanda, daha çok açıl göçü gözlenmektedir (Yang ve diğ., 2005). Açıl göçü, lipazlarca katalizlenen asidoliz reaksiyonlarının kaçınılmaz yan reaksiyonları olarak tanımlanmakta ve esas oluşum nedeni olarak ortamda bulunan diaçilgliseroller (DAG)'in varlığı gösterilmektedir (Yang ve diğ., 2003b). Esas olarak, sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında bulunan yağ asitlerinin sn-2 pozisyonuna (sn-2 pozisyonundaki açillerin sn-1 ve sn-3

pozisyonlarına göçmesi şeklinde de görülebilmektedir) göç etmesini ifade eden açıl göçü, anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ üretiminin gerçekleştiği çalışmalarda ise sn-2 pozisyonunda bulunan palmitik asit yüzdesindeki değişim olarak tanımlanmaktadır (Yang ve diğ., 2003a; Foresti ve Ferreira, 2010). Reaksiyon sıcaklığının yağ asidi katılımından çok açıl göçü üzerinde güçlü bir etki gösterdiği; reaksiyon sıcaklığının düşürülmesi ile açıl göçünün yüksek oranda baskılandığı belirtilmektedir.

2.2.3.2 Süre

Yüksek katılım oranını sağlamak ve üretim masraflarını minimize etmek için gerekli olan en kısa reaksiyon süresini belirlemek önemlidir (Senanayake ve Shahidi, 1999). Çünkü, uzun reaksiyon süreleri, açıl göçünü de beraberinde getirmektedir (Jennings ve Akoh, 1999). Bu nedenle, açıl göçünün en düşük oranda gerçekleşmesi için genellikle reaksiyon süreleri kısaltılmaktadır (Schmid ve diğ., 1998; Marangoni, 2002).

Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağlarda en önemli husus, anne sütü yağlarında da olduğu gibi, sn-2 pozisyonunda bulunan palmitik asittir. Esterifikasyon reaksiyonu boyunca açıl migrasyonu sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarında bir azalmaya neden olabilmektedir (Schmid ve diğ., 1998). Açıl göçünün düşük oranda gerçekleşmesi, üretilen TAG'ların sn-2 pozisyonundaki palmitik asidi muhafaza etmek ve aynı zamanda, bebeklerde optimal TAG ve kalsiyum emilimini sağlamak için oldukça önemlidir (Nielsen ve diğ., 2006).

2.2.3.3 Substrat mol oranı

Enzimatik reaksiyonlarda elde edilen ürünlerin TAG kompozisyonu, reaksiyon dengeye ulaştıktan sonraki substrat oranlarına bağlıdır. Yüksek substrat mol oranı, reaksiyon dengesini ürün yönünde ilerleterek açıl katılımını arttıracaktır (Yang ve diğ., 2003a).

Bazı lipazlar için, açıl verici olan serbest yağ asitlerinin yüksek konsantrasyonda olmasının asidoliz reaksiyonlarındaki lipaz aktivitesinde bir düşüşe neden olabileceği bildirilmiştir. Çünkü, asidoliz reaksiyonlarında, lipaz enzimlerinin katalitik bölgesinde bulunan kapağın ("lid") açılması, ortamda bulunan fazla miktardaki

serbest yağ asitlerince engellenebilir. Bu durum, bazı lipazların asidoliz reaksiyonlarındaki düşük katalitik aktivitesini açıklamaktadır (Yang ve diğ., 2003b).

Substrat miktarının fazla olması, ekonomik açıdan değerlendirildiğinde, maliyeti arttırdığı için avantaj sağlamamakla birlikte lipazların substrat inhibisyonuna da neden olabilmektedir. Yüksek mol oranının seçildiği durumlarda açıl göçünün azaltılması için reaksiyon süreleri kısaltılarak reaksiyon hızı artırılmalıdır (Jennings ve Akoh, 1999; Senanayake ve Shahidi, 2004).

Substrat mol oranının seçimi aynı zamanda saflaştırma maliyeti ve serbest yağ asitlerinin ya da açıl vericilerin buharlaştırma ve/veya distilasyon ile ayrılması ile de ilişkilidir. Bu nedenle, uygun bir substrat mol oranı seçmek gerekmektedir (Yang ve diğ., 2003a).

2.3 Yapılandırılmış Yağların Üretiminde Kullanılan Doymamış Yağ Asitleri

Yapılandırılmış yağların sentezinde çeşitli yağ asitleri kullanılmakta; yapılandırılmış yağdan en fazla yarar sağlamak amacıyla her bir yağ asidinin fonksiyon ve özelliklerinden yararlanılmaktadır. Yağ asitleri ve onların TAG molekülündeki pozisyonları YY'nin fonksiyonel ve fiziksel özelliklerini, metabolizmasını, ve sağlık üzerindeki yararlarını belirlemektedir. Bu nedenle, yağ asitlerinin fonksiyon ve metabolizmasını özetlemek uygun olacaktır (Akoh ve Kim, 2007).

Normal bir diyetle alınan tüm doymamış yağ asitleri hemen hemen omega-3, omega-6, ve omega-9 (n-3, n-6, n-9 veya ω -3, ω -6, ω -9 olarak da isimlendirilir) yağ asitlerinden oluşmaktadır (Watkins ve German, 2007). N-3 ve n-6 yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) olmakla birlikte, n-9 yağ asitleri ise çoğunlukla tekli doymamış yağ asitleridir (Lee ve Lee, 2006).

2.3.1 Omega-9 yağ asitleri

Omega-9 yağ asitleri veya tekli doymamış yağ asitleri kanola, zeytin, fıstık, ve yüksek-oleik ayçiçeği gibi bitkisel yağlarda oleik asit (C18:1n-9) olarak bulunmaktadır. Oleik asit insan vücudu tarafından sentezlenebildiği için esansiyel yağ asidi olarak kabul edilmemektedir. Bununla birlikte, vücutta plazma kolesterolünü düşürmede dengeli bir role sahiptir (Akoh ve Kim, 2007).

2.3.2 Omega-6 yağ asitleri

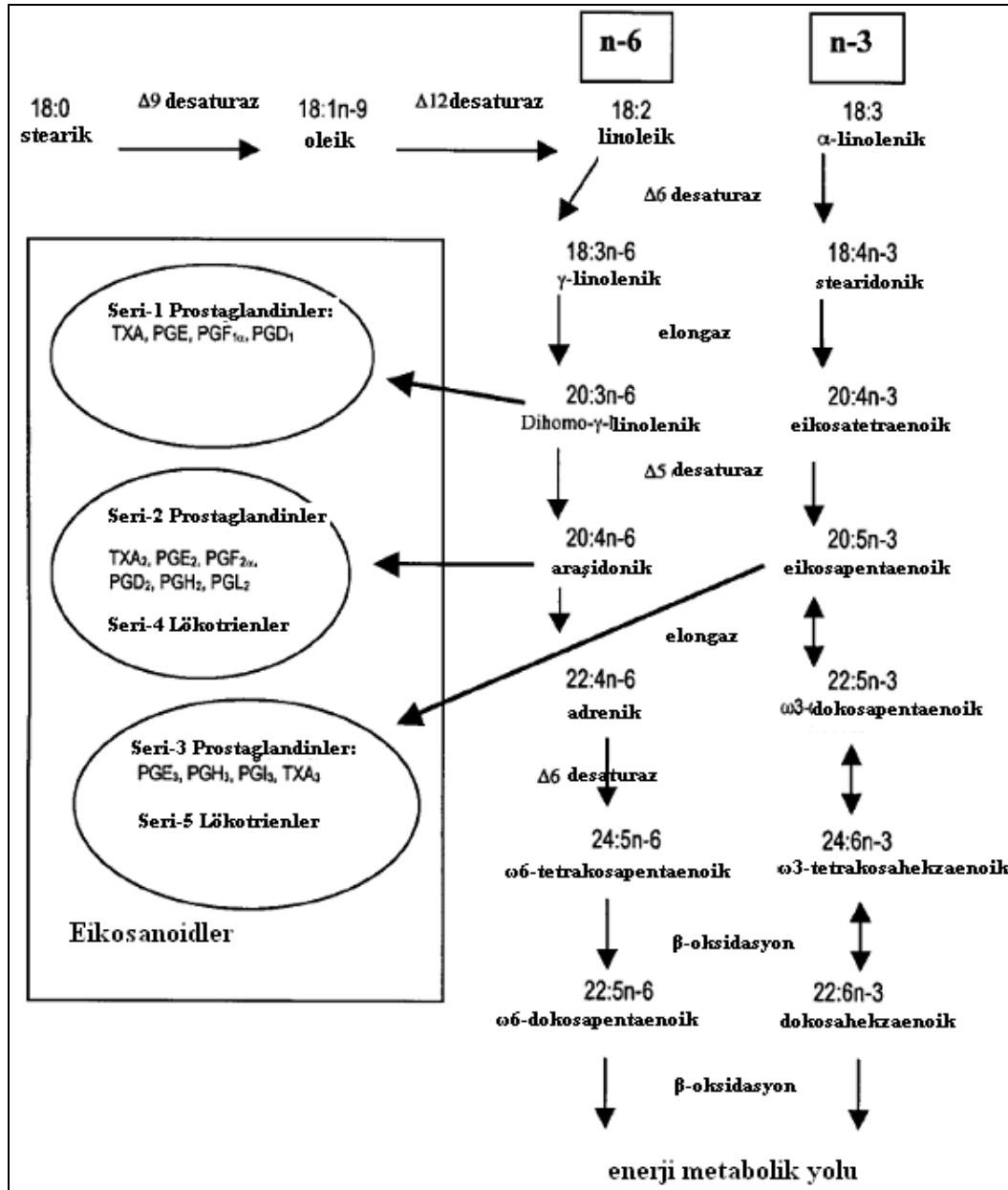
En yaygın n-6 yağ asidi olan linoleik asit (LA, C18:2n-6) başlıca birçok sebzenin yağında ve hindistan cevizi, kakao ve palm fıstıkları hariç birçok bitkinin tohumunda bulunmaktadır. Besinlerle LA alınmaması durumunda dermatit (deri iltihabı), deriden aşırı su kaybı, büyüme ve üreme bozuklukları, ve yaraların geç iyileşmesi gibi sorunlar gözlenmektedir (Akoh ve Kim, 2007). LA vücutta gama-linolenik asit (GLA, C18:3n-6), dihomo-gama-linolenik asit (DGLA, C20:3n-6) ve araşidonik asit (AA, C20:4n-6) gibi n-6 yağ asitlerine dönüşmektedir (Borsonelo ve Galduróz, 2008). N-6 serisi yağ asitleri insanlar ve memeliler tarafından sentezlenemediği için esansiyel yağ asitleri olarak kabul edilmektedir (Akoh ve Kim, 2007). Şekil 2.7’de n-6 ÇDYA’larına ait metabolik yol yer almaktadır.

GLA hücre zarında bulunan fosfolipitlerin önemli bir bileşenidir. Ayrıca, prostaglandin E1’in öncül molekülüdür. Şeker hastalığı, yüksek tansiyon, kanser, sikleroz, şizofreni, osteoporoz, kardiyovasküler hastalıklar, cilt hastalıkları, alerji, enflamatuvar hastalıklar gibi birçok hastalık üzerine olumlu etkisi olduğu belirtilmektedir (Huang ve Huang, 2006; Ahmed ve diğ., 2009). GLA doğal olarak bazı bitkilerin tohum yağlarında TAG fraksiyonu olarak bulunmaktadır. Eşekotu, hodan (boraj) yağı, frenküzümü yağı ve kendir tohumu yağı GLA bakımından zengin kaynaklardır (Guil-Guerrero ve diğ., 2010).

2.3.3 Omega-3 yağ asitleri

İki temel çoklu doymamış yağ asitleri sınıfından birisi olan omega- 3 yağ asitleri, iki ya da daha fazla çift bağ içeren, 18 veya daha fazla sayıdaki karbon atomundan oluşan bir yapıya sahiptir. Başlıca önemli n-3 yağ asitleri arasında α -linolenik asit (ALA, C18:3n-3), stearidonik asit (SDA, C18:4n-3), eikosapentaenoik asit (EPA, C20:5n-3) ve dokosahekzaenoik asit (DHA, C22:5n-3) yer almaktadır (Gebauer ve diğ., 2005).

N-3 ÇDYA’ları, vücuttaki biyoaktif moleküllerden olan prostaglandin, tromboksan ve lökotrienlerin öncül molekülleri oldukları için bebeklerin büyümesi ve gelişimleri açısından büyük öneme sahiptir. Bu biyoaktif moleküller birçok biyokimyasal proseste düzenleyici fonksiyona sahiptir (Koletzko ve diğ., 2001; Weber ve Mukherjee, 2005). Şekil 2.7’de n-3 ÇDYA’larına ait metabolik yol yer almaktadır.



Şekil 2.7 : N-6 ve n-3 ÇYD'larının metabolik yolu (Gebauer ve diğ., 2005).

N-3 yağ asitleri, öncül molekülleri olan ALA'dan biyosentezlenerek ya da besinsel kaynaklarından direkt olarak elde edilirler. Ancak, yetişkin bireylerde olduğu gibi, bebekler de ALA'nın sentezlenmesi için gerekli olan enzimlere sahip değildir. Bu nedenle, ALA, esansiyel yağ asidi olarak kabul edilir, ve bebeklerin büyümesi ve gelişimleri için besinsel kaynaklarından diyetle birlikte vücuda alınması gerekir (Weber ve Mukherjee, 2005; Agastoni, 2010). ALA çoğunlukla soya fasülyesi, keten tohumu yağı, yeşil yapraklı bitkilerin kloroplastında bulunmaktadır (Akoh ve Kim, 2007).

SDA, ALA'nın EPA ve DHA'ya dönüşümünde yer alan ara metabolittir (Whelan, 2009). Frenküzümü (*Ribes nigrum*), eşekotu (*Oenothera biennis*), bazı *Boraginaceae* ailesi üyeleri ile *Echium* cinsi bitkilerin yapraklarında ve tohumlarında bulunan SDA aynı zamanda, bazı alg ve küf türlerinde ve az miktarda da yağlı balıklarda bulunmaktadır. Bununla birlikte, şu anda geliştirilmekte olan ancak henüz ticari olarak piyasaya sunulmamış olan %20 oranında SDA içeren genetiği değiştirilmiş soya fasülyesi yağının da potansiyel SDA kaynağı olduğu belirtilmiştir (Tahvonen ve diğ., 2005; Miler ve diğ., 2007; Guil-Guerrero ve diğ., 2010). Diyetle alınan SDA'nın insan eritrosit ve plazma fosfolipitlerindeki EPA'ya dönüşümünün, diyetle alınan ALA'nın dönüşümünden daha verimli olduğu belirtilmektedir (Whelan, 2009). İnsan vücudunda SDA'nın EPA'ya dönüşüm miktarı yaklaşık olarak %30 oranındadır; bu oran ALA'nın EPA'ya dönüşüm miktarının 4-5 katı daha fazladır (Gray ve diğ., 2010). EPA ve DHA'nın bazı hastalıklar üzerindeki etkilerine benzer etkiler gösteren SDA, EPA ve DHA'nın kalp-damar hastalıkları, iltihaplanma, kanser ve nörolojik hastalıkları azaltmadaki etkisine de potansiyel olarak sahiptir. Ayrıca, SDA iltihap ve agregasyon önleyici etkiye sahip olan prostaglandin E₂'nin oluşumunu sağlayan siklooksigenaz enziminin substratı olarak da görev yapmaktadır (Coupland, 2008; Whelan, 2009).

EPA, vücutta bulunan bazı prostaglandin ve lökotrienlerin öncül molekülü olmakla birlikte, bağışıklık sistemi fonksiyonlarına da katkıda bulunur (Koletzko ve diğ., 2001; Lora ve Lewis, 2007). EPA, aynı zamanda, kalp-damar hastalıkları, şizofreni ve bazı kanser türlerinin tedavisinde de etkilidir (Ward ve Singh, 2005). DHA ise retina ve beyin hücrelerinde yüksek oranda bulunduğu için bebeklerde sinirsel, bilişsel ve görsel gelişim için oldukça önemli bir role sahiptir (Horrocks ve Yeo, 1999). Ayrıca, DHA'nın hücre membranı fonksiyonları, sinir sisteminin gelişimi, fotoreseptör farklılaşması, görme pigmenti olan rodopsinin aktivasyonu, oksidatif strese karşı korunma, çeşitli enzimlerin aktivasyonu ve iyon kanallarının fonksiyonu üzerine önemli etkilerinin bulunduğu bildirilmektedir (Lapillonne ve Jensen, 2009). Balık yağları, miktarı balık türlerine göre değişmesine rağmen EPA ve DHA bakımından zengin kaynaklardır. Morina balığı karaciğeri, somon balığı, alabalık, ringa balığı, sardalya ve hamsi %22'den fazla EPA ve DHA içermektedir (Akoh ve diğ., 1998; Russo, 2009). Ayrıca, mikroalgler de EPA ve DHA kaynakları arasında

yer almaktadır (Spolaore ve diğ., 2006). Buna ek olarak, yumurta sarısındaki fosfolipitler de DHA içermektedir (Weber ve Mukherjee, 2005) .

2.3.4 SDA'nın önemi

Uzmanlar bebek formüllerinin anne sütü yağ asidi kompozisyonuna benzeyecek şekilde dizayn edilmesi ve n-3 yağ asitleri içermesi hususunda hemfikirdirler (Senanayake ve Fichtali, 2006). Bebek beslenmesi açısından son derece önemli etkileri olan n-3 yağ asitleri gerekli enzimler olmadığı için bebeklerin vücutlarında sentezlenememektedir. Bu nedenle, n-3 yağ asitleri, öncül molekülleri olan ALA'dan sentezlenerek veya besinler yoluyla temin edilirler (Weber ve Mukherjee, 2005).

Bebekler ALA'yı EPA ve DHA'ya dönüştürebilmektedir, fakat bu oran düşük seviyelerde kalmaktadır. ALA'nın insan vücudunda DHA'ya dönüşüm oranı oldukça sınırlıdır; bu oran yetişkin bireylerde yaklaşık %5 iken, bebeklerde ise %1'den daha azdır (Senanayake ve Fichtali, 2006). Özellikle erken doğan bebeklerde ALA'nın n-3 ÇDYA'larına dönüşüm oranı vücudun ihtiyacını karşılayacak düzeyde değildir (Crozier, 1998). Balık yağları, miktarı balık türlerine göre değişmesine rağmen EPA ve DHA bakımından zengin kaynaklardır (Akoh ve diğ., 1998). Ancak, balık yağlarının besin takviyesi olarak kullanımı konusunda endişeler vardır. Bunun nedeni, balık yağlarının dioksinler, poliklorlu bifenil (PCB), civa vb. ağır metaller gibi çevresel kirlilikleri içermesidir. Hatta bu nedenlerden ötürü bazı ülkeler, başta Amerika Birleşik Devletleri (ABD) olmak üzere, balık yağlarının bebeklere ve çocuklara verilmesiyle ilgili para cezası uygulamaktadır (Ratlledge, 2004). Balık kaynaklarının gün geçtikçe azalması, balık yağlarının içerdiği çevresel kirlilikler, balık yağlarının tercih edilmeyen koku ve tada sahip olması ve yağların kalitesinin değişkenlik göstermesi balık yağları ile ilgili olumsuz düşünceler olup bu nedenle alternatif n-3 kaynaklarının araştırılması yönündeki eğilim artmıştır (Chávez-Servín ve diğ., 2009; Whelan, 2009).

Diyetle alınan SDA'nın insan eritrosit ve plazma fosfolipitlerindeki EPA'ya dönüşümü, diyetle alınan ALA'nın dönüşümünden daha fazladır (Whelan, 2009). İnsan vücudunda SDA'nın EPA'ya dönüşüm miktarı yaklaşık olarak %30 oranındadır; bu oran ALA'nın EPA'ya dönüm miktarının 4-5 katı daha fazladır (Gray ve diğ., 2010). SDA'nın DHA'ya dönüşüm oranı ise, ALA'nın DHA'ya dönüşüm oranı ile aynıdır (Brennan ve diğ., 2009). EPA ve DHA'nın bazı hastalıklar

üzerindeki etkilerine benzer etkiler gösteren SDA, EPA ve DHA'nın kalp-damar hastalıkları, iltihaplanma, kanser ve nörolojik hastalıkları azaltmadaki etkisine de potansiyel olarak sahiptir (Coupland, 2008). Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı, SDA balık yağlarından temin edilen EPA ve DHA'ya alternatif bitkisel kaynaklı bir yağ asidi olma potansiyeline sahiptir (Surette, 2004; Coupland, 2008).

2.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Hammaddeler

2.4.1 Fındık yağı

Fındık (*Corylus avellana* L.), *Betulaceae* ailesine ait olan ve dünya çapında en popüler kabuklu yemiş olmakla birlikte esas olarak Türkiye'de Karadeniz Bölgesi kıyılarında, batı Avrupa'da (İtalya, İspanya, Portekiz ve Fransa) ve Birleşmiş Devletlerin (US) bazı bölgelerinde yetişmektedir. Buna ek olarak, fındık Avustralya, Yeni Zelanda, Çin, Azerbaycan, Şili, İran ve Gürcistan gibi diğer bazı ülkelerde de yetiştirilmektedir (Alasalvar ve diğ., 2008). Dünya çapındaki toplam fındık üretiminin yaklaşık olarak %74'ünü gerçekleştiren Türkiye, dünyadaki en büyük fındık üreticisi konumundadır. Türkiye'yi ~%16 ile İtalya, ~%4 ile Birleşik Devletler (US) ve ~%3 ile İspanya takip etmektedir. Diğer ülkeler ise toplam fındık üretimine ~%3 oranında katkı sağlamaktadır (Alasalvar ve diğ., 2009). Ayrıca, Türkiye dünya fındık pazarının %80'ini elinde bulundurmaktadır. Bu nedenle, fındık Türkiye ekonomisi için oldukça önemlidir (Alasalvar ve diğ., 2003a).



Şekil 2.8 : Kabuklu ve kabuksuz fındık (Url-1).

