İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRİPALMİTİNİN KONJUGE LİNOLEİK ASİT VE LAURİK ASİT İLE ENZİMATİK ASİDOLİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Hacer ÇAĞLAR

Anabilim Dalı : Kimya Mühendisliği

Programı : Kimya Mühendisliği

Tez Danışmanı: Prof. Dr. H. Ayşe AKSOY

HAZİRAN 2009

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TRİPALMİTİNİN KONJUGE LİNOLEİK ASİT VE LAURİK ASİT İLE ENZİMATİK ASİDOLİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Hacer ÇAĞLAR
(506061031)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04 Mayıs 2009
Tezin Savunulduğu Tarih : 01 Haziran 2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. H. Ayşe AKSOY (İTÜ)
Eş Danışman : Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Melek TÜTER (İTÜ)
Prof. Dr. Oya ATICI (İTÜ)
Y. Doç. Dr. Sevil YÜCEL (YTÜ)

HAZİRAN 2009

Aileme,

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan ve daima yol gösteren değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. H. Ayşe Aksoy'a, Sayın Prof. Dr. Güldem Üstün'e ve Sayın Prof. Dr. Melek Tüter'e teşekkürü bir borç bilirim.

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

Mayıs 2009

Hacer Çağlar

(Kimya Mühendisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
KISALTMALAR ..... **ix**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xiii**
ÖZET ..... **xv**
SUMMARY ..... **xvii**
1. GİRİŞ **1**
1.1Giriş ve Çalışmanın Amacı 1
2. LİTERATÜR VE TEORİ **3**
2.1 Yağ İkame Maddeleri 3
2.1.1 Karbonhidrat bazlı yağ ikame maddeleri 4
2.1.1.1 Selüloz 5
2.1.1.2 Gumlar 5
2.1.1.3 Dekstrinler 5
2.1.1.4 Maltodekstrinler 5
2.1.1.5 Lif 5
2.1.1.6 Nişasta ve modifiye nişastalı yağ ikameleri 6
2.1.2 Protein bazlı yağ ikame maddeleri 6
2.1.2.1 Mikropartiküle edilmiş protein 6
2.1.2.2 Modifiye edilmiş peynir altı suyu 6
2.1.2.3 Diğer protein kaynaklı yağ ikameleri 6
2.1.3 Yağ bazlı yağ ikame maddeleri 7
2.2 Yapılandırılmış Yağlar 7
2.2.1 Yapılandıırlmış yağların sentezi 9
2.2.1.1 Esterifikasyon 9
2.2.1.2 İnteresterifikasyon 10
2.2.1.3 Transesterifikasyon 11
2.2.1.4 Alkoliz 11
2.2.1.5 Asidoliz 12
2.2.2 Yapılandırılmış Yağların Uygulamaları 12
2.3 Enzimatik Yöntem ile Yapılandırılmış Yağ Üretimi 14
2.3.1 Enzimler 14
2.3.2 Yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan lipaz enzimleri 15
2.3.3 Enzimatik prosesi ve ürün verimini etkileyen faktörler 16
2.3.3.1 Lipaz seçimi 17
2.3.3.2 Sıcaklık 17
2.3.3.3 pH 18
2.3.3.4 Su miktarının etkisi 18
2.3.3.5 Sürenin etkisi 18

2.3.3.6 Substrat mol oranının etkisi 18
2.4 Tripalmitin, Konjuge Linoleik Asit ve Laurik Asit ile Yapılan Literatür Çalışmaları 19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 25
3.1 Kullanılan Hammeddeler 25
3.2 Çalışma Yöntemi 25
3.2.1 Kullanılan hammaddelerin karakterizasyonu 25
3.2.2 Tripalmitinin konjuge linoleik asit ve laurik asit ile asidoliz reaksiyonunda uygulanan yöntem 26
3.2.3 Asidoliz ürünlerinin analizi 27
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 29
4.1 Substratların Yağ Asidi Bileşimleri 29
4.2 Tripalmitinin Konjuge Linoleik Asit ve Laurik Asit Karışımı ile Enzimatik Asidolizinde Enzim Miktarının Etkisi 30
4.3 Tripalmitinin Konjuge Linoleik Asit ve Laurik Asit Karışımı ile Enzimatik Asidolizinde Tripalmitin:KLA:Laurik Asit Mol Oranın Etkisi 32
4.4 Tripalmitinin Konjuge Linoleik Asit ve Laurik Asit Karışımı ile Enzimatik Asidolizinde Reaksiyon Süresinin Etkisi 38
5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER 45
KAYNAKLAR 42

KISALTMALAR

ÇDYA **:** Çoklu Doymamış Yağ Asidi
GC **:** Gaz Kromatografisi
KLA **:** Konjuge Linoleik Asit
LaA **:** Laurik Asit
PL **:** Fosfolipid
TAG **:** Triaçilgliserol
TP **:** Tripalmitin
YY **:** Yapılandırılmış Yağ

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Lipazların Endüstriyel Uygulama Alanları. 16
Çizelge 3.1 : Gaz kromatografik analiz koşulları 26
Çizelge 4.1 : LA, KLA ve tripalmitinin yağ asidi bileşimleri 30
Çizelge 4.2 : Tripalmitinin KLA ve laurik asit ile Asidolizinde, ürün yağ asitleri bileşiminin enzim miktarı ile değişimi (50°C; Tripalmitin:KLA:Laurik asit mol oranı 1:1:3) ……..….....31
Çizelge 4.3 : Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin laurik asit/ KLA oranı ile değişimi (50°C; %10 enzim; 2 saat; TP/toplam yağ asitleri mol oranı = 1:3).……....……..34
Çizelge 4.4 : Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin laurik asit: KLA oranı ile değişimi (50°C; %10 enzim; 2 saat; TP/toplam yağ asitleri mol oranı 1:4).....……34
Çizelge 4.5 : Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin laurik asit: KLA oranı ile değişimi (50°C; %10 enzim; 2 saat; TP/toplam yağ asitleri mol oranı 1:5)..... 34
Çizelge 4.6 : Tripalmitinin KLA ve LaA karışımı ile enzimatik asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin reaksiyon süresi ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) Mol Oranı 1:3)..... 39
Çizelge 4.7 : Tripalmitinin KLA ve LaA karışımı ile enzimatik asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin reaksiyon süresi ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) Mol Oranı 1:4)..... 40
Çizelge 4.8 : Tripalmitinin KLA ve LaA karışımı ile enzimatik asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin reaksiyon süresi ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) Mol Oranı 1:5)..... 41

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Yağların oluşumu (R_1, R_2, R_3=Radikaller, bir yağ asidindeki aktif grup dışında kalan tüm zincirleri gösterir.). 8
Şekil 2.2 : Yapılandırılmış yağların genel yapısı (L: uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi ve S: kısa zincirli yağ asidini ifade etmektedir.) 9
Şekil 2.3 : Esterifikasyon reaksiyonu. 9
Şekil 2.4 : İki farklı triaçilgliserol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu. 11
Şekil 2.5 : Bir açilgliserol ve bir alkol arasında gerçekleşen alkoliz reaksiyonu 11
Şekil 2.6 : Alkoliz reaksiyonu kademeleri 12
Şekil 2.7 : Asidoliz reaksiyonu … 12
Şekil 4.1 : Tripalmitinin KLA ve laurik asit ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve laurik asit yüzdesinin enzim miktarı ile değişimi (tripalmitin:KLA:laurik asit; 1:1:3) ..32
Şekil 4.2 : Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile enzimatik asidolizinde, KLA ve LaA'in tripalmitine katılımlarının (KLA+LaA)/ TP mol oranı ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; 2 saat; LaA/KLA=0,33) 35
Şekil 4.3 : Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve LaA miktarının (KLA+LaA)/ TP mol oranı ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; 2 saat; LaA/KLA=1)…….. 35
Şekil 4.4 : Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve LaA miktarının (KLA+LaA)/ TP mol oranı ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; 2 saat; LaA/KLA=3)..……...36
Şekil 4.5 : Tripalmitinin KLA ve Laurik asit karışımı ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA miktarının LaA/KLA mol oranı ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; 2 saat) ..…….37
Şekil 4.6 : Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan laurik asit miktarının LaA/KLA mol oranı ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; 2 saat).....37
Şekil 4.7 : Tripalmitinin KLA ve LaA ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve LaA yüzdesinin zamanla değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) mol oranı 1:3) ……..… ..42
Şekil 4.8 : Tripalmitinin KLA ve LaA ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve LaA yüzdesinin zamanla değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) mol oranı 1:4) …….....43
Şekil 4.9 : Tripalmitinin KLA ve LaA ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve LaA yüzdesinin zamanla değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) mol oranı 1:5) ..... …….44

TRİPALMİTİNİN KONJUGE LİNOLEİK ASİT VE LAURİK ASİT İLE ENZİMATİK ASİDOLİZİ

ÖZET

Obozite problemi bilincinin gelişmesi ile, dünyada düşük kalorili yağların ve yağ ikame maddelerinin pazarı hızlı bir büyüme göstermektedir. Günümüzde günlük olarak tüketilen yağ miktarının ve kompozisyonunun insan sağlığı üzerindeki etkilerinin incelendiği mevcut araştırma sonuçlarına dayanarak, daha az oranda ve sağlığa yararlı yağ tüketiminin yanında kullanılan yağın kalitesinin ve özelliklerinin geliştirilmesi de büyük önem kazanmaktadır. Bu amaçla yapılandırılmış yağlar üretilerek, tüketicilere farklı özelliklerde, besin içeriği zenginleştirilmiş ve sağlığa pek çok olumlu etkisi olan yeni alternatif yağlar sunulmaktadır.