Fındık yağı Türkiye ve diğer ülkelerde giderek popüler olmaya başlamakla birlikte yemeklerde, kızartmalarda, salata soslarında ve lezzet verici bileşenlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Alasalvar ve diğ., 2009). Fındık yağında baskın olarak bulunan yağ asidi %77,5-82,9 oranı ile oleik asittir. Fındık yağının içerdiği diğer başlıca yağ asitleri ise linoleik asit (%7,5-13,7), palmitik asit (%4,8-5,8) ve stearik asit (%1,9-3,1)'tir. Kalp sağlığına yararlı yağ asitleri olarak bilinen tekli ve çoklu

doymamış yağ asitleri ise fındık yağında bulunan toplam yağ asitlerinin yaklaşık olarak %92'sini oluşturmaktadır. Bu nedenle, fındık yağı diğer bitkisel yağlardan daha çok talep edilmektedir (Alasalvar ve diğ., 2008). Kabuklu yemiş türleri içinde fındık, özel yağ asidi kompozisyonuna sahip olması, bunun yanında tokoferol ve sterol içermesi bakımından insan sağlığı ve beslenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Fındık yaklaşık olarak %60 oranındaki yüksek yağ içeriğinden ötürü mükemmel bir enerji kaynağı sağlamaktadır. Birçok araştırma grubu, insan diyetine eklenen fındığın faydalarını rapor etmiştir. Bu etkiler fındık yağının tekli ve çoklu doymamış yağ asitlerince zengin yağ asidi profili ile ilişkilendirilmektedir. (Alasalvar ve diğ., 2003b).

2.4.2 Omega VegaTM yağ karışımı

Engerek otu (*Echium plantagineum*) yağı ve alg (*Schizochytrium sp.*) yağının karışımından oluşan Omega VegaTM (Preferred Nutrition Inc, Acton, ON) besin takviyesi amacıyla üretilen ve ticari olarak satışı bulunan bir yağ karışımıdır. Ürün ambalajı üzerinde yer alan etiket bilgilerine göre Omega Vega'nın içerdiği başlıca yağ asitleri ALA, SDA, GLA, DHA ve EPA'dır. Bunun yanı sıra, Omega Vega yüksek-oleik ayçiçek yağı, ayçiçek lesitini, tokoferol ve askorbil palmitat da içermektedir (Url-2).

DHA ve EPA'nın başlıca kaynağı balık yağları olmakla birlikte günümüzde *Schizochytrium sp.* mikroalginden tek hücre yağı olarak da elde edilebilmektedir. (Sanders ve Theobald, 2006).

Omega Vega yağ karışımının kaynaklarından biri olan engerek otu (*Echium plantagineum*) hodangiller (*Boraginaceae*) ailesine ait, Akdeniz ve Makaronezya orijinli bir bitkidir (Berti ve diğ., 2007). Ülkemizde mor engerek otu olarak da isimlendirilen ve çiçeklenme dönemi Mart-Eylül ayları arasında olan *Echium plantagineum* bitkisi tarlalarda, kıyı kesimlerde ve çorak yerlerde yetişmektedir (Karaca, 2008). Şekil 2.9'da *Echium plantagineum* bitkisine ait görüntüler yer almaktadır. *Echium* tohumları %9-16 oranında SDA içermekle birlikte aynı zamanda GLA ve ALA da içermektedir. *Echium* yağı ekzema, akne ve diğer cilt hastalıklarının tedavisi için ilaç endüstrisinde, ve kozmetik ve kişisel bakım ürünleri endüstrisinde birçok potansiyel kullanım alanına sahiptir. *Echium* Doğu

Avustralya’da istilacı ot olarak bilinmesine rağmen Birleşik Krallık (UK)’ta ve Avrupa’da ticari olarak yetiştirilmektedir (Berti ve diğ., 2007).



Şekil 2.9 : Engerek otu (*Echium plantagineum*) (Url-3; Url-4).

2.5 Anne Sütü

2.5.1 Anne sütündeki yağların yapısı ve bileşimi

Yaşamlarının ilk aylarındaki beslenmeleri, büyüme ve gelişimleri açısından kritik öneme sahip olan bebekler için en iyi gıdanın anne sütü olduğu Dünya Sağlık Örgütü (“WHO”) (Url-5) ve Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu (“UNICEF”) (Url-6) tarafından da belirtilmektedir. Anne sütü bebek tarafından kolay sindirilebilen, emilebilen ve iyi tolere edilebilen temel besinler ile koruyucu antikorları dengeli bir oranda sağlamaktadır. Ayrıca, bebeğin besinlerden aldığı enerjinin %50-60 kadarı anne sütünde bulunan yağlar tarafından karşılanmaktadır (Akoh ve Xu, 2002). Anne sütü %3-5 oranında yağ içermekte ve yağların %98’den fazlasını triaçilgliseroller (TAG) oluşturmaktadır (Jensen, 2001). Emzirme dönemi, doğum sayısı, gebelik yaşı, beslenme, metabolik rahatsızlıklar ve coğrafi bölge ve mevsimsel farklılıklar gibi çeşitli faktörler anne sütü yağ asidi bileşimini etkilemektedir (Koletzko ve Rodriguez-Palmero, 1999; Schmeits ve diğ., 1999). Ancak, değerlendirilen tüm anne sütlerinde toplam yağ asitlerinin %20-25’ini doymuş yağ asidi olan palmitik asit (C16:0) ve %40’ını tekli doymamış yağ asidi olan oleik asit (C18:1n-9) oluşturmaktadır. Anne sütünde bulunan palmitik asidin yaklaşık olarak %70’i TAG molekülünün sn-2 pozisyonunda bulunurken, doymamış yağ asitleri çoğunlukla sn-1 ve sn-3 pozisyonlarında yer almaktadır. Aşağıda yer alan Çizelge 2.2’de 13 farklı kaynaktan alınan anne sütü yağ asidi bileşimi detaylı olarak gösterilmiştir.

Çizelge2.2 : Anne sütü yağ asidi kompozisyonu (Weber ve Mukherjee, 2005).

Yağ asidi ^b (%)	Anne Sütü Yağı												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
10:0	5,4 ^c	1,0	1,4	1,2	1,0	1,5	44,3 ^c	0,9	1,1	<0,1	2,6		1,2
12:0		4,4	5,7	5,2	4,4	7,3		4,7	4,9	4,3	6,9		5,5
14:0	5,7	6,3	6,1	6,9	6,3	11,4		5,5	6,2	4,7	8,0		7,5
16:0	29,9 ^c	22	18,3	21,6	22	24,1		18,6	19,8	19,3	22,7		25,9
18:0		8,1	6,2	7,6	8,1	5,4		7,2	7,2	8,0	5,8		7,1
16:1c9		3,3	2,3	2,2	3,3	3,5				2,6	2,3		2,6
18:1c9	35,5	31,3	32,7	32,2 ^d	31,3	32,6	31,5	33,6	35,0	33,2	26,7		33,2
18:2n-6	15,6	10,9	10,5	14,7	10,9	10,5	11,3	14,6	13,3	15,6	14,1	10,2	11,8
18:3n-3	1,0	1,0	1,2	0,7	1,0	0,6	0,9	1,2	1,0	1,1	0,7	0,7	0,6
20:4n-6	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5	0,1	0,1	0,5	0,4	0,5	1,0	0,4	0,2
20:5n-3	0,3 ^e	0,1	<0,1	<0,1	0,1		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,05	<0,1
22:6n-3		0,3	0,1	0,3	0,3		0,2	0,2	0,2	0,2		0,2	0,1
Toplam yağ^a (g/kg)	36	34,2				40,3						41	48

^a~%98'i TAG'dan oluşmaktadır.

^bYağ asitleri karbon atomu sayılarına göre gösterilmiştir.

^cToplam doymuş yağ asidi (sırasıyla 10:0 + 12:0 ve 16:0 18:0).

^d18:1 izomerleri.

^eToplam 20:5n-3 + 22:6n-3 yağ asidi.

2.5.2 Anne sütü yağının bebek beslenmesindeki rolü

Yağların insan vücudundaki sindirimi esnasında lipaz enzimleri TAG'leri hidrolize ederek sn-1 ve sn-3 pozisyonlarındaki yağ asitlerini serbest hale getirirler. Serbest yağ asitleri ile hidroliz sonrası oluşan monoasitgliseroller (MAG) ince bağırsakta emilir. Ancak, uzun zincirli yağ asitlerinin (C12:0'dan C18:0'a kadar olanlar) emilimi, orta zincirli yağ asitleri (C6:0'dan C10:0'a kadar olanlar) ve doymamış yağ asitlerinin emilimi kadar kolay gerçekleşmemektedir. Bunun nedeni uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin kalsiyum iyonları ile etkileşip, çözünmeyen kalsiyum sabunları oluşturarak vücut dışına atılması ile açıklanmaktadır. Bu durum kalsiyum iyonu ve yağ emiliminin azalmasına neden olmaktadır (Bass ve Chan, 2006). sn-2 pozisyonunda bulunan palmitik asit ise sabunlaşmayarak veya tümü vücuttan atılmayarak emilmektedir. Çoğu bebek formülü anne sütündeki yağ profilini içermekle birlikte aynı TAG yapısına sahip değildir. Bebek formüllerinde kullanılan yağ karışımlarındaki palmitik asit ağırlıklı olarak sn-1 ve sn-3 pozisyonunda bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada palmitik asit içeriği yüksek fakat TAG molekülündeki yeri spesifik olarak tanımlanmamış formüllerle beslenen bebeklerde kalsiyum emiliminin %6, anne sütüyle beslenen bebeklerde ise bu oranın %51 olduğu ortaya çıkmıştır (López-López ve diğ., 2001). Bu bakımdan anne sütünün

benzersiz yağ asidi yapısı bebeklerin büyümelerinde spesifik ve önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Jensen,2001; Akoh ve Xu,2002).

2.5.3 Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağlar üzerine yapılan çalışmalar

Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağlar ile ilgili birçok bilimsel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar kullanılan enzimler, yağ kaynakları ve deney parametreleri (substrat-mol oranı, reaksiyon süresi ve sıcaklığı vb.) açısından farklılıklar içermektedir (Willis ve Marangoni, 2007).

Literatürde yer alan çalışmalardan ilki Christensen ve Holmer (1993) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada ilk olarak, emzirme döneminin birinci ve üçüncü haftası boyunca 5 kadından toplanan anne sütleri analiz edilerek yağ asidi kompozisyonları belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında ise *Rhizomucor miehei* lipaz enzimi kullanıldığı enzimatik reaksiyonlar ile süt yağının yapısı değiştirilerek başlıca %43,52 oleik, %22,5 palmitik, %10,76 linoleik asit, %0,31 EPA ve %0,13 DHA ve sn-2 pozisyonunda %34,96 palmitik, %31,48 oleik, %11,74 miristik asit bulunan TAG ürünü elde edilmiştir. Çalışma sonucunda üretilen YY'nin hem yağ asidi kompozisyonu hem de TAG molekülündeki YA'ların pozisyonel dağılımı açısından anne sütü yağına benzediği ve üretilen bu YY'nin bebek formüllerinde kullanımının uygun olduğu belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada ise substrat olarak tripalmitin ve düşük erüştik asitli kolza yağı serbest yağ asitlerinin kullanıldığı enzimatik asidoliz reaksiyonları sonucunda anne sütü yağına benzer YY üretimi mümkün olmuştur. Hem Lipozyme IM 20 ticari lipazı hem de *Carica papaya* bitkisinden elde edilen lipaz enziminin kullanıldığı enzimatik reaksiyonlar, reaksiyon ürünlerinin karışımının manyetik karıştırıcı ile sağlandığı çözücüsüz ortamda 60°C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında hekzan içine alınan numunelerin yağ asitleri bileşimi gaz kromatografisi cihazı ile belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyonun 6 saat sonrasında Lipozyme IM 20 ticari lipazı ile %75 palmitik asit, %20 oleik asit ve %5 linoleik asit, papaya lateks enzimi ile %60 palmitik, %25 oleik ve %10 linoleik asit içeren TAG ürünü elde edilmiştir (Mukherjee ve Kiewitt, 1998).

Literatürde yer alan başka bir çalışmada ise ilk aşamda balık yağı ve tripalmitinin kullanıldığı ve *Rhizopus delemar* enzimi tarafından gerçekleştirilen alkoliz reaksiyonu ile >%95 saflıkta 2-mono palmitin (2-MP) elde edilmiştir. Çalışmanın

ikinci aşamasında ise ilk aşamada saflaştırılan 2-MP'nin oleik asit ile esterifikasyonu n- hekzan içeren ortamda, Lipozyme IM veya *Rhizopus delemar* katalizörü varlığında gerçekleştirilmiş ve reaksiyon sonucunda 1,3 oleol-2-palmitol gliserol (OPO) ürünü elde edilmiştir. Lipozyme IM enziminin katalizlediği reaksiyonlar ile üretilen OPO ürününün veriminin %70 olduğu ve sn-2 pozisyonunda %92 palmitik asit içerdiği; *Rhizopus delemar* ile üretilen OPO ürününün veriminin ise %72 olduğu ve sn-2 pozisyonunda %94 palmitik asit içerdiği belirtilmiştir (Schmid ve diğ., 1998)

Tripalmitin ve araşidonik asitin (AA) substrat olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise sn-1,3 spesifik *Rhizopus delemar* lipazı tarafından katalizlenen ve 40°C'de 24 saatlik karıştırma ile gerçekleşen asidoliz reaksiyonları sonucunda 1,3-araşidonil-2-palmitol-gliserol (APA) ürünü elde edilmiştir. Ürünün sn-1,3 ve sn-2 pozisyonlarında bulunan AA miktarı sırasıyla %56,9 ve %3,2 olarak bulunmuştur. Ayrıca, yüksek performanslı sıvı kromatografisi sonuçlarına göre enzimatik reaksiyonlar ile elde edilen YY'deki APA miktarının %75,9 olduğu belirtilmiştir (Shimada ve diğ., 2000).

Literatürde yer alan diğer bir çalışmada Yang ve diğ. (2003a), domuz yağı ile soya yağı asitlerinin kullanıldığı, Lipozyme RM IM lipaz enziminin katalizlenen asidoliz reaksiyonları sonucunda anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ elde etmişlerdir. Öncelikle soya yağından yağ asitleri sabunlaştırılarak elde edilmiş, ve 1'er gram domuz yağı ve soya yağı serbest yağ asitleri kullanılarak Lipozyme RM IM lipaz enzimi katalizörlüğünde çözücüsüz ortamda asidoliz reaksiyonları gerçekleşmiştir. Reaksiyon sıcaklığı, enzim miktarı, su miktarı, substrat oranı ve sürenin reaksiyona etkisinin incelendiği bu çalışmada enzimatik modifikasyonun anne sütü yağı benzeri yapılandırılmış yağ üretimi bakımından uygulanabilirliğini tespit etmek amacıyla sürenin 1 saat, sıcaklığın 61°C, mol oranının (domuz yağı:yağ asitleri) 1:2,4 olduğu, enzim miktarının toplam substrat miktarının %13,7 kadar olduğu ve su miktarının %3,5 olduğu koşullarda büyük ölçekte (10 kat arttırma) üretim yapılmıştır. Bu koşullar altında elde edilen TAG ürününün sn-2 pozisyonundaki palmitik asit içeriğinin %71,1 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu ürünün Çinli annelerin süt yağına benzer olduğu belirtilmiştir.

Yang ve diğ. (2003b) yaptıkları bir çalışmada tripalmitin EPA ve DHA ile zenginleştirilmesi ile anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ üretimi gerçekleştirilmiştir. YY üretimi, Lipozyme TL IM enzimlerinin katalizlediği, sıcaklığın 60°C olduğu ve 50ml'lik erleninde 250 rpm karıştırma hızı ile gerçekleşen

interesterifikasyon reaksiyonları sonrasında mümkün olmuştur. Bununla birlikte, reaksiyon parametreleri olarak seçilen süre, substrat mol oranı ve enzim miktarı Tepki Yüzey Yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonrasında optimum koşul olarak bulunan 5 mol/mol substrat mol oranı, %20 enzim miktarı ve 20 saatlik reaksiyon süresinde gerçekleşen enzimatik reaksiyon ile elde edilen üründe %42 oranında EPA ve DHA ile zenginleştirme sağlanmıştır (Yang ve diğ., 2003b).

Yapılan başka bir çalışmada, tripalmitin, fındık yağı ve stearik asit arasında gerçekleşen enzimatik asidoliz reaksiyonu Lipozyme RM IM enzimi tarafından katalizlenmiştir. Mol substrat oranı, sıcaklık ve sürenin reaksiyon parametreleri olarak seçildiği bu çalışmada en yüksek oleik asit katılımının (%47,1) ve en yüksek oleik asit/palmitik asit oranının elde edildiği reaksiyon sıcaklığı 65°C, reaksiyon süresi 24 saat ve mol substrat oranı 1:12:1.5 (tripalmitin:fındık serbest yağ asidi:stearik asit) olarak bildirilmiştir. Ayrıca, elde edilen anne sütüne benzer yapılandırılmış yağların bebek formüllerinde kullanılma potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (Sahin ve diğ., 2005a).

Sahin ve diğ. (2005b) tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise tripalmitin, fındık yağı serbest yağ asitleri ve GLA'nın kullanıldığı, Lipozyme RM IM ve Lipozyme TL IM enzimlerince katalizlenen interesterifikasyon reaksiyonları ile anne sütü yağına benzer GLA ile zenginleştirilmiş YY'ler sentezlenmiştir. Çalışmada kullanılan her iki enzimin katılım oranı üzerindeki etkisi araştırılmış ve substrat ml oranı, reaksiyon sıcaklığı ve süresi olarak seçilen parametreler için Tepki Yüzey Yöntemi kullanılarak reaksiyon koşulları optimize edilmiştir. %10 GLA ve %45 oleik asit katılımı hedeflendiği optimum koşullar Lipozyme RM IM lipazı 14,8 mol/mol (toplan YA/trpalmitin), 55°C ve 24 saat, ve Lipozyme TL IM lipazı için 14 mol/mol (toplan YA/trpalmitin), 55°C ve 24 saat olarak bulunmuştur. Her iki enzimin de GLA ve oleik asit katılımı üzerinde benzer etkiler gösterdiği, ve her iki enzimin de kullanılarak üretilecek olan GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların bebek formüllerine katılabileceği belirtilmiştir.

Başka bir çalışmada ise domuz yağı ve soya yağı serbest yağ asitlerinden büyük ölçekli annesütü yağına benzer yapılandırılmış yağ üretimi için dolgulu yatak biyoreaktörü kullanılmış ve elde edilen ürünler kısa yollu distilasyon ünitesi ile saflaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, üretim süresinin C18:2 ve C18:3 yağ asitleri

katılımını ya da sn-2 pozisyonundaki açıl göçünü etkilemediği gözlenmiştir. Ayrıca, elde edilen anne sütü yağına benzer YY YA kompozisyonu, antioksidan miktarı ve oksidatif stabilite açısından ticari olarak bulunan anne sütü yağına benzer YY olan Betapol-45 ile karşılaştırılmıştır. Yapılan bu karşılaştırmaya göre enzimatik reaksiyon ile elde edilen YY'nin stabilitesinin ticari bitkisel yağ karışımlarına, domuz yağına ve ticari anne sütü yağına benzer YY'lere göre oksidatif stabilitesinin düşük olduğu; bunun nedeninin ise antioksidanların üretim sırasında ayrılmış olabileceği belirtilmiştir (Nielsen ve diğ., 2006).

Diğer bir çalışmada ise tripalmitin hem oleik asit ile hem de metil oleat ile *Candida rugosa* LIP1 lipazının katalizlediği transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanılmış ve çalışma sonucunda palmitik ve oleik asit içeren anne sütüne benzer YY üretilmiştir. Çalışmada, ayrıca reaksiyon süresi, reaksiyon sıcaklığı ve substrat mol oranının oleik asit katılımına etkisi incelenmişle birlikte ticari Lipozyme RM IM lipazı ile LIP1 lipazı karşılaştırılarak Lipozyme RM IM lipazı ile elde edilen YY'lerin anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ üretiminde kullanımının daha uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Srivastava ve diğ., 2006).

Şahin ve diğ. (2006) yaptıkları bir çalışmada, tripalmitin, fındık yağı serbest yağ asitleri ve omega-3 yağ asidi konsantresi arasında gerçekleşen enzimatik asidoliz reaksiyonunda katalizör olarak Lipozyme RM IM lipazı kullanmışlardır. Tepki yüzey yöntemi ile reaksiyon koşulları optimize edilmiş ve toplam EPA ve DHA katılımının %5 ve oleik asit katılımının %40 olarak hedeflenen ürünü üretebilmek için gerekli optimum reaksiyon süresi 24 saat, reaksiyon sıcaklığı 55°C ve mol substrat oranı 12,4 mol/mol olarak bulunmuştur. Elde edilen model yapılan deneylerle doğrulanmış ve bu modele göre sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarı %76,6 olan anne sütüne benzer yapılandırılmış yağ üretilmiştir.

Maduko ve diğ. (2007) yapılan bir başka çalışmada, tripalmitin, hindistancevizi yağı aspir yağı ve soya yağını Lipozyme RM IM enziminin katalizlediği interesterifikasyon reaksiyonlarında kullanmışlardır. Substrat mol oranı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığının sn-2 pozisyonunda bulunan palmitik asit üzerindeki etkisinin araştırıldığı bu çalışmada Tepki Yüzey Yöntemi kullanılarak optimum reaksiyon koşulları elde edilmiştir. sn-2 pozisyonunda bulunan palmitik asit için hedeflenen %40 oranının elde edildiği optimum koşullar 3 mol/mol (toplam

yağ/tripalmitin), 14,4 saat ve 55°C ve 2,8 mol/mol (toplam yağ/tripalmitin), 19,6 saat ve 55°C oluğu bulunmuştur.

Literatürde yer alan anne sütü yağına benzer YY üretimine yönelik yapılan diğer bir çalışmada ise palm yağı, palm çekirdeği yağı, zeytinyağı, ayçiçeği yağı ve balık yağı karışımı kullanılarak Lipozyme TL IM lipazının yer aldığı intersterifikasyon reaksiyonları sonucunda anne sütü yağına benzer yapıda TAG içeren ürün elde edilmiştir (Karabulut ve diğ., 2007).