Konjuge linoleik asit (KLA) linoleik asidin (C 18:2) geometrik ve pozisyonal izomerlerini içeren bir karışım olup sağlık ve gıda özellikleri açısından yararlı olan yağ asididir. KLA aterosklerosis riskini azaltır ve antikanserojenik olan bir asittir. Son zamanlarda enzimatik asidoliz ile triaçilgliserollere (TAGs) KLA ve orta zincirli yağ asitleri katılarak gıdaların KLA ve orta zincirli yağ asitleri içeriğini artırmak üzere pek çok çalışma yapılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı, tripalmitine enzimatik olarak KLA-laurik asit karışımı katarak, sağlık özellikleri iyileştirilmiş düşük kalorili yapılandırılmış yağ üretimidir. Tripalmitinin (TP) KLA-laurik asit karışımı ile asidolizi hekzan ortamında 1,3-spesifik lipaz, Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosa)* varlığında, farklı proses koşullarında incelenmiş ve proses koşulları optimize edilmiştir. Asidoliz reaksiyonları, TP ve yağ asidi içeren substrat karışımı (1 g), enzim ve 5 mL hekzan kullanılarak orbital karıştırıcıda 220 rpm ve 50°C'de yürütülmüştür. Reaksiyonun sonunda triaçilgliseroller (TAGs) ve serbest yağ asitlerinden (FFAs) meydana gelen reaksiyon ürünlerinden yapılandırılmış yağları saf olarak elde edebilmek için karışıma 0,02 M NaOH çözeltisi ile titrasyon yapılarak FFAs'ler ayrılmıştır. Yapılandırılmış TAGs'ların yağ asitleri bileşimleri gaz kromatografi yöntemi ile belirlenmiştir.

Yürütülmüş deneyler sonucunda, optimum reaksiyon koşulları %10 enzim miktarı, 1:1:3 TP:KLA:LaA mol oranı ve 2 saat reaksiyon süresi olarak saptanmıştır.

KLA ve laurik asit katılmış tripalmitin sağlık özellikleri iyileştirilmiş ve düşük kalorili yapılandırılmış yağ olup diyetlerin formulasyonunda kullanılabilir.

ENZYMATIC ACIDOLYSIS OF TRIPALMITIN WITH CONJUGATED LINOLEIC ACID AND LAURIC ACID

SUMMARY

With increasing awereness of the risks associated with obesity, a market for reduced calorie fats and replacers has opened up. Depending on the results of the scientific researchs in which the effects of composition and content of lipids which have more beneficial health benefits, and improving the quality and special features of lipids are also becoming important. Structured lipids are developed for that purpose and enriched new alternative oils and fats which have different features and beneficial effects on the health can be available.

Conjugated linoleic acid (CLA) which is a mixture of geometric and positional isomers of linoleic acid (C 18:2) has nutritional and health benefits. CLA decreases the risk of atherosclerosis and has anticarcinogenic effects. CLA also lowers the insulin resistance and consequently insulin levels. Lauric acid (C 12:0) is a medium-chain fatty acids contents of foods by means of enzymatic acidolysis to incorporate of CLA and medium-chain fatty acid into triacylglycerols (TAGs).

The purpose of this study is to enhance the nutritional properties and calorific value of tripalmitin by the incorporation of CLA-lauric acid mixture into tripalmitin by enzymatic acidolysis. Enzimatic acidolysis of tripalmitin with CLA-lauric acid mixture were examined under different process conditions and, this process conditions were optimized using Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosa*) lipase in hexane. Acidolysis reactions were conducted using 1g of substrates, enzyme and 5 mL n-hexane in an orbital shaker at 220 rpm and 50°C. Reaction products consisted of TAGs and free fatty acids (FFAs) were titrated against a 0,02 M NaOH to separate the TAGs from FFAs. Fatty acid compositions of TAGs were determined by gas chromatography.

Among all the experiment results for optimization, the optimum reaction conditions are found as %10 enzyme amount, a substrate molar ratio of 1:1:3 TP:CLA:LaA and reaction time of 2 hour.

Thus obtained CLA and lauric acids rich tripalmitin could be used as a source of dietary CLA and reduced calorie structured lipid in the formulation of food products.

1. GİRİŞ

1.1 Giriş ve Çalışmanın Amacı

Günümüzde, özellikle gelişmiş ülkelerde insanlar, beslenmelerine çok dikkat etmekte ve beslenme rejimlerinde sağlık açısından uygun gıdaları seçmeye özen göstermektedirler. Buna bağlı olarak da talep edilen mal ve hizmetlerin niteliklerine yönelik beklentiler her geçen gün değişim göstermektedir. Gıda maddeleri de talep edilen bu mal ve hizmetlerin içerisinde bulunmakta ve bu durum da alternatif gıda ürünleri arayışının ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Sağlık açısından son derece faydalı gıda maddelerinin başında gelen yağlar insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptirler. Fakat yanlış tüketim sonucu obezite, kalp ve damar hastalıkları gibi rahatsızlıklara neden olabilmektedirler. Halbuki yağların özellikleri pozitif yönde geliştirilerek sağlığa daha faydalı ürünler elde edebilmek son yıllarda yapılan çalışmalarla mümkün olabilmektedir. Bunların arasında yapılandırılmış yağların üretimine ilişkin çalışmalar başta gelmektedir.

Yapılandırılmış yağlar, yağların insan sağlığı için olumsuz özelliklerini tamamen veya kısmen ortadan kaldırmak, yağların sağlık ve besinsel özelliklerini artırmak için üretilen yağ ikame maddeleridir. Yapılandırılmış yağlar triaçilgliserollerin kimyasal veya enzimatik olarak tekrar yapılandırılması veya modifiye edilmesi ile üretilirler. Yapılandırılmış yağlar, triaçilgliserolleri oluşturan yağ asitlerinin gliserol iskeleti içindeki yerleri, kompozisyonu değiştirilerek, yapı içine konjuge linoleik asit gibi çoklu doymamış ve/veya orta zincirli sağlık açısından yararlı yağ asitleri katılarak üretilen, yağ asidi profilleri değiştirilmiş triaçilgliseroller olarak tanımlanmaktadır. Yapılandırılmış yağ üretiminde en yaygın olarak kullanılan yöntem asidoliz yöntemidir. Son yıllarda, reaksiyonların ortam sıcaklığında yüksek verimle yürütülebilmesi, lipazların substrat ve pozisyon seçici özelliklerinden ötürü daha saf ürün elde edilebilmesi ve daha az atık oluşumu nedeni ile asidoliz reaksiyonlarının enzimatik olarak yürütülmesi önem kazanmıştır. Yapılandırılmış yağ üretiminde en çok kullanılan yöntem olan enzimatik interesterifikasyonda reaksiyonlar lipaz enzimi

katalizörlüğünde gerçekleşirler. Enzimatik asidoliz reaksiyonları, kimyasal asidolize göre daha ılımlı koşullarda yürütülebildiklerinden reaksiyon için daha az enerjiye gereksinim olduğu gibi termik oksidasyondan kaynaklanan kayıplar da minumum düzeyde olacağı için çok daha avantajlı bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, tripalmitini enzimatik asidoliz reaksiyonu yoluyla konjuge linoleik asit ve laurik asit ile zenginleştirerek yapılandırılmış yağ sentezlemek ve tripalmitin:KLA:laurik asit substrat mol oranı, enzim miktarı ve reaksiyon süresi değişiminin tripalmitine katılan KLA ve laurik asit miktarına olan etkisini incelemektir. Literatürde spesifik lipaz enzimlerinin kullanıldığı yapılandırılmış lipidlerin enzimatik üretimi üzerine çok sayıda çalışma yer almaktadır. Ancak tripalmitinden KLA ve laurik asit ile yapılandırılmış yağ üretimi konusunda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, tripalmitinin KLA ve laurik asit ile asidolizinin detaylı olarak incelenmesi ve reaksiyon parametrelerinin optimize edilmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR VE TEORİ

2.1 Yağ İkame Maddeleri

Yağ ikame ediciler, fiziksel ve kimyasal özellikler bakımından yağa benzeyen gıda bileşenleridir. Bir yağ ikame edici, yağın verdiği ağız hissi, zenginlik, yumuşaklık ve yağlılığı sağlamalı, duyusal bir denge için tat bileşenleriyle yağa benzer ilişkide olmalıdır.

Yağ ikameleri gıdalarda yağın yerine ilave edilebilir ve yağın gıdalara verdiği birçok özelliği sağlar. Bu maddeler gıdalarda yağ yerine kullanıldığında gıdadaki yağ kısmen veya tamamen azaltılabilir ve yağdan kaynaklanan enerjinin minimuma inmesi sağlanır [1]. Yağ ikame maddeleri aşağıdaki nedenlerden dolayı kullanılmaktadır:

- Kronik hastalıklarla yüksek-yağlı diyetler arasında kanıtlanmış bir ilişki bulunması,