Maduko ve diğ. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada tripalmitin ile bitkisel yağ karışımı ve balık yağı arasında gerçekleşen Lipozyme RM IM lipazı tarafından katalizlenen intersterifikasyon reaksiyonları ile anne sütüne benzer yapılandırılmış yağlar üretilmiştir. Çalışmada kullanılmak üzere hindistancevizi yağı, aspir yağı (1.karışım, K1) ve soya yağı ile hindistancevizi yağı, aspir yağı, soya yağı ve balık yağı (2.karışım, K2) belli oralarda karıştırılarak iki farklı yağ karışımı elde edilmiştir. Biyoreaktörde gerçekleştirilen enzimatik tepkimelerde substrat mol oranı 1:3 (tripalmitin K1 ve tripalmitin/K2), reaksiyon süresi 14,4 saat ve reaksiyon sıcaklığı 55°C olarak ayarlanmıştır. Gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonrasında her iki yağ karışımının da sn-2 pozisyonunda yer alan palmitik asit miktarında artış gözlemlendiği ve elde edilen YY'lerin anne sütü yağ asidi kompozisyonuna yakın bir yağ profili içerdiği belirtilmiştir.

Bir başka çalışmada ise yetersiz kullanıma sahip amarant yağı, enzimatik intersterifikasyon tekniği ile sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarı artırılarak ve DHA ile zenginleştirilerek modifiye edilmiştir. Novozyme 435 lipazı sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarının artırıldığı, Lipozyme RM IM lipazı ise DHA katılımının gerçekleştiği enzimatik reaksiyonlarda kullanılmıştır. %33,9 palmitik asit, %2,8 stearik asit, %23,3 oleik asit, %37,3 linoleik asit ve %1,9 DHA içeren elde edilen yapılandırılmış yağın fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiş, ve kısmi yağ ikamelerinde veya süt bazlı bebek formüllerinde tamamlayıcı olarak kullanıma potansiyeli olduğu belirtilmiştir (Pina-Rodriguez ve diğ., 2009b).

Li ve diğ. (2010)'ın yaptığı bir çalışmada, süt yağının kolza yağı ve soya yağı yağ asitleri karışımı ile asidolizi sonrasında anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ elde etmişlerdir. Biyokataliz olarak Lipozyme RM IM enziminin kullanıldığı çalışmada enzimatik reaksiyonlar 65°C sıcaklıkta, pilot ölçekteki dolgu enzim

yatak reaktörde gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 2 hafta içinde 150 kg reaktan elde edilmiş ve kısa yollu distilasyon ile ürünler saflaştırılmıştır. Reaktanların içerdiği serbest yağ asitlerinin (SYA) uzaklaştırılmasının ardından deodorizasyon işlemine tabi tutulan yapılandırılmış yağ fraksiyonunun büyük oranda TAG, %4 oranında DAG ve %0,6 SYA içerdiği saptanmıştır. Bu fraksiyonun gaz kromatografisi cihazı ile analizlenmesi sonrasında sn-2 pozisyonunda %46 palmitik asit içerdiği tespit edilmiştir. Çalışmanın deney hayvanları ile yapılan bölümünde ise deney fareleri anne sütü yağı benzeri yapılandırılmış yağ ve çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) içeren yağ karışımı, referans yağ (süt yağı, kolza yağı, ayçiçeği yağı ve palm stearin karışımı) ve referans yağ ve ÇDYA karışımı içeren yağ ile beslenmişlerdir. Çalışma sonucunda, anne sütü yağına benzer YY'nin yağ emilimini arttırdığı ve ÇDYA takviyesinin kalsiyum emilini arttırdığı yargısına varılmıştır.

Tecelão ve diğ. (2010) tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise tripalmitinin hem oleik asit hem de omega-3 yağ asitleri ile interesterifikasyonu sonucunda anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ eldesi mümkün olmuştur. Ayrıca, çalışmada kullanılan Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM, Novozym 435 ve *Candida parapsilosis* lipaz enzimleri karşılaştırılmıştır. 60°C sıcaklıkta, 24 saat süreyle kesikli tipteki reaktörde gerçekleşen enzimatik reaksiyonlar ile elde edilen ürünler analiz edildiğinde en yüksek oleik asit katılımının (%27) tüm ticari lipazlarca katalizlenen reaksiyonlar ile elde edildiği; en yüksek omega-3 katılımının (%21,6) Novozyme 435 ile gerçekleşen reaksiyonlar sonrasında elde edildiği bulunmuştur.

Yapılan diğer bir çalışmada, palm stearin (PS) ile hem palm stearinden elde edilen SYA'nın hem de ticari palmitik asitin (PA) asidolizi gerçekleştirilerek anne sütü yağına benzere TAG ürünü elde edilmiştir. Bununla birlikte, lipaz türü (Novozyme 435, QLC, QLM ve QLC lipazları), sıcaklık ve solvent miktarının asidoliz reaksiyonları üzerindeki etkisi karıştırılmalı tank tipi reaktörde yapılan reaksiyonlar ile incelenmiştir. Reaksiyonlar sonucunda elde edilen verilere göre hem toplamda hem de sn-2 pozisyonunda %80 PA içeren TAG ürününün QLC lipazı tarafından katalizlenen, ticari PA'nın kullanıldığı ve sıcaklığın 65°C, substrat mol oranının 3:1 (SYA/PS, 1:1, ağırlıkça) olduğu çözümsüz ortamda gerçekleşen asidoliz reaksiyonu ile elde edildiği belirtilmiştir. Daha sonra bu reaksiyon koşullarında dolgulu yatak reaktörde gerçekleşen asidoliz reaksiyonu ile %75 PA içeren TAG elde edildiği; dolgulu yatak reaktördeki reaksiyon hızının karıştırılmalı tank tipi reaktördeki hıza

göre daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, bu çalışmada, elde edilen TAG ürününden SYA'ların uzaklaştırılması için iki farklı yöntem denenmiştir: ilk yöntem oda sıcaklığında ve çözücü varlığında, ikinci yöntem ise 65°C'de heksansız ortamda uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ikinci yöntemle %98 saflıkta TAG ürünü elde edildiği belirtilmiştir (Jimenez ve diğ., 2010).

2.5.4 Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış ticari yağ örnekleri

2.5.4.1 Betapol™

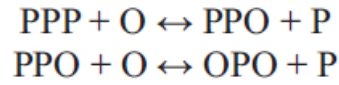
Betapol, Loders Crocklaan tarafından geliştirilen yeni bir anne sütü yağı ikamesinin ticari ismidir. Bu ürün, anne sütü yağının özel yapısına çok benzeyen ve aynı zamanda anne sütü yağ asidi kompozisyonu ile oldukça uyumlu bitkisel yağlara dayanmaktadır. Betapol, susuz koşullar altında, *Rhizomucor miehei* lipazı gibi sn-1,3-spesifik lipazlarca katalizlenen, pozisyon hedefli reaksiyonları içeren modern enzim teknolojisi ile üretilmiştir. Bu ürün, besinsel değeri ve sn-2 pozisyonundaki yüksek palmitik asit içeriği bakımından anne sütüne diğer anne sütü yağı ikamelerine göre daha çok benzemektedir. Ayrıca, bebek formüllerinde Betapol'un kullanımı mineral ve yağ emilimini artırarak kabızlık riskini azaltmaya öncülük edebilir (Xu, 2000; Akoh ve Xu, 2002). Aşağıda yer alan Çizelge 2.3'te Betapol'un yağ asidi kompozisyonu ve pozisyonel dağılımı gösterilmiştir.

Çizelge 2.3 : Betapol'un yağ asidi kompozisyonu (%) ve pozisyonel dağılımı (Akoh ve Xu, 2002).

Yağ asidi	Betapol									
	1		2		3		4		5	
	TAG	sn-2	TAG	sn-2	TAG	sn-2	TAG	sn-2	TAG	sn-2
08:00	0,6	-					1,7			
10:00	0,4	-					1,3			
12:00	3,3	4,7			1	1,4	10,1			
14:00	1,8	1,7	1	1,9	2,7	4,3	4,2		1,3	1,9
16:00	29,6	69,9	30,4	72,7	27,4	53,5	23,9	73,9	31,1	67,8
16:1n-7			0,1	-			0,4		0,2	-
18:00	3,1	2,6	3,2	6,9	8,1	6,9	3,1		1,9	2,7
18:1n-9	40,6	13,7	51,5	14,7	42,1	20,9	36		51,7	22,6
18:2n-6	1,4	6,5	13,3	3,6	11,2	7,2	16,3		12,6	3,6
18:3n-3	3,2	0,8	0,1	-			2,1		0,1	1,4
20:00	0,4						0,2			
20:1n-9	0,1									
22:00	0,1									

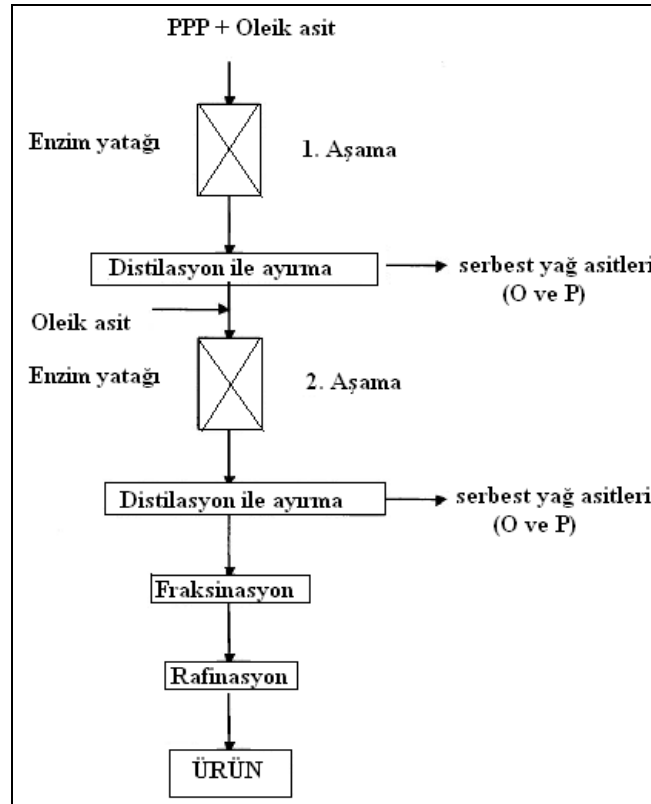
Betapol palmitik asitçe zengin (ağırlıkça %30-45) bir TAG karışımı olmakla birlikte TAG yapısında bulunan palmitik asidin %60'ı kadarı veya daha fazlası sn-2 pozisyonunda bulunmaktadır (Akoh ve Xu, 2002).

İmmobilize *Rhizomucor miehei* lipazının kullanıldığı, dolgulu yatak reaktörde sürekli biçimde 70°C'de ve susuz koşullarda gerçekleşen reaksiyonlar ile üretilen Betapol başlıca 1,2-dipalmitol 3-oleol (PPO) ve 1,3-dioleol 2-palmitol (OPO) TAG'larını içermektedir. Bitkisel yağlardaki triplamitin sn-1,3 pozisyonlarında oleik asit (açıl donör) ile gerçekleşen açıl değişimi şeklinde üretilen Betapol'un model reaksiyonu aşağıda gösterildiği gibidir:



Model reaksiyonda yer alan PPP= Tripalmitin, P= Palmitik asit, O= Oleik asit, PPO= Ara ürün TAG ve OPO= Ürün TAG'ı ifade etmektedir (Innis ve diğ., 1998; Spurgeon ve diğ., 2003).

Betapol'un endüstriyel tesislerde dolgulu-enzim-yatak biyoreaktörünün kullanılarak gerçekleşen üretimi iki aşamadan oluşmaktadır. Şekil 2.10'da Betapol'un endüstriyel ölçekteki üretimi şematize edilmiştir.



Şekil 2.10 : Betapol'un endüstriyel ölçekteki üretim akış şeması (Akoh ve Xu, 2002).

Betapol'un üretiminde ilk olarak, susbstratlar ilk yataktan geçerler ve birinci-aşama ürünleri distilasyon ile saflaştırılarak SYA'ların ayrılması sağlanır. Saflaştırılan ürün oleik asit ile karıştırılarak ikinci- aşama dolgulu yatak reaktörden geçirilir. İkinci-aşama ürünleri distilasyon ile saflaştırılır. Daha sonra, reaksiyona girmeyen PPP ve oluşan diaçilgliserol (DAG)'lerin ayrılması için saflaştırılan ürün fraksiyonlanır. Ağartma ve deodorizasyonun yer aldığı son rafinasyon işlemi, üretilen yağın yemeklik amaçlara uygun hale getirilmesi için gereklidir (Akoh ve Xu, 2002).

1990'lı yılların ortasında ve sonunda Betapol ile beslenen bebeklerde yağ ve mineral emilimini gözlemlemek açısından bir dizi klinik araştırma gerçekleştirilmiş ve bu çalışmalar yayınlanmıştır (Porsgaard, 2006). Carnielli ve diğ. (1995a) gerçekleştirdikleri bir çalışmada yaptıkları çapraz tasarıma göre erken doğan bebeklerin bir hafta Betapol ile ve sonraki bir hafta sn-2 pozisyonunda %10 palmitik asit içeren bir TAG ile beslenmesini sağlamışlardır. Çalışmanın sonunda Betapol ile beslenme sonrasında kandaki sterol esterleri, TAG ve yağ asidinde bulunan palmitik asit içeriğinin yüksek olduğu gözlemleyerek palmitik asidin sn-2 pozisyonunda fazla miktarda bulunduğu vücut tarafından emiliminin arttığı yargısına ulaşmışlardır. Başka bir çalışmada ise erken doğan bebekler Betapol ile beslendiğinde kalsiyumun vücuttan atılımının düşük olduğu saptanmış ve klasik formüllerle kıyaslandığında Betapol'un mineral dengesini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır (Carnielli ve diğ., 1995b). Lucas ve diğ. (1997) prematüre bebeklerle yaptıkları bir çalışmada sn-2 pozisyonunda %74 palmitik asit içeren Betapol ile sn-2 pozisyonunda %8 ya da %28 oranında palmitik asit bulunan bebek formülleri kullanarak bebekleri beslemişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre Betapol ile beslenen bebeklerde palmitik asit ve kalsiyum emiliminin arttığı ve çözünmeyen kalsiyum sabunlarının miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir.

Normal zamanda doğan bebeklerle yapılan bir çalışmada bebekler üç ayrı grubu ayrılarak doğumlarından itibaren sn-2 pozisyonunda %66 (Betapol), %39 ya da %13 oranında palmitik asit içeren formülasyonlarla beslenmişlerdir. Deney sonucunda elde edilen verilere göre her üç grupta gözlenen yağ emiliminin sırasıyla %97,6, %93,2 ve %32,5; kalsiyum emiliminin ise sırasıyla %53,1, %35,4 ve %32,5 olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, diğer formülasyonlarla kıyaslandığında Betapol ile beslenme sonrasında yağ ve kalsiyum emiliminde önemli düzeyde bir artış olduğu gözlenmiştir (Carnielli ve diğ., 1996). Kennedy ve diğ. (1999) gerçekleştirdikleri bir

çalışmada beslenme farklılıklarının dışkı sertliği ve kemikteki mineral miktarı üzerine olan etkisini incelemek üzere bebeklerin sn-2 pozisyonunda %50 oranında palmitik asit bulunan Betapol, sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarı %12 olan bebek formülü ve anne sütü ile beslenmesini sağlamışlardır. Çalışmadan elde edilen veriler doğrultusunda, kontrol formülasyon ile kıyaslandığında, Betapol ve anne sütü ile beslenme sonrasında daha yumuşak dışkı olduğu ve bebeklerin kemik kütlelerinin daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Betapol ile gerçekleştirilen çalışmalardan da görüleceği üzere, sadece yağ asidi bileşimi bakımından değil, aynı zamanda tüm TAG yapısı bakımından da anne sütüne daha çok benzeyen Betapol'un erken ve normal zamanda doğmuş bebekler için mevcut olan klasik formüllere göre yağ ve kalsiyum emiliminde avantaj sağladığı oldukça açıktır (Porsgaard, 2006).

2.5.4.2 InFat™

AarhusKarlshamn (AAK, İsveç) tarafından üretilen InFat™ bebek formüllerinde kullanılmak üzere üretilmiş anne sütü yağına benzer yapıdaki diğer bir ticari yapılandırılmış yağ ürünüdür. Bitkisel yağ karışımlarının yağ kaynağı olarak kullanıldığı enzimatik prosesler ile üretilen ürünün sn-2 pozisyonu palmitik asitçe zengindir (Url-7).

2.5.5 Çoklu doyamamış yağ asitlerinin bebek formüllerinde kullanımına ilişkin mevcut bulunan yasal düzenlemeler

Anne sütü, annenin beslenmesine bağlı olarak değişkenlik göstermesine rağmen, bebeklerin büyümesi ve gelişimi için iyi dengelenmiş bir diyet sağlaması bakımından genellikle “altın standart” olarak addedilmektedir (Alles ve diğ., 2004). Hem zamanında hem de erken doğan bebekler en az 4-6 ay anne sütü ile beslenmelidir; ancak tıbbi, metabolik ve ekonomik nedenlerden ötürü bu süre kısalabilmektedir. Bu yüzden, bebek formüllerine ihtiyaç duyulmaktadır. Buna ek olarak, sindirim ve emilim açısından gelişmemiş erken doğan bebekler için özel formüller gerekmektedir (Weber ve Mukherjee, 2005).

Yeni doğanların, yetişkin bireylere oranla, enerji gereksinimleri daha fazla olduğu için yağlar bebek beslenmesinde önemli rol oynamaktadır (Weber ve Mukherjee, 2005; Hendricks ve Guo, 2006). Anne sütünde bulunan yağlar, bebeklerin beyin

gelişimi ve retina fonksiyonunda ve prostaglandin ve lökotrienler gibi biyoaktif maddelerin üretiminde yapısal rolü olan uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin de dahil olduğu çok çeşitli yağ asitleri içermektedir (Weber ve Mukherjee, 2005). Ancak, bebek formüllerinde bulunan yağlar genellikle bitkisel yağlardır ve bu yüzden uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri içermemektedir (Hendricks ve Guo, 2006)). Fakat, günümüzde bazı ticari bebek formülü üreticileri GLA ile AA, EPA ve DHA gibi uzun zincirli ÇDYA ile takviye edilmiş bebek formülleri üretmektedir (Weber ve Mukherjee, 2005; Morrow, 2006). Uzun zincirli ÇDYA'ların bebek formüllerinde kullanımı FDA (U.S. Food and Drug Administration), EFSA (European Food Safety Authority), FAO (Food and Agriculture Organization) ve WHO (World Health Organization), CAC (Codex Alimentarius Commission), AFSSA (Agence Francaise De Securite Sanitaire Des Aliments), ADA (American Dietetic Association) ve DC (Dietitians of Canada), ESPGAN (European Society of Pediatrics, Gastroenterology and Nutrition), World Association of Perinatal Medicine (WAPM) ve CHF (Child Health Foundation), EC (Commission of European Communities), ve NAS (National Academy of Sciences) gibi dünya çapındaki düzenleyici kurumlar tarafından değerlendirilmiş ve desteklenmiştir (Url-8).

Çizelge 2 ticari olarak üretilen bazı bebek formüllerinin yağ asidi bileşenleri yer almaktadır. Anne sütü yağı (Çizelge 2.2) bileşenleri ile Çizelge 2.4'te yer alan bebek formülleri yağ asidi bileşenleri incelendiğinde, palmitik asidin anne sütündeki değere yakın olduğu; oleik ve linoleik asidin hem bebek formüllerinde hem de anne sütünde esas doymamış yağ olduğu ve bebek formüllerindeki AA, EPA ve DHA değerlerinin anne sütü yağındakinden düşük olduğu görülmektedir.

Çizelge 2.4 : Bazı ticari bebek formüllerinin yağ asidi bileşenleri (Weber ve Mukherjee, 2005).

Bebek Formülü	Yağ Asidi Bileşenleri (%)											
	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	16:1	18:1c9	18:2n6	18:3n3	20:4n6	20:5n3	22:6n3
Prematil ^a	1,2	6,3	5,6	25,8	8,2		32,6	10,6	0,8	TE	TE	TE
Prematil+Milupan ^a	1,1	4,9	5,6	26,3	8,5		32,9	12,0	0,6	0,31	0,04	0,17
Aptamil ^b		4,8	5,3	25,0			36,0	11,4	0,7	<0,1		
Aptamil with Milupan ^b		4,9- 5,6	5,6- 5,9	26,1- 26,8			30,2- 32,2	11,5- 12,8	0,6- 0,65	0,3- 0,4		0,15- 0,25
Aptamil with Milupan ^c	1,4	5,3	5,4	26,6	7,4	1,0	32,5	11,9	1,0	0,4	0,08	0,24
Enfamil with iron ^d	20,1	C ₆ -C ₁₂	34,4	C ₁₄ - C ₂₄		29,4*	-	14,6	1,5			
Nutrilon Premium ^e	1,9	11,5	4,5	22,7	3,3	0,2	39,0	11,6	1,3			
Gallia-1 ^f			46,5*			34,0*	0,	17,8	1,65	TE	TE	TE
Preemie SMA	4,6	12,7	5,9	10,8	6,2	0,8	33,0	12,8	1,4	TE		TE
Betapol ^h				23,9- 25,4	2,5- 3,7		34,8- 36,7	12,5- 12,6	1,1- 2,7			
Betapol-2 ⁱ			3,7	24,8	5,2		39,5	23,4	2,6	TE	TE	TE
AlmironAB ^j	2,9	13,0	5,7	21,4	3,8	0,3	30,6	16,5	0,3	TE		
Nestec Formula ^k	2,4	1,6	3,6	23,3	10,2	3,6	32,7	12,4	1,1			

^aMilupa, Friedrichsdorf, Almanya; premature bebek formülü.

^bMilupa, Friedrichsdorf, Almanya (yumurta fosfolipitleri [uzun zincirli ÇDYA] süt yağı ve bitkisel yağlar içermektedir).

^cMilupa, Friedrichsdorf, Almanya (yumurta fosfolipitleri [uzun zincirli ÇDYA], süt yağı ve bitkisel yağlar içermektedir).

^dMead Johnson Nutritional Group; Evansville, IN.

^eNutrica, Zoetermeer, Hollanda; 6:0-8:0, %3,3.