- Gerekli miktarda yağ alımı ve uygun vücut ağırlığına ulaşma,

- Halkın büyük bir kısmının herhangi bir diyete sürekli bağlı kalamaması,

- Yağ tüketimini azaltma eğilimi,

- Diyet değişiklikleri ve yaşam kalitesini artırmaya katkıda bulunmada uzun süreli başarı elde etmek için besinlerin lezzetini koruma,

- Bugün kullanılan yağ ikame maddelerinin güvenilirliğinin onaylanmış olması,

- Yaygın bir şekilde tüketicilerin yağı azaltılmış, düşük yağlı ve yağ kullanılmayan ürünleri uygun bulup talep etmeleri,

- Yağ ikame maddeleri içeren ürünlerin yağı fazla içeren gıdaların yerine geçmesinin yağ tüketimini azaltması,

- Eğer diyette toplam yağ ve enerji sınırlandırılmışsa yağ ikame maddeleri içeren ürünlerin yağı fazla içeren gıdaların yerine geçmesinin enerji dengesi üzerine olumlu etkisi ve,

- Yağ ikame maddeleri içeren ürünlerin kullanılmasının daha çok ve farklı gıdalardan oluşan diyetlerin tüketimine olanak sağlaması.

Yağ ikame maddeleri kullanmak, diyetlerin lezetlerini koruyarak yağ ve/veya enerji düzeyini kontrol altında tutmak için güvenli ve etkili bir yöntem olabilmektedir [2].

Yağ ikameleri; karbonhidrat kaynaklı yağ ikameleri, protein kaynaklı yağ ikameleri ve yağ bazlı yağ ikameleri olarak sınıflandırılabilir [1]. Protein ve karbonhidrat esaslı yağ ikame maddeleri yağı taklit edici maddeler olarak bilinmektedir ve bunlar gıdalardaki yağın fonksiyonlarını tam olarak yerine getiremezler. Yağ esaslı yağ ikame maddeleri veya yağ benzeri maddeler gıdalardaki yağı birebir ikame eden maddelerdir. Her katagorideki yağ ikame maddeleri yağı düşürülmüş gıdaya bir dizi duyusal ve fonksiyonel kalite özelliklerini kazandırmaktadır [3].

2.1.1 Karbonhidrat bazlı yağ ikame maddeleri

Piyasaya ilk sunulan yağ ikame maddeleri karbonhidrat esaslı yağ ikame maddeleridir. Karbonhidratların asıl kullanım amaçları gıdalarda kaliteyi sağlamak için teknik fonksiyonları yerine getirmek olmasına rağmen bazı karbonhidrat esaslı yağ ikame maddeleri özellikle gıdaların kalori değerlerini düşürmek için kullanılmaktadır. Bunlar 0-4 kcal/g kalori vermektedir. Karbonhidrat esaslı yağ ikame maddeleri pek çok gıdada kullanılmaktadır [4]. Etler, salata sosları, dondurulmuş gıdalar, disposlar, şekerlemeler karbonhidrat bazlı yağ ikame maddelerinin yaygın olarak kullanıldığı yerlerdir [5]. Yağ ikame maddeleri içerisinde en çok sayıda üyesi olan grup karbonhidrat esaslı yağ ikame maddeleridir. Bunlar bitki polisakkaritlerinden ve bunların içerisindeki selülozlardan, gamlardan, dekstrinlerden, fiberlerden, maltodekstrinlerden, nişastalardan ve polidekstrozlardan oluşmaktadır. Bunlar gıdalara ilave edildiklerinde gıdaları koyulaştırarak ve hacim vererek yağın verdiğine benzer bir ağız hissi vermektedirler [2]. Karbonhidrat kökenli yağ ikame ediciler, dokusal özellikleri suyu bağlayarak sağlarlar. Yağlılık ve gevreklik sağlamak amacıyla ürünün doğal su içeriği arttırılır ancak bu kez raf ömrü problemleri ortaya çıkar. Ayrıca doğal yağa göre daha düşük kaloriye sahip olmalarına rağmen, ısıya karşı dayanıksızlıklarından dolayı doğal yağın yerini tam olarak alamazlar. Bu nedenle kullanım alanları sınırlıdır [5]. Endüstriyel olarak üretilen çeşitleri alt başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

2.1.1.1 Selüloz

Selüloz (Avicel selüloz jel, Methocel, Solka-Floc)'un çok farklı formları yağ ikame maddesi olarak kullanılmaktadır [6]. Karbonhidrat esaslı bir yağ ikame maddesi olan selüloz neredeyse hiç kalori vermemektedir. Selüloz damak tadını, tekstür ve akma kalitesini modifiye etmektedir [7].

2.1.1.2 Gumlar

Gumlar (Kelcogel, Keltrol, Slendid) hidrofilik kolloidler veya hidrokolloidler olarak da bilinmektedir [8]. Yapılarında karbonhidrat içeren, uzun zincirli ve yüksek molekül ağırlıklı polimerler bulunur [9]. Hemen hemen hiç kalori vermemekte, gıdanın kıvamını artırmakta, bazı durumlarda jelleştirme etkisi oluşturmakta ve böylece kremimsi yapıyı geliştirebilmektedir [8].

2.1.1.3 Dekstrinler

4 kcal/g enerji içeren, farklı gıdalardaki yağı kısmen veya tamamen ikame edebilen, süt bazlı ürünlerde kullanılan bir karbonhidrat esaslı yağ ikame maddesidir. Dekstrin kullanıldığı ürünlerinde tekstürü iyileştirmekte ve hacim verici ajan olarak hareket etmektedir [7]. Amylum ve N-011 ticari olarak üretilen yağ ikamesi dekstrinlerdendir [10].

2.1.1.4 Maltodekstrinler

Maltodekstrinler tatlandırma özelliği bulunmayan, 4 kcal/g enerji veren, farklı zincir uzunluğundaki polisakkaritlerin karışımından oluşan karbonhidrat esaslı yağ ikame maddesidir. Maltodekstrinler yağın ikame edildiği sistemlerde; katılaştırmak ve viskoziteyi artırmak, suyu bağlamak ve kontrol altında tutmak, düzgün ağız hissinin oluşumuna katkıda bulunmak amacıyla kullanılmaktadır [11]. Crystebleaz, Corelite ve Maltrin endüstriyel olarak üretilen yağ ikamesi maltodekstrinlerdir [10].

2.1.1.5 Lif

Lifler düşük yağlı gıdalarda yapı bütünlüğü, nem tutucu kapasite, raf ömrü stabilitesi ve yapışmazlık özelliklerini sağlayan yağ ikame maddeleridir. Eptai Oat Fiber, Snowite, Ultracel ve Z-Trim ticari olarak üretilen yağ ikamesi lifleridir [10].

2.1.1.6 Nişasta ve modifiye nişastalı yağ ikameleri

Nişasta ve modifiye gıda nişastaları 1-4 kcal/g enerji veren, düşük kalorili karbonhidrat esaslı yağ ikame maddeleridir. Bu yağ ikame maddeleri gıdalarda yapı oluşturucu ajan ve tekstürü modifiye edici olarak görev yapmaktadır [8]. Amalean I&II, Fairney VA15 ve Instant Stellar ticari olarak üretilen yağ ikamesi nişastalardır [10].

2.1.2 Protein bazlı yağ ikame maddeleri

Protein bazlı yağ ikame maddeleri süt ve yumurta proteinlerine uygulanan ısı ve yüksek deformasyon kuvveti gibi işlemlerin sonucunda elde edilir. Doğal kaynaklı bu proteinler ürün içerisinde bağladıkları suyu çok düzgün bir şekilde dağıtmakta ve emülsifiye edici özellikte oldukları için serum ayrılmasını önlemektedirler [12]. Protein bazlı yağ ikame maddeleri karbonhidrat bazlı yağ ikame maddelerine göre ağızda daha güzel bir his bırakmaktadırlar. Bu yağ ikame maddeleri pişmiş gıdaların bazılarında kullanılabilirler fakat kızartma için uygun değillerdir [9,13]. Endüstriyel olarak üretilen çeşitleri alt başlıklar halinde aşağıda verilmiştir.

2.1.2.1 Mikropartiküle edilmiş protein

Simplesse piyasada en çok kullanılan mikropartiküle edilmiş protein kaynaklı yağ ikamelerinden birisidir. Simplesse peynir altu suyu veya yumurta beyazı proteinleri gibi ufak granüllü süt proteinlerinin ısıtılıp soğutulması anlamına gelen mikropartikülasyon prosesi ile elde edilir. Bu proseste su ile karıştırılan protein bu sayede akışkan bir hal alır. Bu sayede gıda içerisinde sis bulutuna benzer şekilde yayılan proteinler yağ benzeri his ve tat verir [13,14].

2.1.2.2 Modifiye edilmiş peynir altı suyu

Dairy-Lo adlı ürün modifiye bir serum proteini konsantresidir. Mikropartikül olmayan ve hafif ısıl işlemlerle elde edilen bu ürün %60-80 denaturasyon derecesine sahiptir [12].

2.1.2.3 Diğer protein kaynaklı yağ ikameleri

Ultra-Bak, Ultra-Free, Blazer ve Lita gibi ürünler endüstriyel olarak üretilen diğer protein kaynaklı yağ ikameleridir. Bu ürünler mikropartiküle edimiş yağ ikamelerine benzerler fakat farklı proseslerden elde edilirler. Ayrıca mısır proteininden elde

edilmiş düşük kalorili yağ ikameleri vardır. Bu grup yağ ikameleri daha çok dondururlmuş tatlılarda ve pişirilmiş ürünlerde kullanılırlar [14].