^fBlédina-sa, Groupre Danone, Villefranche-sur-Saône, Fransa.

^gWyeth-Ayerst Laboratories, Radnor, PA; premature bebek formülü; 8:0, %9,3.

^hLoders Croklaan, Wormerveer, Hollanda; sn-2 pozisyonundaki 16:0 oranı yüksek, sentezlenmiş TAG formülü (BetapolTM).

ⁱLoders Croklaan, Wormerveer, Hollanda; sn-2 pozisyonundaki 16:0 oranı yüksek, sentezlenmiş TAG formülü (Betapol-2).

^jNutrica, Zoetermeer, Hollanda.

^kNestec, Vevey, İsviçre; 4:0-8:0, %4,0. *Toplam doymuş ya da tekli doymamış YA. TE, tespit edilemedi.

Aşağıda yer alan Çizelge 2.5'te bazı global düzenleyici kurumlar tarafından prematüre bebek formüllerinde uzun zincirli ÇDYA'ların kullanım miktarlarına ilişkin limit değerler belirtilmiştir.

Çizelge 2.5 : Uzun zincirli ÇDYA'nın prematüre bebek formüllerine eklenmesi için önerilen değerler (Crozier, 1998).

	n-6	n-3
ESPGAN¹	%1 (Toplam yağ asidinin)	%0,5 (Toplam yağ asidinin)
BNF²	%0,2 (Toplam enerjini)	%0,2 (Toplam enerjini)
EEC³	<%2 (Toplam yağın)	<%1 (Toplam yağın)
ISSFAL⁴	60-100 mg/kg/gün	70-150 mg/kg/gün
FAO/WHO⁵	60 mg/kg/gün	40 mg/kg/gün

¹European Society of Pediatrics, Gastroenterology and Nutrition, ESPGAN

²British Nutrition Foundation, BNF

³European EconomicCommunity, EEC

⁴International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ISSFAL

⁵Food and Agriculture Organization/World Health Organization, FAO/WHO

ESPGAN (European Society of Pediatrics, Gastroenterology and Nutrition) ve kardeş kuruluşu FISPAN (Federation of International Societies on Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) tarafından oluşturulan ve bebek beslenmesinde uzman kişileri bünyesinde bulunduran IEG (International Expert Group) tarafından uzun zincirli ÇDYA'ların bebek formüllerine eklenmesi hususunda önerilen sınır değerler Çizelge 2.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6 : ESPGAN tarafından bebek formülleri için önerilen yağ asidi miktarları (Koletzko ve diğ., 2005).

Yağ Asidi	Minimum Değer	Maksimum Değer
Linoleik asit	0,3 g/100kcal	1,2 g/100kcal
α -linoleik asit	50 g/100kcal	-
linoleik/ α -linoleik oranı	5:1	15:1
DHA	-	%0,5 (Toplam yağın)

Çizelge 2.6'da yer alan değerlere ek olarak, bebek formüllerine eklenecek AA miktarının en az DHA miktarı kadar olması ve eklenen EPA miktarının ise DHA miktarını geçmemesi IEG tarafından önerilmektedir (Koletzko ve diğ., 2005). Buna ek olarak, Avrupa Birliği'nin 2006/141/EC direktifinde uzun zincirli ÇDYA'ların bebek formüllerinde kullanımına ait yasal sınırlar bildirilmiştir. Buna göre, bebek formüllerine eklenecek n-3 ÇDYA'ların toplam yağ miktarının %1'i kadar, n-6 ÇDYA'larının toplam yağ miktarının %2'si kadar ve AA miktarının ise toplam yağın

%1'i kadar olması gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca, bebek formüllerine eklenecek EPA'nın DHA miktarını, DHA miktarının ise n-6 ÇDYA miktarını geçmemesi gerektiği ifade edilmiştir (Url-9). Ülkemizde de Türk Gıda Kodeksi "Bebek Mamaları-Bebek Formülleri Tebliği" ile bebek formüllerinin içerdiği uzun zincirli ÇDYA'ların yasal limitleri belirtilmiştir. Tebliğide, Avrupa Birliği'nin 2006/141/EC direktifinde yer alan uzun zincirli ÇDYA'ların bebek formüllerinde kullanımına ait limit değerler kabul edilmiştir (Url-10).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Tez çalışmasında kullanılan rafine fındık yağı yerel bir marketten, Omega Vega™ yağ karışımı ise Preferred Nutrition Inc. (Acton, ON) firmasından temin edilmiştir. Tripalmitin (gliserol tripalmitat, minimum saflık %85) ve sn-2 pozisyon analizinde kullanılan domuz orijinli pankreatik lipaz enzimi Sigma (St Louis, MO) firmasından satın alınmıştır. *Thermomyces lanuginosus*'dan elde edilen ve ticari olarak tutuklanmış sn-1,3 spesifik bir lipaz olan Lipozyme® TL IM Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Danimarka) firmasından alınmıştır. Ürün spesifikasyonunda Lipozyme® TL IM enziminin aktivitesi 250 IUN/g olarak belirtilmiştir. Kullanılan çözümler ve ince tabaka kromatografisinde (TLC) kullanılan 20x20 cm boyutundaki, yüzeyi silikajel G ile kaplı cam plakalar sırasıyla Sigma Aldrich ve Merck (Whitehouse, NJ) firmalarından satın alınmıştır. Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm çözelti ve kimyasallar kromatografik ve/veya analitik saflıktadır.

3.2. Metotlar

3.2.1. Substrat yağlardan serbest yağ asitlerinin eldesi

Fındık yağı ile Omega Vega yağ karışımından serbest yağ asitlerinin eldesinde Wanasundara ve Shahidi (1999)'nin uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle göre 25 gram yağ, 5,75 gr KOH, 11 ml saf su, 66 ml %95'lik sulu etanol karışımı ile 60°C sıcaklıkta 1 saat süreyle geri soğutucu altında sabunlaştırılmıştır. Süre sonunda karışıma 60 ml saf su eklenerek karışım ayırma hunisine aktarılmıştır. Sabunlaşmayan maddelerin uzaklaştırılması için karışım iki kez 100 ml hekzan ile çalkalanmış ve sabunlaşmayan maddeleri içeren hekzan fazı atılmıştır. Sabunlaşan maddeleri içeren sulu faz ise 3 N HCl kullanılarak pH=1 olacak şekilde asitlendirilmiştir. Asitlendirilen karışım daha sonra, ayırma hunisine aktarılmış ve üzerine 50 ml hekzan eklenerek serbest yağ asitleri ekstrakte edilmiştir. Serbest yağ asitlerini içeren hekzan fazı susuz sodyum sülfat kolondan geçirilerek kurutulmuştur. Daha sonra hekzan fazı 40°C'deki su banyosuna alınarak döner buharlaştırıcı ile

hekzanın uçurulması sağlanmıştır. Elde edilen serbest yağ asitleri kullanılıncaya dek -18°C'deki dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Asidoliz reaksiyonu

Asidoliz reaksiyonları cam balonlar içerisinde, 200 rpm hızındaki çalkalamalı su banyosunda gerçekleşmiştir. Her deney için tripalmitin ve fındık yağı SYA ile Omega Vega yağı SYA'larının farklı substrat mol oranındaki karışımları, toplam substrat yağ miktarının ağırlıkça %10'u kadar Lipozyme® TL IM enzimi ve 5 ml hekzan kullanılmıştır. Tüm enzimatik reaksiyonlar 2'şer paralel olarak yapılmış ve hesaplamalarda elde edilen sonuçların ortalaması alınmıştır.

3.2.3. İnce tabaka kromatografisi ile analiz

Asidoliz reaksiyonu sonunda elde edilen ürünler susuz sodyum sülfat kolondan geçirilerek içerdikleri enzim ve nemin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Reaksiyon ürünlerinin uygulanacağı silika jel G kaplı, 20x20 cm boyutundaki cam plakalar 110°C'deki etüvde 1 saat bekletilerek içerdikleri nem uzaklaştırılmıştır. Ardından, TLC plakaları üzerine reaksiyon ürününden yaklaşık 50 µl uygulandıktan sonra plakalar petrol eteri: dietil eter: asetik asit (80:20:0.5, hacimce) çözgen sistemini içeren tanka yerleştirilmiştir. Bu sayede, çözgen sistemi plakalar üzerinde yürütülerek reaksiyon ürünlerindeki TAG'ların ayrılması sağlanmıştır. Çözgen sistemi TLC plakasında istenen seviyeye ulaştıktan sonra tanktan çıkarılan plakalar üzerine 2',7'-diklorofloresinin metanol ile hazırlanmış %0,2'lik çözeltisi püskürtülerek TAG bantları görünür hale getirilmiştir. TAG bantları, bir sonraki aşama olan yağ asidi metil esterleri hazırlığında TLC plakalarından spatül yardımıyla kazınarak vida kapaklı test tüplerine aktarılmıştır (Jennings ve Akoh, 1999).

3.2.4. Yağ asidi metil esterlerinin hazırlanması

TLC plakalarından kazınan TAG bantlarını içeren test tüplerine metanol ile hazırlanmış %6'lık HCl çözeltisinden 3 ml ve C17:0 iç standardından (10 mg/ml) 40 µl ilave edilerek, 1 dakika süreyle tüp karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra, karışımı içeren tüpler 75°C'deki etüvde 2 saat bekletilerek yağ asitlerinin metillenmesi sağlanmıştır. Süre bitiminde etüvden alınan tüpler üzerine iki kez 2 ml hekzan ve 0,1 M KCl çözeltisi eklenerek metil esterleri ekstrakte edilmiştir. Metil esterlerini içeren üst faz susuz sodyum sülfat kolondan geçirilerek içediği nem

uzaklaştırılmıştır. Ardından, test tüplerindeki hekzan miktarı 0,5 ml oluncaya kadar azot kurutucu altında uçurulmuştur (Jennings ve Akoh, 1999).

3.2.5. Yağ asitlerinin gaz kromatografisi ile analizi

Asidoliz reaksiyonu ile elde edilen yapılandırılmış TAG'lar metillendirilerek yağ asidi kompozisyonları gaz-sıvı kromatografisinde analizlenebilir hale getirilmiştir. Metillendirilen yağ asitleri ThermoQuest Trace GC 2000 (Milan, İtalya) cihazı kullanılarak J&W Scientifics DB-Wax kapiler kolon ile analiz edilmiştir. Aşağıda yer alan Çizelge 3.1'de kromatografik analiz koşulları ve kullanılan kapiler kolonun özellikleri yer almaktadır.

Çizelge 3.1: Gaz kromatografisindeki analiz koşulları ve kolon özellikleri

Dedektör tipi ve sıcaklığı	Alev iyonizasyon dedektörü, 260°C
Enjektör sıcaklığı	Dağıtım mod, 250°C Dağıtım akış hızı: 116 ml/dk. Dağıtım oranı: 77
Helyum akış hızı	1,5 ml/dak.
Fırın sıcaklığı (Programlı çalışma)	1. aşama: 150°C (3 dk.) 2. aşama: 150-225°C (10°C/dk ile) 3. aşama: 225°C (10 dk.)
Kolon tipi	30 m uzunluğunda, 0,32 mm iç çaplı ve 0,25 µm film kalınlığına sahip; dolgu maddesi polietilen glikol (PEG)
Enjeksiyon miktarı	2 µl

Analiz sonuçları yağ asidi metil esterlerinin % mol miktarları olarak belirtilmiş ve bunun için C17:0 iç standardı kullanılarak bilgisayar programı yardımıyla hesaplamalar yapılmıştır.

3.2.6. Yağ asitlerinin sn-2 pozisyonel analizi

Asidoliz tepkimeleriyle üretilen yapılandırılmış yağların sn-2 pozisyonunda bulunan yağ asitlerinin kompozisyonunun belirlenmesi için ilk olarak, TLC plakalarından kazınan TAG bantları üzerine 2 ml Tris tamponu (1,0 M), 0,5 ml safra tuzu çözeltisi (%0,05) ve 2 ml kalsiyum klorür çözeltisi eklenerek 2 dakika süreyle tüp karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra, karışımı içeren test tüplerine 40 mg pankreatik lipaz enzimi eklenip 40°C'deki su banyosunda 3 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan alınan tüpler 2 dakika tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. Reaksiyonun durdurulması için tüplerdeki karışıma 1 ml HCl (6 N) ve 4 ml dietil eter eklenmiştir. TAG bantlarındaki yağı ekstrakte etmek için tüpler 1 dakika tüp karıştırıcıda karıştırılmış ve ardından 3 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası test tüplerindeki üst faz sodyum sülfat kolondan geçirilmiş, hacminin 1/3'üne kadar azot kurutucu altında konsantre edilmiştir. Tüplerde kalan karışım TLC plakalarına uygulanarak hekzan:dietil eter:formik asit (60:40:1,6, hacimce) çözgen sisteminde yürütülmüştür. Sonraki aşamada, TLC plakaları üzerine 2,7-diklorofloresinin metanol ile hazırlanmış %0,2'lik çözeltisi püskürtülerek TAG bantları görünür hale getirilmiştir. TAG bantları spatül yardımıyla plakalardan kazınarak test tüplerine aktarılmış ve 3.2.5'te belirtilen yöntem ile yağ asidi metil esterleri hazırlanıp, gaz-sıvı kromatografisinde analiz edilmiştir (Pina-Rodriguez ve Akoh, 2009a). Yağ asidi metil esterlerinin gaz-sıvı kromatografisinden elde edilen sonuçlar, C17:0 iç standardı sonuçları kullanılarak bilgisayar programında analiz edilip, yağ asitlerinin % mol miktarları belirlenmiştir.

3.2.7. Ürünün büyük ölçekte üretimi

Tepki Yüzey Yöntemi ile elde edilen izdüşüm grafiklerinden belirlenen ve elde edilen modelin doğruluğunun incelendiği koşullarda yapılandırılmış yağların büyük ölçekte üretimi (50 kat arttırılarak) gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 250 ml'lik cam balonlarda 2 paralel olacak şekilde çalkalamalı su banyosunda (Memmert, Almanya) yapılan üretim, reaksiyon sıcaklığı 60°C, reaksiyon süresi 8 saat ve substrat mol oranı 4 mol/mol olan reaksiyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. Büyük ölçekte üretim için kullanılan tripalmitin miktarı 250 mg'dan 13 gr'a yükseltilmiş; kullanılan fındık yağı SYA ve Omega Vega SYA miktarları ile enzim ve hekzan miktarları da triplamitin miktarı ile orantılı olacak şekilde arttırılmıştır.

3.2.8. Reaksiyon ürünlerinden serbest yağ asitlerinin uzaklaştırılması

Yapılandırılmış yağların büyük ölçekte üretiminden sonra elde edilen reaksiyon karışımından serbest yağların uzaklaştırılması için Lee ve diğ. (2004)'in uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemle göre, enzimatik reaksiyon sonrasında susuz sodyum sülfat kolondan geçirilen reaksiyon karışımında bulunan hekzan döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, hekzanı buharlaştırılan reaksiyon karışımına %20 etanol ile hazırlanan 0,5 N KOH çözeltisinden 60 ml ve 110 ml hekzan eklenir ve ayırma hunisine aktararak çalkalanır ve faz ayrımının olması için beklenir. Faz ayrımı gerçekleştikten sonra üst faz (hekzan fazı) bir beherde toplanarak içerisine 3-4 damla fenolfitaleyn çözeltisi eklenir ve %20 etanol ile hazırlanan 0,5 N KOH çözeltisi ile titre edilir. Karışımın rengi pembeye döndükten sonra doymuş tuz çözeltisinden 30 ml karışıma eklenir. Ayırma hunisine aktarılan karışım kuvvetlice çalkalanır ve faz ayrımı için beklenir. Üst faz (hekzan fazı) susuz sodyum sülfat kolonundan geçirilerek içerdiği hekzan döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılır. Elde edilen yapılandırılmış yağ -18°C'de saklanır.

3.2.9. Oksidatif stabilite analizi

Enzimatik deneylerde yağ kaynağı olarak kullanılan fındık yağı, Omega Vega yağ karışımı, tripalmitin ve büyük ölçekte üretim ile elde edilen yapılandırılmış yağların oksidatif stabiliteleri Metrohm 743 Rancimat Cihazı (Herisau, İsviçre) ile belirlenmiştir. Oksidatif stabilitesi ölçülecek olan yağlardan 3'er kullanılmış ve 2 paralel halinde çalışılmıştır. Hava akış hızı 20 l/sa, sıcaklık ise 100°C olarak ayarlanmış ve elde edilen sonuçlar indüksiyon süresi (saat) olarak belirtilmiştir (Lee ve diğ., 2006).

3.2.10. Erime profili analizi

Tripalmitin ve büyük ölçekte üretimi gerçekleşen yapılandırılmış yağların erime profilleri diferansiyel taramalı kalorimetre ("DSC") DSC Q10 (TA Instruments, New Castle, DA) cihazı kullanılarak ve AOCS Resmi Metodu Cj 1-94 (1998) uygulanarak belirlenmiştir. AOCS metoduna göre alüminyum kapların içerisine 5 mg yağ örnekleri tartılmış ve alüminyum kapak ile hermetik olarak kapatılmıştır. Oda sıcaklığında cihaza yerleştirilen numuneler 80°C'ye ısıtılmış ve 10 dk bu sıcaklıkta bekletilmiştir. Daha sonra, 10°C/dk ile -60°C'ye soğutulan numuneler 30 dk bu sıcaklıkta tutulmuştur. Sonraki aşamada ise numuneler 5°C/dk ile 80°C'ye

ısıtılmıştır. Referans için hermetik olarak kapatılmış boş alüminyum kap kullanılmıştır. Elde edilen termogramlar “TA Universal Analysis” yazılım programı ile analiz edilmiştir.

3.2.11. Tepki yüzey yöntemi ve deneysel tasarım

Tepki Yüzey Yöntemi (TYY) proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için kullanılan istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntemdir. Bu yöntem, modelleme yapılmasına imkân tanıdığı gibi, çeşitli değişkenlerden etkilenen tepkileri içeren problemlerin analizinde ve bu tepkilerin optimizasyonunda da kullanılmaktadır. TYT tasarım, geliştirme, yeni ürün formülasyonu ve hatta var olan ürün tasarımlarının geliştirilmesi gibi önemli uygulama alanlarına sahiptir (Myers ve Montgomery, 2002; Montgomery, 2005).

Çoğu Tepki Yüzey Yöntemi probleminde tepki ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin biçimi bilinmemektedir. Bu nedenle, TYT’deki ilk adım, tepki ile bağımsız değişkenler arasındaki gerçek ilişkiyi ortaya koymak için uygun bir tahminleme yapmaktır. Eğer tepki, bağımsız değişkenlerin lineer fonksiyonu tarafından iyi modelleniyorsa, tahminleme için birinci dereceden polinom denklemi model olarak kullanılır. Eğer sistemin yüzeyinde bir eğrilik varsa, ikinci dereceden veya yüksek mertebeden polinom denklemler model olarak kullanılmalıdır. Modellemede “Merkezil-bileşik”, “Box-Benkhen”, tam faktöryel, kısmi faktöryel ve rastgele bloklama tasarımları en çok kullanılan deney tasarımlarıdır. Bunlardan Merkezil-bileşik deney tasarımı, ikinci derece modellerin uydurulmasında (“fitting”) en yaygın kullanıma sahip tasarımıdır (Montgomery, 2005).

Merkezil- bileşik deney desenlerinde, üç bileşenden oluşan 5 seviye vardır. Bu bileşenler, küp noktalar (cube points), yıldız noktalar (star points) ve merkez noktaları (center points) olmak üzere üç tip deneysel noktayı içermektedir. Merkez noktalarındaki deneyler sistemdeki eğrilik hakkında açık bir bilgi sağlamaktadır. Yıldız noktaların eklenmesi ise ikinci derece terimlerin doğru tahminlenebilmesine olanak sağlamaktadır (Thomson, 1982, Myers ve Montgomery, 2002).

Yapılan bu çalışmada, sıcaklık, süre ve substrat mol oranı olarak belirlenen reaksiyon parametrelerinin stearidonik ve oleik asit katılımı üzerindeki etkilerini araştırmak ve reaksiyon koşullarının optimizasyonunu sağlamak amacıyla TYT kullanılmıştır. Ön deneme çalışmalarından ve literatür taraması ile elde edilen bilgiler doğrultusunda

bağımsız değişkenler için değer aralıkları (reaksiyon sıcaklığı: 55-65°C; reaksiyon süresi: 4-12 saat; substrat mol oranı: 3-5 mol/mol) belirlenmiş olup, Modde 9.0 (Umetrics, İsveç) programı ile deney tasarımı yapılmıştır. 3 faktörlü (sıcaklık, süre ve substrat mol oranı) ve 5 seviyeli (-α, -1, 0, +1, +α) Merkezil Bileşik Deney Tasarımı (CCC) ile, bağımsız değişkenler ve tepkiler arasındaki gerçek ilişkiyi tahminleyen modeller elde edilmiştir (Myers ve Montgomery, 2002). Merkezil Bileşik Deney Tasarımında kullanılan faktörler ve seviyeleri Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2: Merkezil Bileşik Deney Tasarımı için kullanılan değişkenler (faktörler) ve seviyeleri.

Bağımsız değişkenler	Semboller	Kullanılan seviyeler				
		-α	-1	0	+1	+α
Reaksiyon sıcaklığı (°C)	T	51,6	55	60	65	68,4
Reaksiyon süresi (saat)	t	1,27	4	8	12	14,73
Substrat mol oranı (mol/mol)	Sr	2,32	3	4	5	5,67

3.2.12. İstatistiksel analiz

Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların üretimi için TYY kullanılarak, Modde 9.0 (Umetrics, İsveç) programı yardımıyla deney tasarımı oluşturulmuştur. Seçilen reaksiyon parametreleri olan sıcaklık, süre ve substrat mol oranının reaksiyon üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deney tasarımı göre gerçekleştirilen enzimatik asidoliz reaksiyonlarından elde edilen veriler Modde 9.0 (Umetrics, İsveç) programında kullanılarak istatistiksel açıdan analiz edilmişlerdir. Çoklu regresyon ve geriye dönük eleme yöntemleri kullanılarak en uygun kuadratik (ikinci derece) modelin oluşturulması sağlanmıştır. Enzimatik reaksiyonlar sonucunda elde edilen tepkiler (stearidonik ve oleik asit katılımı, % mol) için geliştirilen modellerde aşağıda yer alan ikinci derece polinom denklem kullanılmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Eşitikte yer alan

Y: Tepki

β₀: Kesişim terimi

β_i : Lineer (birinci derece) regresyon katsayısı

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

β_{ij} : Etkileşim regresyon katsayısı

X_i ve X_j : Bağımsız değişkenler, olarak simgelenmektedir.