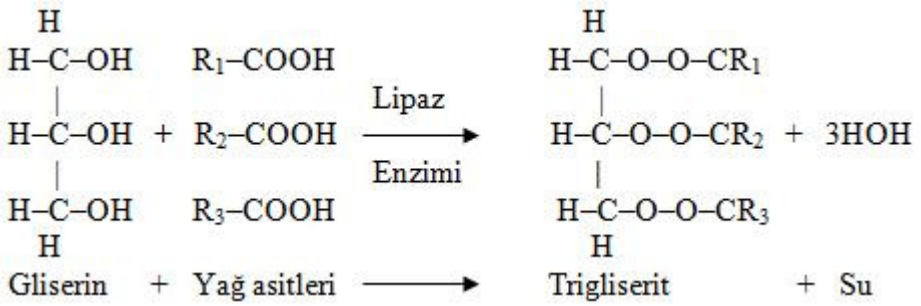
2.1.3 Yağ bazlı yağ ikame maddeleri

Yağ bazlı yağ ikame maddeleri yapılandırılmış yağlardır. Özelleştirilmiş yağlar, temelde yapılandırılmış yağların olduğu geniş bir ürün yelpazesini içerir. Yapılandırılmış lipidler modifiye edilmiş triaçilgliseroller (TAG) veya fosfolipidlerdir (PL). Bu TAG veya PL'lerdeki yağ asitleri, gliserol omurgası içerisinde belli konumlarda yerleştirilmiştir ve bu yağlar enzimatik veya kimyasal prosesler kullanılarak üretilirler. Bu yağ asitlerinin hepsinin aynı gliserol yapısında bulunması yapılandırılmış yağın fonksiyonelliğini arttırır. Yapılandırılmış yağlar tedavi edici, sağlıklı ve besleyici yeni nesil yağlardır ve bu etkilerinden dolayı fonksiyonel gıdalar veya medikal yağlar olarak da tanımlanırlar. Yapılandırılmış yağlara potansiyel biyolojik fonksiyonları, endüstriyel uygulamaları ve besleyici yönleri açısından daha çok önem verilmektedir [15,16]. Lipidler biyoteknoloji ile bağışıklık sistemini kuvvetlendirmek, işlevselliği artırmak, kolesterolü düşürmek ve beyin gelişimine katkıda bulunmak amacı ile yapılandırılabilirler. Kakao yağı ikameleri, anne sütü yağı benzerleri, düşük kalorili yağlar, sağlık ve besi değeri yüksek bileşiklerin üretilmeleri ve diğer uygulamar yapılandırılmış lipid uygulamalarına örnek olarak verilebilir [14].

2.2 Yapılandırılmış Yağlar

Yağlar üç değerli bir alkol olan gliserin ile farklı uzunluktaki yağ asitlerinin meydana getirdiği esterlerdir. Diğer bir deyimle triaçilgliserollerdir (trigliserit, TAG).

Gliserin, yağ asitleri ile lipaz enziminin etkisinde ve uygun bir ortamda esterleşerek Şekil 2.1' deki denklemde görüldüğü gibi trigliseritleri oluşturur.

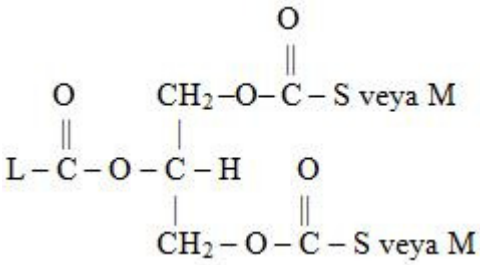


Şekil 2.1: Yağların oluşumu (R_1, R_2, R_3=Radikaller, bir yağ asidindeki aktif grup dışında kalan tüm zincirleri gösterir.)

Yemeklik yağ olarak kullanılan bitkisel ve hayvansal yağlarların %98-99'u saf trigliseritlerden meydana gelmiştir. Yağlar suda çözünmezler ama birçok organik çözücüde (etil eter, kloroform, hekzan, karbonsülfür vs.) çözünürler. Yağlarda trigliseritlerden başka %0,5-2,0 oranında değişen miktarlarda mono-digliseritler, fosfolipidler, serebrositler, steroller, yağ asitleri, yağda eriyen vitaminler (A, D, E ve K), renk ve koku maddeleri gibi maddeler bulunur. Bütün bu maddelere kimyada lipit terimi kullanılır [17].