Varyans analizi (ANOVA) ile elde edilen modelin, tepkiler ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi tahminlemek için uygun olup olmadığı tespit edilmiştir (Rao ve diğ., 2002; Yang ve diğ., 2003; Lumor ve Akoh, 2005; Sahin ve diğ., 2005a; Chopra ve diğ. 2009; Chen ve diğ., 2010).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Substratların Yağ Asidi Bileşenleri

Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ elde etmek üzere gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimelerinde substrat kaynağı olarak kullanılan fındık yağı ve Omega Vega yağ karışımının yağ asidi kompozisyonları gaz kromatografisi analizi yapılarak belirlenmiştir.

4.1.1 Fındık yağı

Fındık yağının gaz kromatografisi kullanılarak belirlenen yağ asidi bileşimi, Türk Gıda Kodeksi “Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği”nde belirtilen ve literatürde yer alan değerler aşağıda yer alan Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Çizelge 4.1’deki veriler değerlendirildiğinde, deneysel çalışmalarda kullanılan fındık yağının yağ asidi bileşenlerinin hem Türk Gıda Kodeksi’nde hem de literatürde yer alan değerlere uygun olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1 : Fındık yağının yağ asidi bileşimi ve literatürde yer alan değerler (%).

Yağ Asidi	Fındık yağı	Türk Gıda Kodeksi ¹	Türk tipi fındık ²	Türk tipi fındık ³	Türk tipi fındık ⁴	Türk tipi fındık ⁵
C14:0	-	TED-0.1	-	0,03±0,00	-	0,01-0,16
C16:0	6,04	4.32-8.89	6,6- 8,3	4,85±0,02	5,41-6,59	4,39-8,85
C16:1	-	TED-1.15	-	0,16±0,00	0,26-0,36	-
C18:0	2,16	TED-2.67	2,8- 3,8	2,73±0,00	1,27-1,90	1,67-3,18
C18:1n-9	74,23	71.0-91.0	75,7- 77,7	82,72±0,04	75,25-86,32	73,48-81,57
C18:2n-6	16,95	5.7-22.2	11,1- 13,8	8,89±0,01	5,97-15,59	10,46-15,61
C18:3	0,49	TED-0.2	-	0,10±0,00	0,07-0,15	0,02-0,34
C20:0	0,12	TED-0.1	-	0,14±0,00	0,03-0,06	-
C20:1	-	TED-0.2	-	0,16 ±0,00	0,07-0,10	-
C22:0	-	-	-	0,03±0,00	-	-

¹Url-11

²Özdemir ve diğ., 2001

³Alasalvar ve diğ., 2003b

⁴Erdogan ve Aygun, 2005

⁵Balta ve diğ., 2006

TED: Tespit edilemeyen düzey

4.1.2 Omega Vega yağ karışımı

Omega Vega yağ karışımının gaz kromatografisi analizi ile belirlenen yağ asidi ve literatürde çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenen engerek otu (*Echium plantagineum*) yağ asidi bileşimi Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Çizelge 4.2’den de görüleceği üzere Omega Vega’nın SDA değerinin literatürde yer alan değerlere yakın olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.2 : Omega Vega yağının ve engerek otunun (*Echium plantagineum*) yağ asidi bileşimi (%).

Yağ Asidi	Omega Vega	Engerek otu (tohum yağı) ¹	Engerek otu (yaprak yağı) ¹	Engerek otu ³
C14:0	0,96	-	-	0,06
C16:0	8,76	6,42	20,26	7,69
C18:0	3,26	2,83	3,04	2,75
C18:1n-9	13,84	12,98	5,83	13,4
C18:2n-6	14,20	13,76	6,97	15,22
C18:3n-6	10,72	9,15	2,19	11,32
C18:3n-3	31,28	36,65	29,43	33,27
C18:4n-3	12,93	12,94	5,34	13,35
C20:0	0,55	0,10	0,89	0,26
C20:5n-3	0,33	-	-	-
C22:6n-3	3,17	-	-	-

¹Guil-Guerrero ve diğ., 2000a

²Guil-Guerrero ve diğ., 2000b

³Özcan, 2008

4.2 Reaksiyon Koşullarının Tepki Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Tripalmitin, fındık yağı serbest YA’ları ve Omega Vega serbest YA’ları arasında gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimeleri sonucunda stearidonik asit ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY’lerin üretimi hedeflenmiştir. Reaksiyon koşullarının optimizasyonu, seçilen reaksiyon parametreleri olan reaksiyon sıcaklığı (T, °C), reaksiyon süresi (t, saat) ve substrat mol oranı (Sr, mol/mol) ile, Tepki Yüzey Yöntemi (TYY) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney tasarımı doğrultusunda elde edilen reaksiyon koşullarının enzimatik reaksiyon ürünleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

4.2.1 Reaksiyon koşullarının stearidonik ve oleik asit katılımına etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi

Enzimatik reaksiyonlardan elde edilen veriler Modde 9.0 (Umetrics, İsveç) programı kullanılarak analiz edilerek çoklu regresyon analizi, geriye dönük eleme yöntemleri ile tepkilere ait modeller oluşturulmuş; varyans analizi yapılarak, elde edilen veriler ile oluşturulan modellerin uygunluğu incelenmiştir. Modde 9.0 programı yardımıyla geliştirilen 3 faktörlü, 5 seviyeli Birleşik Deney Tasarımı ve deney noktalarında gözlenen tepkiler (SDA ve oleik asit katılımı, % mol) Çizelge 4.3'te yer almaktadır.

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

Deney No	Bağımsız değişkenler			Tepkiler (Katılım, % mol)	
	T (°C)	t (saat)	Sr (mol/mol)	SDA	Oleik asit
1	55	4	3	2,3	20,2
2	65	4	3	1,2	20,0
3	55	12	3	2,5	22,9
4	65	12	3	2,2	22,4
5	55	4	5	2,7	26,1
6	65	4	5	1,3	23,9
7	55	12	5	2,4	27,3
8	65	12	5	2,7	26,9
9	51,6	8	4	2,2	24,4
10	68,4	8	4	1,9	23,9
11	60	1,27	4	0,8	19,4
12	60	14,73	4	1,9	25,1
13	60	8	2,32	2,7	18,3
14	60	8	5,67	3,7	28,9
15	60	8	4	2,8	24,0
16	60	8	4	2,3	24,1
17	60	8	4	2,6	25,1

En uygun kuadratik modelin elde edilmesi için çoklu regresyon analizi ve geriye dönük eleme yöntemleri kullanılmıştır. Buna göre, $p < 0.05$ önem düzeyinde önemsiz olan birinci derece ve ikinci derece terimler ile etkileşim terimleri elimine edilerek modele dahil edilmemiştir (Lumor ve Akoh, 2005; Chen ve diğ., 2010). Elde edilen modelin gözlenen tepkilere (SDA ve oleik asit katılımı) ait regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P -değeri) istatistiksel olarak hesaplanmış ve aşağıda yer alan Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.4 : Modelin SDA katılımına ait regresyon katsayıları ve önem dereceleri.

Bağımsız değişkenler	Regresyon katsayıları (β)	P-değeri (önem derecesi)
Kesişim/Sabit	2,57	<0,0001
Lineer (1. derece)		
T	-0,22	0,020
t	0,30	0,004
Sr	0,19	0,036
Kuadratik (2. derece)		
t*t	-0,43	0,001
Sr*Sr	0,22	0,029
Etkileşim		
T*t	0,31	0,014

Çizelge 4.4'te yer alan değerler incelendiğinde, $p < 0,05$ önem düzeyinde, birinci derece terimler olan sıcaklık, süre ve substrat mol oranının SDA katılımına etkisinin istatistiksel açıdan önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca, birinci derece terimlerden olan sıcaklığın SDA katılımını negatif yönde etkilediği gözlenmektedir. SDA katılımına etki eden ikinci dereceden terimler ise “süre*süre” ve “substrat mol oranı*substrat mol oranı” terimleridir. Bu terimlerden olan “süre*süre” teriminin SDA katılımına negatif etkisi olduğu görülmektedir. Etkileşim terimlerinden olan “sıcaklık*süre”nin SDA katılımına olan etkisinin istatistiksel olarak ($p < 0,05$) anlamlı düzeyde olduğu belirlenmiştir (Lumor ve Akoh, 2005; Pina-Rodriguez ve Akoh, 2009a).

Çizelge 4.5 : Modelin oleik asit katılımına ait regresyon katsayıları ve önem dereceleri.

Bağımsız değişkenler	Regresyon katsayıları (β)	P-değeri (önem derecesi)
Kesişim/Sabit	24,37	<0,0001
Lineer (1. derece)		
t	1,38	<0,0001
Sr	2,67	<0,0001
Kuadratik (2. derece)		
t*t	-0,66	0,038

Yukarıda yer alan Çizelge 4.5'ten de görüldüğü üzere, birinci derece terimlerden olan süre ve substrat mol oranının istatistiksel açıdan ($p < 0,05$) oleik asit katılımını etkilediği görülmektedir. Substrat mol oranının oleik asit katılımına etkisinin en büyük olduğu belirlenmiştir. Oleik asit katılımına ikinci derece terimlerden olan

“süre*süre”nin negatif yönde bir etkisi olduğu saptanmıştır. Buna göre, birinci terimlerden süre ve substrat mol oranının, ikinci derece terimlerden “süre*süre”nin hem SDA katılımını, hem de oleik asit katılımına olan etkisinin istatistiksel açıdan ($p<0,05$) anlamlı düzeyde olduğu görülmektedir (Lumor ve Akoh, 2005; Pina-Rodriguez ve Akoh, 2009a).

SDA ve oleik asit katılımı için oluşturulan modellere en iyi uyan, istatistiksel açıdan önemli terimlerin yer aldığı denklemler aşağıda ifade edildiği gibidir. Aşağıda yer alan (4.1) ve (4.2) denklemlerinde bulunan “T” reaksiyon sıcaklığını, “t” reaksiyon süresini ve “Sr” ise substrat mol oranını göstermektedir.

$$\text{SDA katılımı} = 2,57 - 0,22T + 0,30t + 0,19Sr - 0,43t^2 + 0,22Sr^2 + 0,31T*t \quad (4.1)$$

$$\text{Oleik asit katılımı} = 24,37 + 1,38t + 2,67Sr - 0,66t^2 \quad (4.2)$$

Elde edilen modellerin uygunluğu varyans analizi (ANOVA) yapılarak irdelenmiş olup; sonuçlar Çizelge 4.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6 : SDA ve oleik asit katılımı için varyans analizi sonuçları.

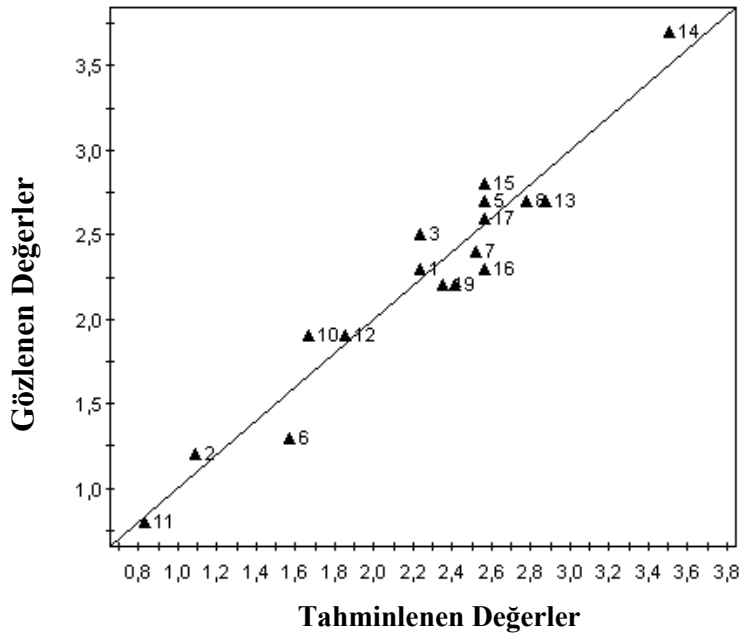
SDA katılımı	SD	KT	KO	F değeri	P- değeri
Toplam	17	93,42	5,5		
Sabit	1	85,84	85,84		
Toplam düzeltilen	16	7,58	0,47		
Regresyon	9	7,07	0,79	10,74	0,002
Hata	7	0,51	0,07		
Model yetersizliği	5	0,39	0,07	1,22	0,508
Tekrar hatası	2	0,13	0,06		
Oleik asit katılımı	SD	KT	KO	F değeri	P- değeri
Toplam	17	9685,39	569,73		
Sabit	1	9548,73	9548,73		
Toplam düzeltilen	16	136,66	8,54		
Regresyon	9	131,38	14,6	19,35	0
Hata	7	5,28	0,75		
Model yetersizliği	5	4,54	0,91	2,45	0,314
Tekrar hatası	2	0,74	0,37		

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

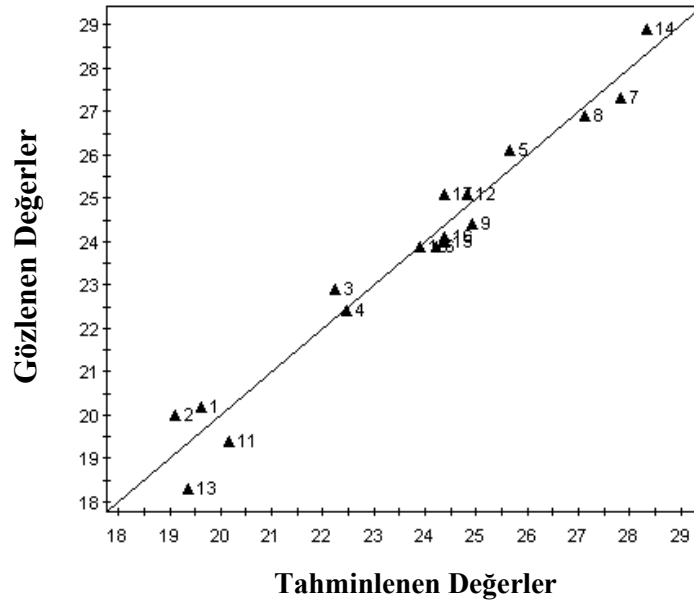
Varyans analizi sonuçlarına göre, SDA ve oleik asit katılımları için elde edilen modellerin F değerleri (F_{model}) ile F_{Tablo} değerinin karşılaştırılması ile modelin

tahminleme için uygun olup olmadığı belirlenmiştir. Buna göre, $p < 0.05$ önem düzeyinde, F değerlerinin (F_{model}) (10,74; 19,35) F_{Tablo} ($F_{9,7}$) (3,69) değerinden büyük olduğu; dolayısıyla elde edilen modellerin tahminleme için uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca, modelin elde edilen verilere uygunluğu model yetersizliği ile tespit edilmektedir. Model yetersizliği, modelin deneysel bölgelerde bulunan ve regresyonda yer almayan noktadaki verileri göstermedeki başarısızlığının bir ölçütüdür. SDA ve oleik asit katılımları için elde edilen modellerin model yetersizliği P -değerleri (0,508; 0,314) $> 0,05$ olduğundan, SDA ve oleik asit katılımına ait modellerin verilerle uyumlu olduğu saptanmıştır (Rao ve diğ., 2002; Lumor ve Akoh, 2005; Sahin ve diğ., 2005a; Chopra ve diğ., 2009).

Varyans analizi sonuçları incelendiğinde, SDA katılımı için geliştirilen modele ait R^2 değerinin 0,93 ve düzeltilmiş R^2 ($R^2_{\text{düz}}$) değerinin 0,85 olduğu; oleik asit katılımı için geliştirilen modelin R^2 değerinin 0,96 ve $R^2_{\text{düz}}$ değerinin 0,91 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, modellerden tahminlenen değerler ile enzimatik asidoliz reaksiyonları sonucu elde edilen veriler arasındaki ilişkiler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'deki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.1 : Reaksiyon sonuçları ile SDA katılımına ait modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki.

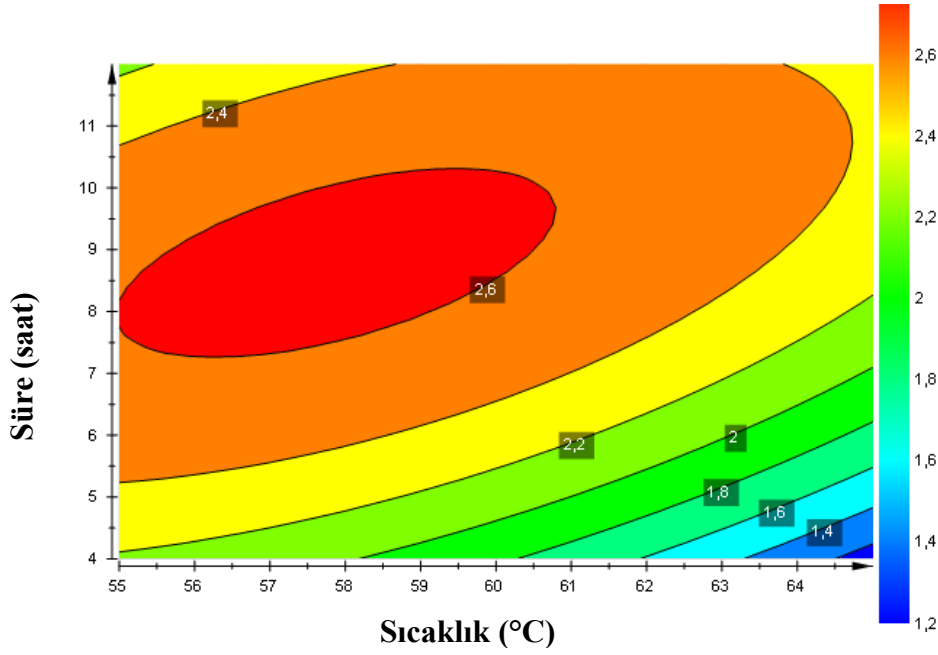


Şekil 4.2 : Reaksiyon sonuçları ile oleik asit katılımına ait modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki.

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’deki grafiklerden de görüldüğü üzere, deney sonucunda gözlenen değerler ile modellerden tahminlenen değerler arasındaki ilişki yüksek oranda lineerlik göstermektedir. Bu aynı zamanda, modelin, çoğunlukla, reaksiyon parametreleri ile tepki (katılım oranı) arasındaki gerçek ilişkiyi temsil ettiğinin bir göstergesidir (Yang ve diğ., 2003).

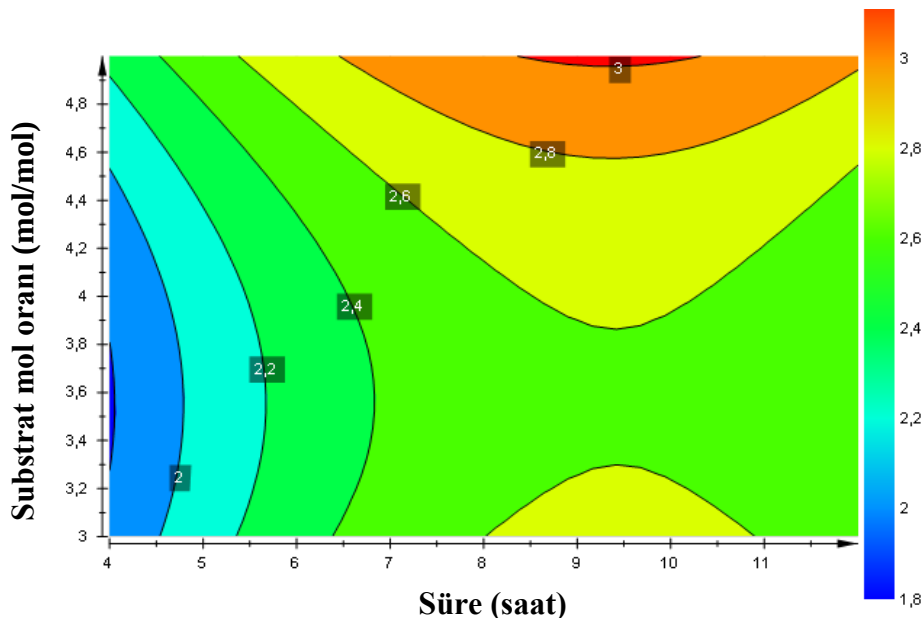
4.2.2 Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması

Enzimatik reaksiyonlar ile elde edilen ürünlerin reaksiyon parametreleri ile olan ilişkisi tepki-yüzey grafikleriyle de incelenmiştir. Şekil 4.3’te yer alan grafikte SDA katılımına reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresinin etkisi gösterilmektedir. Bu izdüşüm grafiği “maksimum tepki” grafiği olarak da isimlendirilmektedir (Montgomery, 2005). Grafik incelendiğinde, orta noktadan uzaklaşıldıkça SDA katılımının azaldığı açıkça görülmektedir. Reaksiyon sıcaklığı 55-60°C civarında ve reaksiyon süresi 7,5-10 saat aralığında iken SDA katılımının yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir.



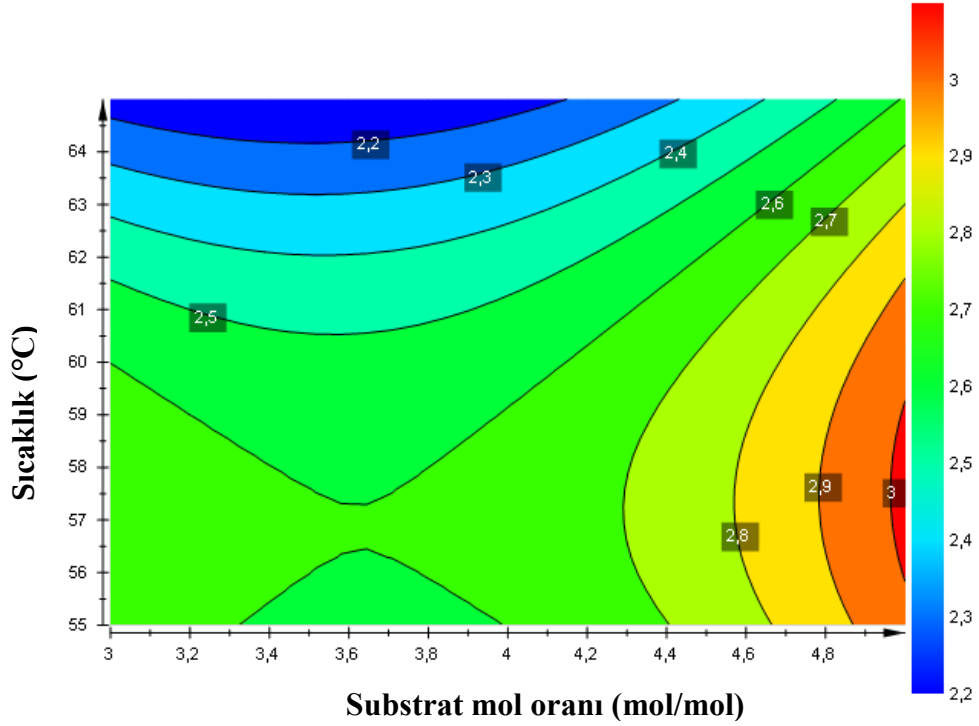
Şekil 4.3 : SDA katılımının sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.

Süre ve mol substrat oranının SDA katılımı üzerindeki etkisi Şekil 4.4'teki izdüşüm grafiğinde gösterilmiştir. "Sırt noktası" grafiği (Montgomery, 2005) olarak da adlandırılan bu grafik incelendiğinde, substrat mol oranı 3,4-4 olduğu bölgede, katılımın süreden bağımsız olduğu görülmektedir. Sürenin 4-6,5 olduğu bölgede katılımın substrat mol oranındaki artıştan etkilenmediği görülmektedir. İncelenen değerler arasında substrat mol oranı 4'ten büyük olduğu ve sürenin 6,5'dan büyük olduğu bölgede katılımın substrat mol oranının artışıyla birlikte arttığı görülmektedir.



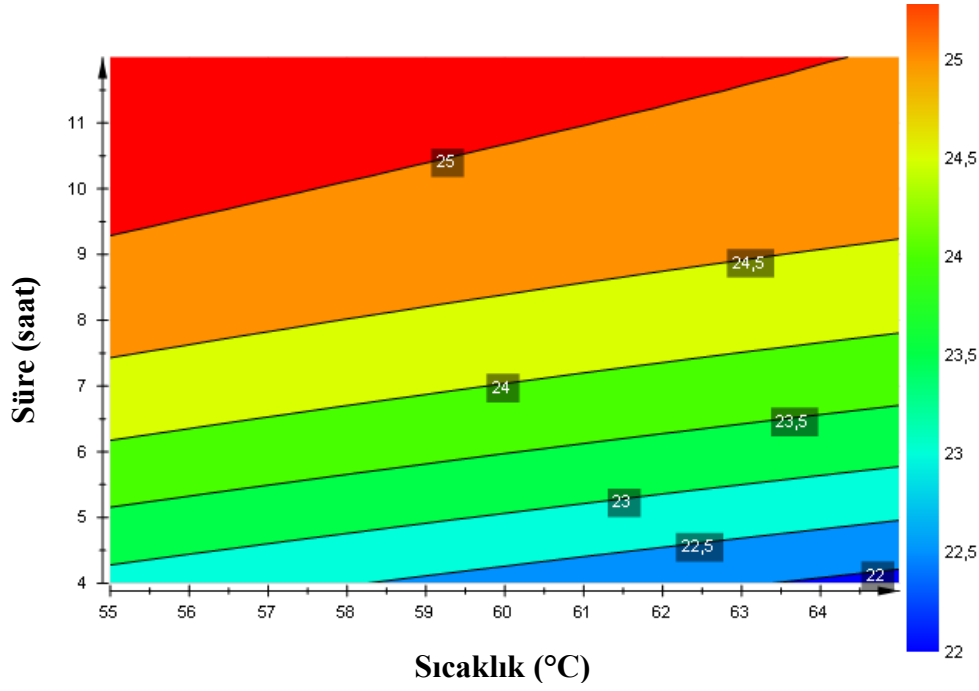
Şekil 4.4 : SDA katılımının süre ve mol substrat oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.

Mol substrat oranı ve sıcaklığın SDA katılımı üzerindeki etkisinin gösterildiği izdüşüm grafiği Şekil 4.5'te yer almaktadır. Grafikten görüleceği gibi, mol substrat oranı arttıkça SDA katılımı da artmaktadır. Reaksiyon sıcaklığının 55-60°C olduğu aralıktan uzaklaştıkça SDA katılımının azaldığı görülmektedir. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'teki grafikler “sırt noktası” grafikleri olarak da isimlendirilmektedir (Montgomery, 2005).



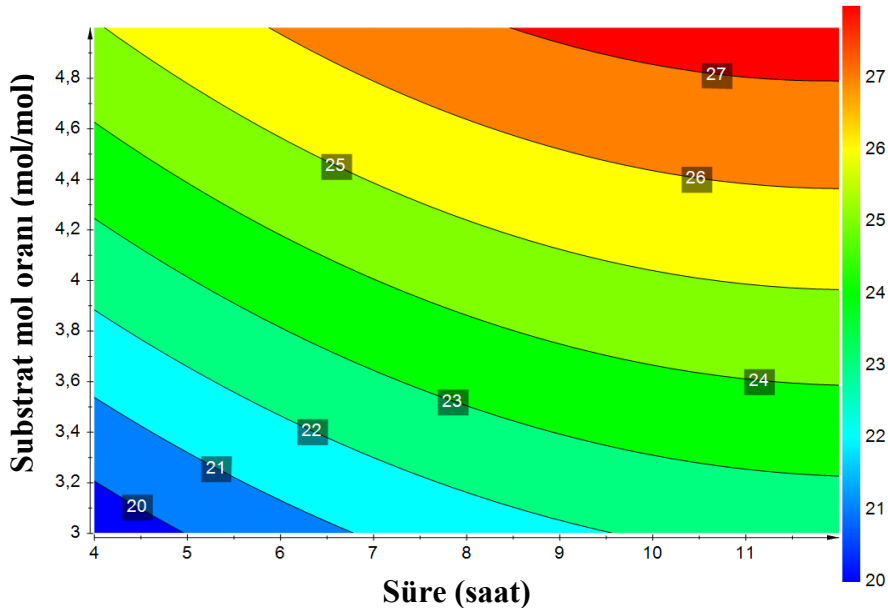
Şekil 4.5 : SDA katılımının mol substrat oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.

Reaksiyon parametrelerinin oleik asit katılımı üzerindeki etkisinin gösterildiği izdüşüm grafikleri Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de yer almaktadır. Aşağıda bulunan Şekil 4.6'da oleik asit katılımına sıcaklık ve sürenin etkisi gösterilmiştir. Sıcaklık değişimlerinin oleik asit katılımını etkilemediği, sürenin artması ile oleik asit katılımının sıcaklıktan bağımsız bir şekilde arttığı görülmektedir.



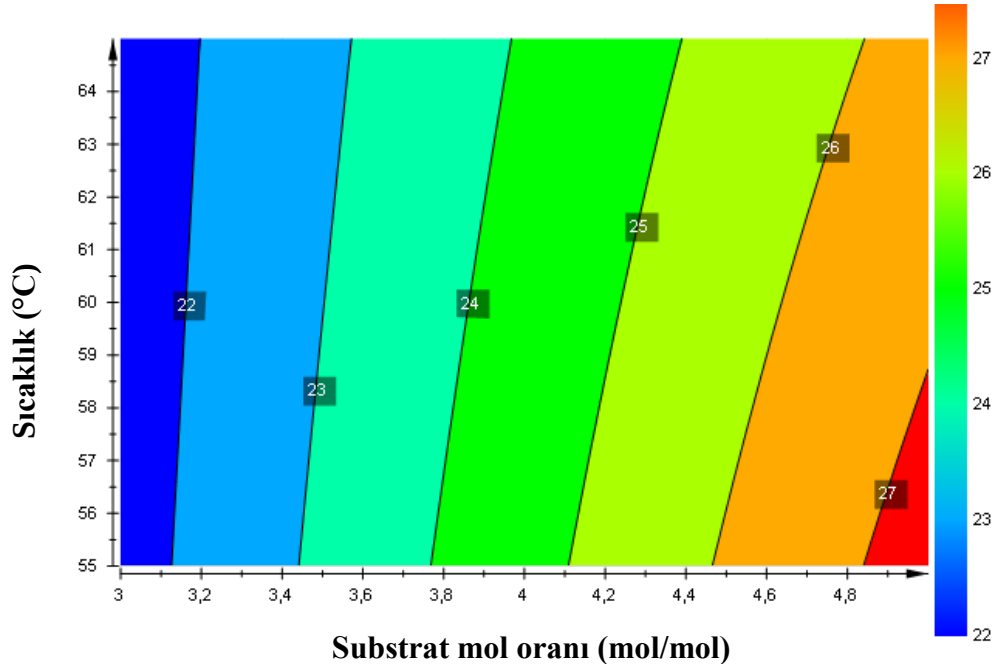
Şekil 4.6 : Oleik asit katılımının sıcaklık ve süre ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.

Süre ve mol substrat oranının oleik asit katılımı üzerindeki etkisi Şekil 4.7’deki izdüşüm grafiğinde gösterilmiştir. Bu grafik incelendiğinde, substrat mol oranı ve süredeki artışın oleik asit katılımını da arttırdığı görülmektedir.



Şekil 4.7 : Oleik asit katılımının süre ve mol substrat oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.

Şekil 4.8’de ise oleik asit katılımına substrat mol oranı-sıcaklık etkisi gösterilmiştir. Bu grafiğe göre, substrat mol oranındaki artış sıcaklıktan bağımsız olarak oleik asit katılımı arttırmıştır.



Şekil 4.8 : Oleik asit katılımının substrat mol oranı ve sıcaklık ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği.

Bu çalışmada, deney parametreleri olarak seçilen sıcaklık, süre ve substrat mol oranının SDA ve oleik asit katılımı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çizelge 4.4'te yer alan sonuçlar irdelendiğinde reaksiyon süresi ve substrat mol oranının SDA katılımını pozitif, reaksiyon sıcaklığının ise negatif yönde etkilediği görülmektedir. Ayrıca, sıcaklık-süre etkileşiminin de SDA katılımına pozitif etki gösterdiği açıkça görülmektedir. Çizelge 4.5'deki veriler incelendiğinde ise reaksiyon süresi ile substrat mol oranının oleik asit katılımına pozitif bir etkisinin olduğu; substrat mol oranının süreden daha çok etki gösterdiği görülmektedir.

Sıcaklığın SDA katılımı üzerindeki etkisini gösteren izdüşüm grafikleri incelendiğinde, reaksiyon sıcaklığındaki artışın SDA katılım oranını arttırdığı, ancak optimum sıcaklık değeri olan 60°C'den yüksek noktalarda SDA katılımının azaldığı gözlenmektedir. Bunun nedeni olarak, termodinamik bir proses olan açıl göçünün ("acyl migration") sıcaklık artışına bağlı olarak artması gösterilmiştir (Yang ve diğ., 2005). Buna ek olarak, yüksek sıcaklıkların enzim ile reaktanlar arasındaki üretken çarpışmaların hızını arttırdığı, dolayısıyla reaksiyon hızının arttığı, ancak daha yüksek sıcaklıklarda ise enzim inaktivasyonundaki artışa bağlı olarak katılım oranında düşüş gözlemlendiği belirtilmiştir (Maduko ve diğ., 2007). Enzim aktivitesi, enzimin bulunduğu çevre ısındıkça, maksimum bir hıza ulaşana dek artmaktadır. Enzim bu hıza optimum sıcaklıkta ulaşmaktadır. Sıcaklık optimum seviyeyi

geçtiğinde ise reaksiyon hızı birden düşüş göstermektedir. Bunun nedeni, enzimi üç boyutlu şeklinde tutan hidrojen bağları ve diğer zayıf etkileşimlerin çevredeki sıcaklık değişimlerine duyarlı olmasıdır (Senanayake ve Shahidi, 1999).

Literatürde yer alan enzimatik sentez ile yapılandırılmış yağ elde edilen bir çalışmada, Hamam ve Shahidi (2005) Omega-Gold (DHA ve DPA miktarı yüksek tek hücre yağı) ve kaprik asit kullanmış ve reaksiyon sıcaklığının 45°C'ye kadar yükseltilmesi ile kaprik asit katılımının arttığını; 45°C'de reaksiyon sıcaklığının optimum seviyeye ulaştığını ve bu sıcaklıktan daha yüksek reaksiyon sıcaklıklarında ise kaprik asit katılımının azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, hoda yağı ve kaprilik asidin enzimatik reaksiyonlarda kullanılarak yapılandırılmış yağ eldesinin gerçekleştiği bir çalışmada, Kim ve diğ. (2010), reaksiyon sıcaklığının kaprilik asit katılımı üzerindeki etkisini incelemek üzere 10-70°C sıcaklık aralığını kullanmışlardır. Çalışma sonucunda, sıcaklığın 40°C'ye kadar yükseltilmesinin kaprilik asit katılımını arttırdığı, fakat daha yüksek sıcaklık artışının katılım oranını etkilemediği sonucuna ulaşılmıştır.

Reaksiyon sıcaklığının oleik asit katılımı üzerindeki etkisi ele alınacak olursa eğer, sıcaklık artışıyla birlikte oleik asit katılımının da arttığı söylenebilir. Literatürde yer alan anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ çalışmaları incelendiğinde, Sahin ve diğ. (2005a)'in tripalmitin, fındık SYA ve GLA konsantresini ve Sahin ve diğ. (2005b)'in tripalmitin, fındık SYA ve omega-3 YA'larını substrat olarak kullandıkları, lipaz enzimlerince katalizlenen enzimatik reaksiyonlarda da sıcaklık artışına bağlı olarak oleik asit katılımında artış gözlenmiştir.

Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağlarda en önemli husus, anne sütü yağlarında da olduğu gibi, sn-2 pozisyonunda bulunan palmitik asittir. Esterifikasyon reaksiyonu boyunca açıl migrasyonu sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarında bir azalmaya neden olabilmektedir (Schmid ve diğ., 1998). Açıl göçünün düşük oranda gerçekleşmesi, üretilen TAG'ların sn-2 pozisyonundaki palmitik asidi muhafaza etmek ve aynı zamanda, bebeklerde optimal TAG ve kalsiyum emilimini sağlamak için oldukça önemlidir (Nielsen ve diğ., 2006). Bu nedenle, iyi verim sağlamak için gerekli en kısa süreyi belirleyerek enzimatik reaksiyonların takibini sağlamak çok önemlidir (Ahoh ve Moussata, 1998). Ayrıca, reaksiyon süresinin katılım oranları üzerindeki etkisinin belirlenmesi, en yüksek verimin elde edildiği en

kısa reaksiyon süresinin tespit edilerek üretim maliyetlerinin azaltılmasına olanak sağlamaktadır (Senanayake ve Shahidi, 1999).

SDA ve oleik asit katılımına ait izdüşüm grafiklerine bakıldığında, reaksiyon süresindeki artışın SDA ve oleik asit katılımını arttırdığı görülmektedir. Literatürde yer alan yapılandırılmış yağlarla ilgili çalışmalar incelendiğinde, enzimatik reaksiyonlarda substrat olarak ayçiçeği yağı ve kaprilik asit kullanan Yang ve diğ. (2003b), ayçiçek yağı ile kaprik asidi kullanan Mu ve diğ. (1998) gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda reaksiyon süresinin artması ile katılımın arttığını gözlemlemişlerdir.

Buna ek olarak, Sahin ve diğ. (2005a)'in tripalmitin, fındık SYA ve GLA konsantresini, Sahin ve diğ. (2005b)'in tripalmitin, fındık SYA ve omega-3 YA'larını ve Maduko ve diğ. (2007)'in tripalmitin ve bitkisel yağ karışımlarını substrat olarak kullandıkları enzimatik reaksiyonlarda da reaksiyon süresinin artması oleik asit katılımındaki bir artış ile sonuçlanmıştır.

Substrat miktarının fazla olması, ekonomik açıdan değerlendirildiğinde, maliyeti arttırdığı için avantaj sağlamamakla birlikte lipazların doygunluğa erişerek substrat inhibisyonuna da neden olabilmektedir (Jennings ve Akoh, 1999; Senanayake ve Shahidi, 2004). Ayrıca, substrat mol oranının seçimi aynı zamanda saflaştırma maliyeti ve serbest yağ asitlerinin ya da açıl vericilerin buharlaştırma ve/veya distilasyon ile ayrılması ile de ilişkilidir. Bu nedenle, enzimatik reaksiyonlarda uygun bir substrat mol oranı seçmek gerekmektedir (Yang ve diğ., 2003a).

SDA ve oleik asit katılımlarına ait izdüşüm grafiklerinden de görüleceği üzere, substrat mol oranının artması her iki yağ asidinin katılım oranının artması ile sonuçlanmıştır. Substrat mol oranındaki artışın katılım oranını arttırması literatürde yer alan yapılandırılmış yağlarla ilgili çalışmalarda da gözlenmektedir: Senanayake ve Shahidi (2004) eşekotu yağı ve DHA; Hamam ve Shahidi (2005) Omega-Gold (DHA ve DPA miktarı yüksek tek hücre yağı) ve kaprik asit; Lumor ve Akoh (2005) palm yağı ve palm çekirdeği yağının karışımı ile stearik asit ve Sharma ve diğ. (2009) keten tohumu yağı ve yerfıstığı yağı ile yaptıkları çalışmalarda, substrat mol oranının artması ile katılım oranının da arttığını kaydetmişlerdir.

Çizelge 4.3'teki veriler incelendiğinde tüm deney noktalarından elde edilen veriler göz önüne alınacak olunursa, en yüksek SDA katılım miktarı olan %3,7 ve en yüksek

oleik asit katılım miktarı olan %28,9 oranlarının 60°C, 8 saat ve 5,67 mol/mol substrat mol oranında gerçekleşen reaksiyonlar sonucu elde edildiği görülmüştür. Bu reaksiyon koşullarında elde edilen LA katılım miktarının %9,9, GLA katılım miktarının %3,67 ve ALA katılım miktarının ise %9,68 olduğu tespit edilmiştir.

Deney parametrelerinin etkileşimini gösteren tepki yüzey izdüşüm grafikleri incelendiğinde, optimum sıcaklık aralığının 55-60°C, reaksiyon süresi aralığının 7-10 saat ve substrat mol oranının 4-5 mol/mol aralığında olduğu söylenebilir.

4.2.3 Modelin doğrulanması ve büyük ölçekte üretim

Tepki yüzey yöntemi ile elde edilen SDA ve oleik asit katılımına ait modelin doğruluğunun tespiti için hem küçük ölçekte hem de büyük ölçekte üretim gerçekleştirilmiştir. SDA ve oleik asit katılımına ait izdüşüm grafiklerine göre belirlenen optimum reaksiyon koşullarından seçilen koşullarda 2 paralel olacak şekilde deneyler gerçekleştirilmiştir. Düşük substrat mol oranında gerçekleşecek olan reaksiyon hem substrat maliyetini hem de saflaştırma maliyetini azaltacağı için (Yang ve diğ., 2003a) reaksiyon sıcaklığı 60 °C, reaksiyon süresi 8 saat ve substrat mol oranı 4 mol/mol optimum koşul olarak seçilmiştir. Bu koşullar için modelden tahminlenen SDA katılımı %2,5 mol ve tahminlenen oleik asit katılımı %24 mol olarak tespit edilmiştir. Belirlenen optimum koşulda ilk olarak küçük ölçekte üretim yapılarak modelin doğrulanması gerçekleştirilmiş ve ardından büyük ölçekte üretim yapılmıştır. Enzimatik reaksiyon sonucu elde edilen YY'lerin yağ asidi kompozisyonu Çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 : Optimum koşullarda küçük ölçek ve büyük ölçekte üretilen YY'lerin yağ asidi kompozisyonu (%mol).

Yağ Asidi	Küçük ölçek		Büyük ölçek	
	TAG	sn-2	TAG	sn-2
C14:0	1,1	-	0,2	-
C16:0	50,2	54,8	53,8	46,2
C18:0	3,1	9,2	2,4	9,9
C18:1n-9	23,4	17,7	22,9	19,7
C18:2n-6	8,3	3,3	8,5	5,8
C18:3n-6	2,0	8,3	1,9	9,7
C18:3n-3	8,6	-	8,2	-
C18:4n-3	2,2	6,7	2,0	8,6
C20:0	0,2	-	0,2	-

Çizelge 4.7’de görüldüğü üzere optimum koşullarda gerçekleşen küçük ve büyük ölçekte elde edilen YY’lerin içerdiği SDA miktarı sırasıyla %2,2 ve %2,0, oleik asit miktarı ise sırasıyla %23,4 ve %22,9 olarak tespit edilmiştir. Elded edilen YY’lerin SDA ve oleik asit miktarının modelden tahminlenen değerlere yakın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, küçük ölçekte ve büyük ölçekte elde edilen YY’lerin sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarının sırasıyla %54,8 ve %46,2 olduğu belirlenmiştir.

4.2.4 Yağların oksidatif stabilitesi

Enzimatik reaksiyonlar için kullanılan fındık yağı, Omega Vega yağ karışımı, büyük ölçekte üretilen yapılandırılmış yağların oksidatif stabilitelere ait elde edilen indüksiyon süreleri Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 : Deneysel çalışmalarda kullanılan yağ kaynaklarının ve büyük ölçekte üretilen YY’nin indüksiyon süreleri.

Yağ Kaynağı	İndüksiyon süresi (saat)
Fındık yağı	21,76
Omega Vega	1,29
YY	6,08

Oksidatif stabilite özellikle doymamış yağ içeren yenilebilir yağların ve gıda maddelerinin kalitesinin belirlenmesindeki en önemli faktördür (Martin ve diğ., 2010). Gıdalarda yer alan çeşitli yağ bileşenlerinin oksidasyonu gıdaların besinsel değerini düşürmekte, istenmeyen koku ve tat oluşumuna neden olmakta ve gıdaların raf ömrünü azaltmaktadır (Verleyen ve diğ., 2005; Bartee ve diğ., 2007).

Çizelge 4.8’de görüleceği üzere, yüksek oranda ÇDYA içeren Omega Vega yağ karışımının oksidatif stabilitesi fındık yağı ve YY’nin oksidatif stabilitesine göre düşük çıkmıştır. Bunun nedeni, doymamış yağ asitlerinin içerdikleri çift bağdan ötürü doymuş yağ asitlerine oranla daha kolay serbest radikale dönüştürülmesidir (Kamal-Eldin ve Pakorný, 2005). Çünkü, tüm yağ asitlerinin içerisinde ÇDYA oldukça kararsız moleküllerdir; ve doymamış çift bağların konsantrasyonu arttıkça yağların stabilitesi azalmakta, bunun sonucunda da yağlar oksidasyona daha duyarlı hale gelmektedir (Bartee ve diğ., 2007; Martin ve diğ., 2010).

Bu çalışmada enzimatik asidoliz ile büyük ölçekte üretimi gerçekleştirilen YY'nin Omega Vega'dan daha yüksek oksidatif stabiliteye sahip olması, YY'nin bileşiminde yüksek oranda palmitik asit içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü, YY'lerdeki TAG'ların yağ asidi kompozisyonu, gliserol molekülündeki pozisyonel dağılımı ve bu iki faktörün birbiri ile etkileşimi YY'lerin oksidatif stabilitesini etkileyen önemli parametrelerdir (Martin ve diğ., 2010).

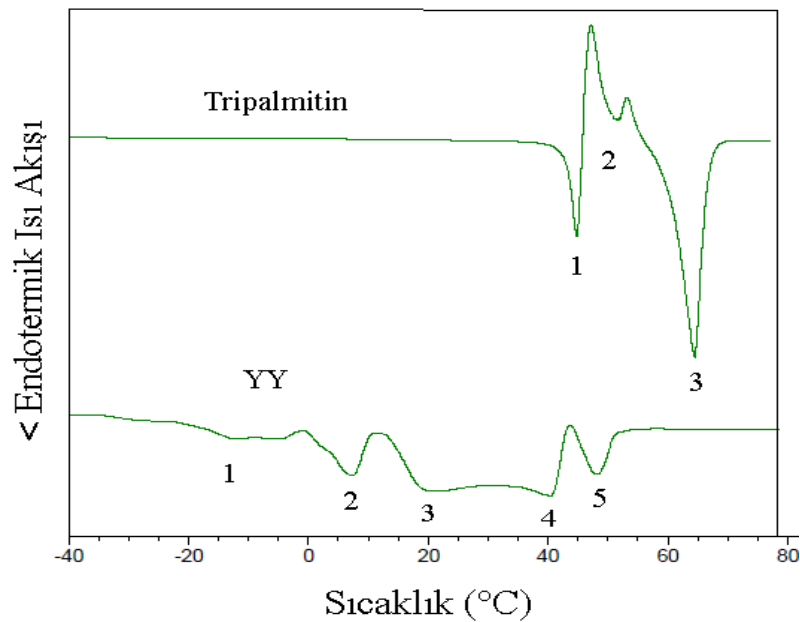
Genel olarak, birçok çalışmada, başlangıç yağ kaynağı ile karşılaştırılan YY'lerin oksidatif stabilitelerinde azalma olduğu belirtilmiştir (Martin ve diğ., 2010). Seriburi ve Akoh (1998)'un yaptığı bir çalışmada, domuz yağı ve yüksek-oleik ayçiçek yağının kullanıldığı enzimatik reaksiyonlar ile plastik yağ üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan %84,7 oranında oleik asit içeren yüksek-oleik ayçiçek yağının, %40,9 oleik asit ve %23,7 plamitik asit (sn-2 pozisyonunda %63,4 palmitik asit) içeren domuz yağından daha yüksek oksidatif stabiliteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, domuz yağı ve yüksek-oleik ayçiçek yağı içeren fiziksel yağ karışımının YY karışımından daha stabil olduğu, interesterifikasyon reaksiyonunun fiziksel yağ karışımının oksidatif stabilitesini düşürdüğü belirtilmiştir. Bunun nedeni, SYA tayininden artakalan sabun ve/veya ürün karışımının saflaştırılması esnasında tokoferollerin de uzaklaştırılması ile açıklanmaktadır.

Literatürde yer alan bir başka çalışmada ise hindistancevizi, aspir ve soyafasülyesi yağı karışımı (B1) ve hindistancevizi, aspir, soyafasülyesi ve balık yağı içeren karışımın (BFO) yağ kaynağı olarak kullanıldığı enzimatik reaksiyonlar ile anne sütü yağına benzer YY üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan oksidatif stabilite analizleri sonucunda yüksek oranda doymuş yağ içeren hindistancevizi yağının diğer yağlar içinde en yüksek, balık yağının ise yüksek miktarda doymamış yağ içeriğinden ötürü en düşük oksidatif stabiliteye sahip olduğu bulunmuştur. B1 ve BFO yağ karışımlarından enzimatik yöntemle elde edilen YY'nin oksidatif stabiliteleri yağ kaynakları olan B1 ve BFO'ya göre düşük çıkmıştır. Elde edilen YY'nin düşük stabilite olması, kısa-yollu distilasyon işlemi esnasında tokoferol ve fosfolipitlerin de uzaklaştırılması ile bağlantılı olabileceği belirtilmiştir. Ancak, YY'lere eklenen tokoferollerin YY oksidatif stabilitesini arttırdığı ve yağ kaynakları olan B1 ve BFO ile kıyaslanabilir düzeylerde oksidatif stabiliteye sahip olduğu gözlenmiştir. (Maduko ve diğ., 2008).

Doymamış yağ asitlerince zengin yapılandırılmış yağlar veya bu yağları içeren gıda maddeleri depolama süresince bozulabilir ve ayrıca oksidasyonu niteleyen kötü tat ve koku oluşumuna neden olabilir (Martin ve diğ., 2010). Yapılan birçok çalışma, saflaştırma işleminden sonra tokoferoller gibi doğal antioksidanların uzaklaştırılmasından ötürü YY'lerin oksidatif stabilitesinin azaldığını göstermektedir (Jennings ve Akoh, 2009). YY'ler gıda ürünlerine eklenebilecekleri için, bu gıdaların kabul edilebilir duyuşal özellikte olması bakımından, YY'lerin geleneksel yağlarla kıyaslandıklarında kabul edilebilir duyuşal kalite ve oksidatif stabiliteye sahip olmaları önemlidir . Bu nedenle ürün formülasyonlarına antioksidanların eklenmesi önerilmektedir (Nielsen ve diğ., 2004).

4.2.4 Yağların erime profilleri

DSC Q10 (TA Instruments, New Castle, DA) cihazı ile erime profilleri analiz edilen tripalmitin ve büyük ölçekte üretimi gerçekleştirilen YY'ye ait DSC termogramları aşağıda yer alan Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.9 : Tripalmitin ve büyük ölçekte üretilen YY'ye ait DSC termogramı.

Literatürde yer alan gliseril tripalmitata ait yağ asidi kompozisyonu şu şekildedir: palmitik asit (~%93,78), stearik asit (~%3,86), oleik asit (%0.02) ve araşidonik asit (%0.02). Şekil 4.9'da yer alan DSC termogramı incelendiğinde gliseril tripalmitatın karakteristik geçişleri görülebilmektedir (Toro-Vazquez ve diğ., 2009). Buna göre, tripalmitin termogramının üç erime noktası (1, 2 ve 3) içerdiği görülmektedir. Bu

erime noktalarının, ilk endotermik pikin (1) olduğu $\sim 45^{\circ}\text{C}$, ikinci endotermik pikin (2) gözleendiği $\sim 52,5^{\circ}\text{C}$ ve son endotermik pikin (3) gözleendiği $\sim 65^{\circ}\text{C}$ 'de olduğu görölmektedir. Tripalmitinin erime noktalarına ait bu sıcaklık değerleri literatürde yer alan tripalmitinin erime profilinin incelendiği bir çalışma ile tutarlılık göstermektedir (Toro-Vazquez ve diğ., 2009).

Buna ek olarak, tripalmitinin $\sim 65^{\circ}\text{C}$ 'de bulunan yüksek sıcaklıkta eriyen bileşeninin, tripalmitinin asidolizi sonrasında kaybolduğu görölmektedir. Buna benzer bir durum, domuz yağı ve yüksek-oleik ayçiçek yağının interesterifikasyon reaksiyonu ile plastik yağların elde edildiği bir çalışmada gözlenmiştir. Domuz yağının $29,2^{\circ}\text{C}$ 'de gözlenen yüksek sıcaklıkta eriyen bileşeninin, interesterifikasyon reaksiyonu sonrasında görülmediği belirtilmektedir (Seriburi ve Akoh, 1998). Çünkü yağların TAG kompozisyonu ile fiziksel özellikleri arasında doğrudan bir ilişki vardır. Yağ asitlerinin çeşidi TAG'ın erime davranışını belirlemektedir. Ayrıca, gliserol molekülünde yer alan YA'ların pozisyonu da yapıyı, dolayısıyla erimeyi etkilemektedir (Rousseau ve Marangoni, 2002). Bu nedenle, TAG kompozisyonundaki bir değişim fiziksel davranışları, özellikle erime davranışını etkilemektedir (Gustone, 2006).

Şekil 4.9'daki büyük ölçekte üretimi gerçekleştirilen YY'ye ait DSC termogramına bakıldığında, elde edilen YY'nin -14°C ile $47,5^{\circ}\text{C}$ arasında oldukça geniş bir erime aralığı gösterdiği gözlenmektedir. Doymuş yağ oranının yüksek olması, yüksek sıcaklıktaki erime piklerinin oluşmasına yol açmıştır (Pina-Rodriguez ve Akoh, 2009).

YY'ye ait DSC termogramında iki büyük endotermik pikin (2 ve 5) yer aldığı görölmektedir. Bu pikler, sırasıyla, yaklaşık olarak 7°C ve 48°C 'deki erime noktalarını göstermektedir. Tripalmitin ile YY termogramları karşılaştırıldığında, YY'nin erime aralığının tripalmitinin erime aralığına göre geniş olduğu gözlenmektedir. Bunun nedeni ise YY'nin tripalmitine göre doymamış yağ asidi içeriğinin daha fazla olmasıdır. Çünkü enzimatik esterifikasyonlar ile yağ asidi kompozisyonu değiştirilen yağların erime özelliklerinin, başlangıç substratları ile karşılaştırıldığında farklı olması beklenmektedir (Seriburi ve Akoh, 1998).

Ayrıca, tripalmitine eklenen doymamış yağ asitlerinin varlığı, elde edilen YY'nin DSC termogramında yer alan yüksek sıcaklıktaki erime piklerinin daha kısa olmasını

açıklamaktadır (Pina-Rodriguez ve Akoh, 2009). Bunun benzeri bir durum Pina-Rodriguez ve Akoh (2009)'un amarant yağı ve DHA ile zengin tek hücre yağını enzimatik reaksiyonlarda susbtrat olarak kullanıp anne sütü yağına benzer YY elde ettiği çalışmada da gözlenmiştir. Amarant yağına enzimatik yöntemle eklenen DHA'nın, yüksek sıcaklıktaki erime piklerinin daha kısa olmasına yol açtığından bahsedilmektedir. Ayrıca, doymuş yağ içeriği amarant yağına göre yüksek olan YY'nin daha geniş bir erime aralığı gösterdiği belirtilmiştir.

Hindistancevizi, aspir ve soyafasülyesi yağı karışımı (B1) ve hindistancevizi, aspir, soyafasülyesi ve balık yağı içeren karışımın (BFO) yağ kaynağı olarak kullanıldığı enzimatik reaksiyonlar ile anne sütü yağına benzer YY üretiminin yapıldığı bir çalışmada, B1 ve BFO yağ karışımlarından elde edilen YY'lerin diğer yağlara nispeten daha yüksek erime profiline sahip olduğu belirtilmektedir. Bunun nedeni, YY'lerin yağ karışımlarına oranla daha fazla doymuş yağ içermesi ile açıklanmaktadır. Ayrıca, BFO karışımının B1 karışımına göre daha düşük ve dar erime aralığı göstermesinin nedeni BFO karışımının balık yağı içermesine bağlanmıştır. Çünkü her yağ asidi özgün bir erime noktasına sahiptir. Doymuş yağ asitlerinin erime noktası zincir uzunluğu ile artmakta ve yağ asitlerinin doymamışlıkları arttıkça erime noktası düşmektedir. Belli bir uzunluktaki yağ asidi için, doymuş yağ asidi doymamış yağ asitlerinden daha yüksek erime noktasına sahip olacaktır (O'Brien, 2004).

5. SONUÇ

Bu çalışmada, ülkemize özgü bir ürün olan fındık yağı kullanılarak sn-1,3 spesifik lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimeleri ile bebeklerin büyümesi ve gelişimi açısından önemli özelliklere sahip, çoklu doymamış ve omega-3 yağ asidi olan stearidonik asit ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların üretilmesi amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen enzimatik asidoliz reaksiyonları *Thermomyces lanuginosus*'dan elde edilen ve sn-1,3 spesifik bir lipaz olan Lipozyme® TL IM enzimi tarafından katalizlenmiş olup, substrat olarak tripalmitin, fındık yağı serbest yağ asitleri ve Omega Vega™ serbest yağ asitleri kullanılmıştır.

Ayrıca, seçilen reaksiyon parametreleri olan reaksiyon sıcaklığı (T, °C), reaksiyon süresi (t, saat) ve substrat mol oranının (Sr, mol/mol) reaksiyon ürünleri üzerindeki etkisini incelemek üzere Tepki Yüzey Yöntemi (TYY) kullanılarak 3 faktörlü, 5 seviyeli Birleşik Deney Tasarımı gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar sonucunda seçilen tepkiler [SDA miktarı (%) ve oleik asit miktarı (%)] için, “çoklu regresyon” ve “geriye dönük eleme” yöntemleri uygulanarak uygun kuadratik modeller elde edilmiştir.

SDA ve oleik asit katılımı için çoklu regresyon analizi, geriye dönük eleme yöntemleri ile tepkilere ait uygun kuadratik modeller oluşturulmuş; varyans analizi yapılarak, elde edilen veriler ile oluşturulan modellerin uygunluğu incelenmiştir.

Deney tasarımındaki tüm deney noktalarından elde edilen veriler göz önüne alındığında, en yüksek stearidonik asit katılım miktarı (%3,7) en yüksek oleik asit katılım miktarı (%28,9) 60°C, 8 saat ve 5,67 mol/mol substrat mol oranında gerçekleşen reaksiyon koşullarında elde edilmiştir. Deney parametrelerinin etkileşimini gösteren tepki yüzey izdüşüm grafikleri incelendiğinde, optimum sıcaklık aralığının 55-60°C, reaksiyon süresi aralığının 7-10 saat ve substrat mol oranının 4-5 mol/mol aralığında olduğu belirlenmiş ve optimum deney koşulu olarak sıcaklık 60 °C, süre 8 saat ve substrat mol oranı 4 mol/mol olarak seçilmiştir. Belirlenen optimum koşulda küçük ölçekte elde edilen YY'nin SDA miktarının

%2,2 ve oleik asit miktarının %23,4 olduğu bulunmuştur. Bu değerlerin modelden tahminlenen SDA miktarı (%2,5) ve oleik asit miktarı (%24) ile benzer olduğu görülmüştür. Buna ek olarak, belirlenen optimum koşulda büyük ölçekte üretim gerçekleştirilerek elde edilen YY'nin karakterizasyonu yapılmıştır. Büyük ölçekte üretilen YY'nin SDA miktarının %2,0 ve oleik asit miktarının ise %22,9 olduğu tespit edilmiş ve bu değerlerin küçük ölçekte üretilen YY'nin SDA ve oleik asit içeriğine yakın olduğu belirlenmiştir. Sn-2 pozisyonel analizi gerçekleştirilen küçük ölçekte ve büyük ölçekte üretilen YY'lerin sn-2 pozisyonundaki palmitik asit miktarı sırasıyla %54,8 ve %46,2 olarak bulunmuştur. Ayrıca, büyük ölçekte üretilen YY'nin oksidatif stabilitesi belirlenmiş ve indüksiyon süresi 6,08 saat olarak bulunmuştur. Ayrıca bu YY'nin erime profili analizi gerçekleştirilerek elde edilen sonuca göre büyük ölçekte üretilen YY'nin tripalmitine göre daha geniş bir erime profiline sahip olduğu belirlenmiştir.

Stearidonik asitin EPA ve DHA'ya dönüşümündeki ara bir metabolit olması, vücutta EPA ve DHA'ya benzer etkiler göstermesi ve bazı eikosanoidlerin öncül molekülü olması sağlık açısından son derece önemlidir. Besinlerle alınan ALA'nın EPA ve DHA'ya dönüşüm oranının düşük olması, EPA ve DHA bakımından zengin bir kaynak olarak kullanılan balık yağlarının kokusunun ve tadının göreceli olarak kötü olması, az miktarlarda da olsa dioksinler, PCB'ler ve civa vb. ağır metaller gibi toksik maddeler içermesi bitkisel yağ kaynaklarında doğal olarak bulunan SDA'yı önemli bir yağ asidi yapmaktadır.

Bu çalışmada üretilen yapılandırılmış yağlarda sağlık açısından faydalı etkileri olan ve ülkemiz için ekonomik öneme sahip fındık yağının kullanılması, ve sağlık üzerine olumlu potansiyel etkiler gösteren substrat yağının kullanılması önem taşımaktadır.

Ayrıca, anne sütü yağına benzer YY'lerin bebek beslenmesi ve gelişimi için önemli yağ asitleri olan SDA, GLA, LA ve ALA yağ asitleri ile zenginleştirilmesi ve aynı zamanda anne sütü yağının yağ asidi bileşiminin ürüne kazandırılması nedeniyle, elde edilen YY'lerin bebek formüllerinde fonksiyonel bileşen olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Agostoni, C.**, 2010. Docosahexaenoic acid (DHA): From the maternal–foetal dyad to the complementary feeding period, *Early Human Development*, **86** (Suppl.), S3–S6.
- Ahmed, S. U., Reddy, K. K., Swathy, S. L., Singh, S. K., Kanjilal, S., Prasad, R. B. N. and Pandey, A.**, 2009: Enrichment of γ -linolenic acid in the lipid extracted from *Mucor zycha* MTCC 5420, *Food Research International*, **42**, 449-453.
- Akoh, C. C.**, 1996. Enzymatic modification of lipids, in *Food Lipids and Health*, pp. 117-138, Eds. McDonald, R. E. and Min, D. B., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Akoh, C. C. and Kim, B. H.**, 2007. Structured lipids, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, p. 841-873, Eds. Akoh, C. C. and Min, D. B., CRC Press, Boca Raton.
- Akoh, C.C and Moussata, C.O.**, 1998: Lipase-catalyzed modification of borage oil: incorporation of capric and eicosapentaenoic acids to form structured lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 697-701
- Akoh, C. C., Lee, K-T and Fomuso, L. B.**, 1998. Synthesis of positional isomers of structured lipids with lipases as biocatalysts, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use*, pp. 46-72, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Akoh, C. C. Sellappan, S., Fomuso, L. B. and Yankah, V. V.**, 2002. Enzymatic synthesis of structured lipids, in *Lipid Biotechnology*, pp. 432-460, Eds. Kuo, T. M. and Gardner, H. W., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Akoh, C. C. and Xu, X.**, 2002. Enzymatic production of Betapol and other specialty fats, in *Lipid Biotechnology*, pp. 461-478, Eds. Kuo, T. M. and Gardner, H. W., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Alasalvar, C., Amaral, J. S., Satır, G. and Shahidi, F.**, 2009: Lipid characteristics and essential minerals of native Turkish hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.), *Food Chemistry*, **113**, 919-925.
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Amaral, J. S. and Oliveira, B. P. P.**, 2008. Compositional characteristics and health effects of hazelnut (*Corylus avellana* L.): an overview, in *Tree Nuts- Composition, Phytochemicals, and Health Effects*, p. 186-214, Eds. Alasalvar, C. and Shahidi, F., CRC Press, Boca Raton.
- Alasalvar, C., Shahidi, F., Liyanapathirana, C.M. and Ohshima, T.**, 2003a: Turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) 1. Compositional characteristics, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3790-3796.

- Alasalvar, C., Shahidi, F., Ohshima, T., Wanasundara, U., Yurttas, H.C., Liyanapathirana, C.M. and Rodrigues, F.B.,** 2003b: Turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.) 2. Lipid characteristics and oxidative stability, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3797-3805.
- Alles, M.S., Scholtens, P.A.M.J. and Bindels, J.G.,** 2004: Current trends in the composition of infant milk formulas, *Current Paediatrics*, **14**, 51-63.
- AOCS Resmi Metodu Cj 1-94,** 1998. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 4th ed, AOCS Press, Champaign, IL.
- Bass, J. K. and Chan, G. M.,** 2006: Calcium nutrition and metabolism during infancy, *Nutrition*, **22**, 1057-1066.
- Berti, M., Johnson, B.L., Dash, S., Fischer, S., Wilckens, R. and Hevia, F.,** 2007. *Echium*: a source of stearidonic acid adapted to the northern great plains in the US, in *Issues in New Crops and New Uses*, pp. 120-125, Eds. Janick, J. and Whipkey, A., ASHP, Virginia.
- Bornscheuer, U. T., Adamczak, M. and Soumanou, M.M.,** 2003. Lipase-catalysed synthesis of modified lipids, in *Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals*, pp. 149-182, Ed. Gustone, F. D., The Oily Press, Bridgwater, England.
- Borsonelo, E. C. and Gauduróz, J. C. F.,** 2008: The role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in development, aging and substance abuse disorders: review and propositions, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **78**, 237-245.
- Brennan, J.T, Salem, N., Sinclair, A.J. and Cunnane, S.C.,** 2009: α -Linolenic acid supplementantion and conversion to n-3 long chain polyunsaturates fatty acids in humans, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **80**, 85-91.
- Camp, J. V., Huyghebaert, A. and Goeman, P.,** 1998. Enzymatic synthesis of structured modified fats, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use*, pp. 20-45, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Carnielli, V.P., Luijendijk, I.H., van Beek, R.H., Boerma, G.J., Degenhart, H.J. and Sauer, P.J.,** 1995a: Effect of dietary triacylglycerol fatty acid positional distribution on plasma lipid classes and their fatty acid composition in preterm infants, *Am. J. Clin. Nutr.*, **62**, 776-781.
- Carnielli, V.P., Luijendijk, I.H., van Goudoever, J.B., Johannes, B., Sulkers, E.J., Boerlage, A.A., Degenhart, H.J. and Sauer, P.J.,** 1996: Structural position and amount of palmitic acid in infant formulas: effects on fat, fatty acid, and mineral balance, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **23**, 5, 553-560.
- Carnielli, V.P., Luijendijk, I.H., van Goudoever, J.B., Sulkers, E.J., Boerlage, A.A., Degenhart, H.J. and Sauer, P.J.,** 1995b: Feeding premature newborn infants palmitic acid in amounts and stereoisomeric position similar to that of human milk: effects on fat and mineral balance, *Am. J. Clin. Nutr.*, **61**, 1037-1042.

- Chandler, L. C., Quinlan, P. T. and McNeill, G. P.,** 1998. Lipase-catalyzed synthesis of chiral triglycerides, *J. Am. Oil Chem. Soc., Biochemistry*, **75**, 1513-1518.
- Chávez-Servín, J. L., Castellote, A. I., Martín, M., Chifré, R. and López-Sabater, M. C.,** 2009: Stability during storage of LC-PUFA-supplemented infant formula containing single cell oil or egg yolk, *Food Chemistry*, **113**, 484-492.
- Chen, B., Zhang, H., Cheong, L-Z., Tan, T. and Xu, X.,** 2010: Enzymatic Production of ABA-Type Structured Lipids Containing Omega-3 and Medium-Chain Fatty Acids: Effects of Different Acyl Donors on the Acyl Migration Rate, *Food and Bioprocess Technology*, Peer reviewed article in press.
- Chopra, R., Rastogi, N. K. and Sambaiah, K.,** 2009: Enrichment of rice bran oil with α -linolenic acid by enzymatic acidolysis: optimization of parameters by response surface methodology, *Food and Bioprocess Technology*, Peer reviewed article in press.
- Christensen, T. C. and Holmer, G.,** 1993: Lipase-catalyzed acyl-exchange reactions of butter oil, synthesis of a human milk fat substitute for infant formulas, *Milchwissenschaft*, **48**, 543-547.
- Coupland, K.,** 2008: Stearidonic acid: a plant produced omega-3 PUFA and a potential alternative for marine oil fatty acids, *Lipid Technology*, **20**, 7, 152-154.
- Crozier, G.,** 1998. Long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented formula and antioxidant balance in preterm infants, in *Lipids in Infant Nutrition*, pp. 122-132, Eds. Huang, Y-S. and Sinclair, A. J., AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Fernandez-Lafuente, R.,** 2010: Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **62**, 197-212.
- Foresti, M.L. and Ferreira, M.L.,** 2010: Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with capric acid in organic solvent medium: analysis of the effect of experimental conditions through factorial design and analysis of multiple responses, *Enzyme and Microbial Technology*, **46**, 419-429.
- Gebauer, S., Harris, W.S., Kris-Etherton, P.M. and Etherton, T.D.,** 2005. Dietary n-6:n-3 fatty acid ratio and health, in *Healthful Lipids*, pp. 221-248, Eds. C.C. Akoh and O. Lai, AOCS Press, Illinois.
- Gray, D. A., Paynel, G., McClements, D. J., Decker, E. A. and Lad, M.,** 2010: Oxidative stability of *Echium plantagineum* seed oil bodies, *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, **112**, 741-749.
- Guil-Guerrero, J. L., Gómez-Mercado, F., García-Maroto, F. and Campra-Madrid, P.,** 2000a: Occurrence and characterization of oils rich in γ -linolenic acid Part I: *Echium* seeds from Macaronesia, *Phytochemistry*, **53**, 451-456.
- Guil-Guerrero, J. L., Gómez-Mercado, F., García-Maroto, F. and Campra-Madrid, P.,** 2000b: Occurrence and characterization of oils rich in γ -

linolenic acid Part II: fatty acids and squalene from Macaronesian *Echium* leaves, *Phytochemistry*, **54**, 525-529.

- Guil-Guerrero, J. L., Rincón-Cervera, M. A. and Venegas-Venegas, E.,** 2010: Gamma-linolenic and stearidonic acids: purification and upgrading of C18-PUFA oils, *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, **112**, 1068–1081.
- Hamam, F. and Shahidi, F.,** 2005: Enzymatic incorporation of capric acid into a single cell oil rich in docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid and oxidative stability of the resultant structured lipid, *Food Chemistry*, **91**, 583–591.
- Hendricks, G. and Guo, M.,** 2006. Significance of milk fat in infant formulae, in *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*, pp. 467-480, Eds. Fox, P.F. and McSweeney, P.L.H., Springer Science+ Business Media Inc., USA.
- Huang, Y-w. and Huang, C-y.,** 2006. Gamma-Linolenic Acid (GLA), in *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*, pp.169-181, Ed. Shahidi, F., CRC Press, Boca Raton.
- Horrocks, L. A. and Yeo, Y. K.,** 1999: Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA), *Pharmacological Research*, **40**, 211-225.
- Hou, C. T.,** 2002. Industrial uses of lipase, in *Lipid Biotechnology*, pp. 388-399, Eds. Kuo, T. M. and Gardner, H. W., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Innis, S. M., Quinlan, P. T. and Nelson, C. M.,** 1998. Structured triacylglycerols in infant nutrition and metabolism, in *Lipids in Infant Nutrition*, pp. 268-281, Eds. Huang, Y-S. and Sinclair, A. J., AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Jennings, B. H. and Akoh, C. C.,** 1999: Enzymatic modification of triacylglycerols of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 1133-1137.
- Jennings, B. H. and Akoh, C. C.,** 2009: Effectiveness of natural versus synthetic antioxidants in a rice bran oil-based structured lipid, *Food Chemistry*, **114**, 1456-1461.
- Jensen, R. G.,** 2001. Infant Formulas, in *Structured and Modified Lipids*, pp. 455-464, Ed. Gustone, F. D., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Jiménez, M. J., Esteban, L., Robles, A., Hita, E., González, P.A., Muñío and Molina, E.,** 2010: Production of triacylglycerols rich in palmitic acid at sn-2 position by lipase-catalyzed acidolysis, *Biochemical Engineering Journal*, **51**, 172-179.
- Kamal-Eldin, A. and Pakorný, J.,** 2005. Lipid oxidation products and methods used for their analysis, in *Analysis of Lipid Oxidation*, pp. 1-7, Eds. Kamal-Eldin, A. and Pakorný, J., AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Karabulut, İ., Turan, S., Vural, H. and Kayahan, M.,** 2007: Human milk fat substitute produced by enzymatic interesterification of vegetable oil blend, *Food Technol. Biotechnol.*, **45**, 4, 434-438.

- Karaca, A.**, 2008: Aydın yöresinde bal arılarının (*Apis mellifera* L.) yararlanabileceği bitkiler ve bazı özellikleri, *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **5**, 2, 39-66.
- Kennedy, K., Fewtrell, M.S., Morley, R., Abbott, R., Quinlan, P.T., Wells, J.C.K., Bindels, J.G. and Lucas, A.**, 1999: Double-blind, randomized trial of a synthetic triacylglycerol in formula-fed term infants: effects on stool biochemistry, stool characteristics, and bone mineralization, *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**, 920-927.
- Kim, H-R, Hou, C.T., Lee, K-T, Kim, B.H. and Kim, I-H.**, 2010: Enzymatic synthesis of structured lipids using a novel cold-active lipase from *Pichia lynferdii* NRRL Y-7723, *Food Chemistry*, **122**, 846–849.
- Koletzko, B., Baker, S., Cleghorn, G., Neto, U. F., Gopalan, S., Hernell, O., Hock, Q. S., Jirapinyo, P., Lonnerdal, B., Pencharz, P., Pzyrembel, H., Ramirez-Mayans, J., Shamir, R., Turck, D., Yamashiro, Y. and Zong-Yi, D.**, 2005. Global standards for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group, *J. Pediatr. Gastro Nutr.*, **41**, 584-599.
- Koletzko, B., Rodriguez-Palmero, M., Demmelmair, H., Fidler, N., Jensen, R. and Sauerwald, T.**, 2001: Physiological aspects of human milk lipids, *Early Human Development*, **65 (Suppl.)**, S3-S18.
- Lapillonne, A. and Jensen, C. L.**, 2009: Reevaluation of the DHA requirement for the premature infant, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **81**, 143–150.
- Lee, J-H and Lee, K-T.**, 2006. Structured lipids production, in *Handbook of Functional Lipids*, pp. 489-511, Ed. Akoh, C. C., CRC Press, Boca Raton.
- Lee, J.H., Lee, K-T., Akoh, C.C., Chung, S. K. and Kim, M.R.**, 2006: Antioxidant evaluation and oxidative stability of structured lipids from extravirgin olive oil and conjugated linoleic acid, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, **54**, 5416-5421.
- Lee, J-H., Shin, J-A., Lee, J-H. and Lee, K-T.**, 2004: Production of lipase-catalyzed structured lipids from safflower oil with conjugated linoleic acid and oxidation studies with rosemary extracts, *Food Research International*, **37**, 967-974.
- Li, Y., Mu, H., Andersen, J.E.T., Xu, X., Meyer, O. and Ørngreen, A.**, 2010: New human milk fat substitutes from butterfat to improve fat absorption, *Food Research International*, **43**, 739-744.
- López-López, A., Castellote-Bargalló, A. I., Campoy-Folgoso, C., Rivero-Urgel, M., Tormo-Carnicé, R., Infante-Pina, D. and López-Sabater, M. C.**, 2001: The influence of dietary palmitic acid triacylglyceride position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces, *Early Human Development*, **65 (Suppl.)**, S83-S94.
- Lora, K. R. and Lewis, N. M.**, 2007. Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids, in *Sports Nutrition: Fats and Proteins*, pp.63-89, Ed. Driskell, J. A., CRC Press, Boca Raton.

- Lucas, A., Quinlan, P., Abrams, S., Ryan, S., Meah, S. and Lucas, P.J.,** 1997: Randomised controlled trial of a synthetic triglyceride milk Formula for preterm infants. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal. Ed.*, **77**, F178-F184.
- Lumor, S. E. and Akoh, C. C.,** 2005: Enzymatic incorporation of stearic acid into a blend of palm olein and palm kernel oil: optimization by response surface methodology, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 412-426.
- Maduko, C. O, Akoh, C. C. and Park, Y. W.,** 2007: Enzymatic production of infant milk fat analogs containing palmitic acid: optimization of reactions by response surface methodology, *J. Dairy Sci.*, **90**, 2147-2154.
- Maduko, C. O and Akoh, C. C.,** 2008: Characterization and oxidative stability of structured lipids: infant milk fat analog, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **85**, 197-204.
- Marangoni, A. G.,** 2002. Lipases: structure, function, and properties, in *Lipid Biotechnology*, pp. 357-387, Eds. Kuo, T. M. and Gardner, H. W., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Martin, D., Reglero, G. and Señoráns, F.J.,** 2010: Oxidative stability of structured lipids, *Eur Food Res Technol*, **231**, 635-653.
- Montgomery, D. C.,** 2005. Design and Analysis of Experiments, John Wiley & Sons, New York.
- Morrow, A.L,** 2006: What's new in infant formulas, *J. Pediatr. Health Care.* **17**, 271-272.
- Mukherjee, K. D. and Kiewitt, I.,** 1998: Structured triacylglycerols resembling human milk fat by transesterification catalyzed by papaya (*Carica papaya*) latex, *Biotechnology Letters*, **20**, 613-616.
- Myers, R. H. and Montgomery, D. C.,** 2002. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, John Wiley & Sons, New York.
- Nielsen, N. S., Xu, X., Timm-Heinrich, M. and Jacobsem, C.,** 2004: Oxidative stability during storage of structured lipids produced from fish oil and caprylic acid, *JAACS*, **81**, 375-384.
- Nielsen, N. S., Yang, T. Xu, X. and Jacobsem, C.,** 2006: Production and oxidative stability of a human milk fat substitute produced from lard by enzyme technology in a pilot packed-bed reactor, *Food Chemistry*, **94**, 53-60.
- Osborn, H. T. and Akoh, C. C.,** 2002: Structured lipids- novel fats with medical, nutraceutical, and food applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **3**, 110-120.
- Özcan, T.,** 2008: Analysis of the total oil and fatty acid composition of seeds of some *Boraginaceae* taxa from Turkey, *Plant Syst. Evol.*, **274**, 143-153.
- Pina-Rodriguez, A. M. and Akoh, C. C.,** 2009a: Enrichment of amaranth oil with ethyl palmitate at the sn-2 position by chemical and enzymatic synthesis, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 4657-4662.

- Pina-Rodriguez, A. M. and Akoh, C. C.,** 2009b: Synthesis and characterization of a structured lipid from amaranth oil as a partial fat substitute in milk-based infant formula, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 6748-6756.
- Porsgaard, T.,** 2006. Clinical studies with structured triacylglycerols, in *Handbook of Functional Lipids*, pp. 419-433, Ed. Akoh, C.C., Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton.
- Ratledge, C.,** 2004: Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production, *Biochimie*, **86**, 807-815.
- Rao, R. B., Manohar, Sambaiah, K. and Lokesh, B. R.,** 2002: Enzymatic acidolysis in hexane to produce n-3 or n-6 FA-enriched structured lipids from coconut oil: optimization of reactions by response surface methodology, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **79**, 9, 885-890.
- Rousseau, D. and Marangoni, A.G.,** 2002. The Effects of Interesterification on the Physical Properties of Fats, in *Physical Properties of Lipids*, pp. 479-527, Eds. Marangoni, A.G. and Narine, S.S., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Russo, G. L.,** 2009: Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention, *Biochemical Pharmacology*, **77**, 937-946.
- Sahin, N., Akoh, C. C. and Karaali, A.,** 2005a: Enzymatic production of human milk fat substitutes containing γ -linolenic acid: optimization of reactions by response surface methodology, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 549-557.
- Sahin, N., Akoh, C. C. and Karaali, A.,** 2005b: Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 5779-5783.
- Sanders, T.A.B. and Theobald, H.E.,** 2006. New marine sources of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), in *Improving the Food Content of Foods*, pp.454-471, Ed. Williams, C. and Buttriss, J., Woodhead Publishing Ltd and CRC Press LLC, USA.
- Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., Mcneil, G. P. and Schmid, R. D.,** 1998: Optimization of the reaction conditions in the lipase catalyzed synthesis of structured triacylglycerides, *J. Am. Oil Chem.Soc.*, **75**, 1527-1531.
- Schmid, U., Bornscheuer, U. T., Soumanou, M. M., Mcneil, G. P. and Schmid, R. D.,** 1999: Highly selective synthesis of 1,3-oleoyl-2-palmitoylglycerol by lipase catalysis, *Biotechnology and Bioengineering*, **64**, 678-684.
- Schmeits, B. L., Cook, J. A., VanderJagt, D. J., Magnussen, M. A., Bhatt, S. K., Bobik, E. G., Huang, Y-S. and Glew, R. H.,** 1999: Fatty acid composition of the milk lipids of women in Nepal, *Nutrition Research*, **19**, 1339-1348.
- Senanayake, S.P.J.N. and Fichtali, J.,** 2006. Single-cell oils as sources of nutraceutical and specialty lipids: processing technologies and

applications, in *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*, pp.251-280, Ed. Shahidi, F., CRC Press, Boca Raton.

- Senanayake, S.P.J.N. and Shahidi, F.**, 1999: Enzymatic incorporation of docosahexaenoic acid into borage oil, *JAOCs*, **76**, 1009–1015.
- Senanayake, S.P.J.N. and Shahidi, F.**, 2004: Incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oil via lipase-catalyzed transesterification, *Food Chemistry*, **85**, 489–496.
- Seriburi, V. and Akoh, C.C.**, 1998: Enzymatic interesterification of lard and high-oleic sunflower oil with *Candida antarctica* lipase to produce plastic fats *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 1339–1345.
- Sharma, M., Rastogi, N. K. and Lokesh, B. R.**, 2009: Synthesis of structured lipid with balanced omega-3: omega-6 ratio by lipase-catalyzed acidolysis reaction: optimization of reaction using response surface methodology, *Process Biochemistry*, **44**, 1284–1288.
- Shimada, Y., Nagao, T., Hamasaki, Y., Akimoto, K., Sugihara, A., Fujikawa, S., Komemushi, S. and Tominaga, Y.**, 2000: Enzymatic synthesis of structured lipid containing arachidonic and palmitic acids, *J Am. Oil Chem. Soc.*, **77**, 1, 89-93.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A.**, 2006: Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**, 2, 87-96.
- Spurgeon, M.J., Palmer, A.K. and Hepburn, P.A.**, 2003: An investigation of the general, reproductive and postnatal developmental toxicity of Betapol™, a human milk fat equivalent, *Food and Chemical Toxicology*, **41**, 1355-1366.
- Srivastava, A., Akoh, C. C., Chang, S-W., Lee, G-C. and Shaw, J-F.**, 2006: *Candida rugosa* lipase LIP1-catalyzed transesterification to produce human milk fat substitute, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5175-5181.
- Surette, M. E., Edens, M., Chilton, F. H. and Tramposch, K. M.**, 2004: Dietary *Echium* oil increases plasma and neutrophil long-chain (n-3) fatty acids and lowers serum triacylglycerols in hypertriglyceridemic humans, *The Journal of Nutrition*, **134**, 1406–1411.
- Şahin, N., Akoh, C. C. and Karaali, A.**, 2006a: Human milk fat substitutes containing omega-3 fatty acids, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 3717-3722.
- Thompson, D.**, 1982. Response surface experimentation, *Journal of Food Processing and Preservation*, **6**, 155-188.
- Toro-Vazquez, J.F., Alonzo-Macias, M., Dibildox-Alvarado, E. and Charó-Alonso, M.**, 2009: The effect of tripalmitin crystallization on the thermomechanical properties of candelilla wax organogel, *Food Biophysics*, **4**, 199-212.
- Url-1** <<http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-33.pdf>>, alındığı tarih 15.08.2010.
- Url-2** <http://www.naturallyhealthyniagara.com/pdf/PN8400_OmegaVega_PI_LG.pdf>, alındığı tarih 08.12.2010.

- Url-3**<<http://florabase.dec.wa.gov.au/browse/profile/6681>>, alındığı tarih 08.12.2010.
- Url-4**<http://www.rbgsyd.nsw.gov.au/science/Evolutionary_Ecology_Research/Ecology_of_Cumberland_Plain_Woodland/woodland_plants/echium_plantagineum>, alındığı tarih 08.12.2010.
- Url-5** <<http://www.who.int>>, alındığı tarih 23.01.2010.
- Url-6** <<http://www.unicef.org>>, alındığı tarih 23.01.2010.
- Url-7** <<http://www.aak.com> >, alındığı tarih 02.04.2010.
- Url-8**<<http://www.infantformula.org/news-room/press-releases-and-statements/infant-formula-and-dha/ara> >, alındığı tarih 27.07.2010.
- Url-9** < <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:401:0001:0001:EN:PDF>>, alındığı tarih 17.09.2010.
- Url-10** < <http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Teblig/98-20.html>>, alındığı tarih 22.02.2011.
- Url-11** < <http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Teblig/2001-29.html>>, alındığı tarih 13.08.2010.
- Wanasundara, U. N. and Shahidi, F.,** 1999: Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions, *Food Chemistry*, **65**, 41-49.
- Ward, O. P and Singh, A.,** 2005. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of Production, *Process Biochemistry*, **40**, 3627–3652.
- Watkins, S. M. and German, J. B.,** 2007. Unsaturated fatty acids, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, pp. 514-538, Eds. Akoh, C. C. and Min, D. B., CRC Press, Boca Raton.
- Weber, N. ve Mukherjee, K.D.,** 2005. Lipids in infant formulas and human milk fat substitutes, in *Healthful Lipids*, pp. 607-641, Eds. C.C. Akoh ve O. Lai, AOCS Press, Illinois.
- Whelan, J.,** 2009: Dietary stearidonic acid is a long chain (n-3) polyunsaturated fatty acid with potential health benefits, *The Journal of Nutrition*, **139**, 5–10.
- Willis, W. M. and Marangoni, A. G.,** 2007. Enzymatic interesterification, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, pp. 808-839, Eds. Akoh, C. C. and Min, D. B., CRC Press, Boca Raton.
- Xu, X.,** 2000: Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **102**, 287-303.
- Yang, T., Xu, X., He, C. and Li, L.,** 2003a: Lipase-catalyzed modification of lard to produce human milk fat substitutes, *Food Chemistry*, **80**, 473-481.
- Yang, T., Fruekilde, M-B., and Xu, X.,** 2003b: Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **80**, 881–887.

Yang, T., Fruekilde, M-J. and Xu, X., 2005: Suppression of acyl migration in enzymatic production of structured lipids through temperature programming, *Food Chemistry* , **92**, 101–107.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Alev Yüksel

Doğum Yeri ve Tarihi: Amasya, 1982

Lisans Üniversitesi: İstanbul Teknik Üniversitesi

Yayın Listesi:

- **Yüksel, A.**, Yeşilçubuk, N. Ş., 2010: Production of Human Milk Fat Substitutes Containing DHA-Rich Algal Oil. *8th Euro Fed Lipid Congress*, November 21-24, Munich, Germany.
- **Yüksel, A.**, Turan, D., Yeşilçubuk, N. Ş., 2010: Bebek Beslenmesi İçin Dizayn Edilen Yapılandırılmış Yağlar, *7. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi*, 14-18 Nisan, İstanbul, Türkiye.
- Turan, D., **Yüksel, A.**, Yeşilçubuk, N. Ş., 2010: Dokosahekzaenoik Asit (DHA) ve Araşidonik Asitin (AA) Bebek Beslenmesindeki Önemi ve Anne Sütü Yağı Analoglarında Kullanımı, *7. Uluslararası Beslenme ve Diyetetik Kongresi*, 14-18 Nisan, İstanbul, Türkiye.