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

Bitkisel ve hayvansal yağların bir kısmı gıda uygulamaları ve beslenme için çok uygun değildir. Bu yüzden, günümüzde yağların çoğu biyoteknolojik uygulamalar ile değişik şekillerde modifiye edilerek amaca uygun hale getirilmektedir [18]. Yapılandırılmış yağlar modifiye yağlardır. Bazı yağ asitleri orijinal hallerinde kullanıldıklarında gıda ürünlerinde uygulamaları sınırlıdır. Modifiye yağlar, bu yağ asitlerinin orijinal konumdaki pozisyon ve kompozisyonlarının kimyasal ve lipaz-kataliz reaksiyonlar ile değiştirilmesi sonucu elde edilirler [19,20]. Şekil 2.2' de yapılandırılmış yağın genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2.2: Yapılandırılmış yağların genel yapısı (L: uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi ve S: kısa zincirli yağ asidini ifade etmektedir.) [16]

Yapılandırılmış yağları (YY), gliserol molekülünün yağ asitlerinin doğal pozisyonu değiştirilmiş veya uzun zincirli çoklu doymamış (ÇDYA) veya orta zincirli yağ asitlerinin spesifik olarak yerleştirilmesi suretiyle yağ asidi profili değiştirilmiş triaçilgliserol'ler (TAG) veya yeni TAG eldesi için sentezlenen TAG'ler olarak tanımlamak mümkündür.

2.2.1 Yapılandırılmış yağların sentezi

Kimyasal ve enzimatik yöntemler yapılandırılmış yağların sentezinde kullanılan başlıca yöntemlerdir. Yapılandırılmış yağ sentezi, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin yanında mikrobiyal sentez, yağlı tohumların ıslahı veya genetik yapılarının değiştirilmesi gibi biyolojik yöntemlerle de gerçekleştirilebilir. Yapılandırılmış yağ sentezinde en sık kullanılan yöntem enzimatik yöntemdir. Enzimatik sentez kimyasal senteze göre daha spesifiktir ve daha uygun koşullarda gerçekleştirilebilmektedir. Enzimatik sentezin kimyasal sentez ile elde edilemeyen gliserit karışımlarının üretilebilmesine imkan sağlaması, bu yöntemin yapılandırılmış yağ sentezinde öncelik kazanmasını sağlamıştır [16,22].

2.2.1.1 Esterifikasyon

Esterifikasyon reaksiyonu hidroliz reaksiyonunun tersidir. Bir alkol ve asidin katalizör varlığında reaksiyona girerek ester oluşturduğu reaksiyonlara esterifikasyon reaksiyonu denir [23,24]. Şekil 2.3' de esterifikasyon reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.3: Esterifikasyon reaksiyonu [18]

Tepkime denkleminden anlaşıldığı üzere esterifikasyon bir denge reaksiyonudur ve bu yüzden reaksiyonun verimliliği düşük olur. Esterifikasyon reaksiyonu sonucunda su oluşur ve yüksek verimlilik sağlamak için reaksiyon ürünleri içerisinden bu suyun uzaklaştırılması gerekir. Reaksiyon ortamındaki suyun varlığına göre reaksiyon yön değiştirir. Esterifikasyon reaksiyonunu arttırmak, hidrolizi azaltmak ve bu sayede yüksek dönüşüm sağlamak amacı ile ortamdaki su sürekli uzaklaştırılmalıdır [23,24].

Esterleşme reaksiyonları genellikle asit katalizörler varlığında yürütülmektedir. Özellikle çeşitli sülfonil asit katalizörler, reaksiyon sırasında oluşan suyun ortamdan uzaklaştırılmasıyla esterleşmenin hızla tamamlanmasını sağlarlar [25].

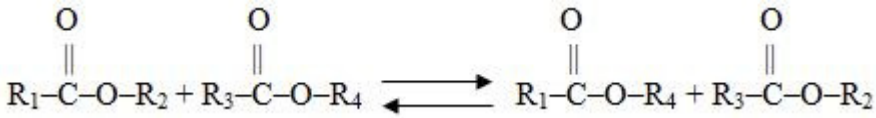
2.2.1.2 İnteresterifikasyon

1970'li yılların başllarından itibaren yağ sanayiinde yeni bir teknoloji olarak geliştirilmiş bulunan interesterifikasyon tekniği, hayvansal depo ve organ yağlarının yemeklik yağ olarak değerlendirilebilmesine olanak sağlamıştır. Beslenme fizyolojisi açısından interesterifikasyon tekniği uygulanarak elde edilen yağların yapı ve özelliklerinin diğer tekniklerle elde edilen yağlara kıyasla daha üstün olduğu, ulaşılan araştırma verileri ile kanıtlanmıştır [26].

İnteresterifikasyon reaksiyonu bir ester ile başka bir bileşen arasındaki açil gruplarının yer değişimidir. Reaksiyona giren bu bileşenler asit, alkol veya ester olabilir [22]. Kimyasal ve enzimatik olmak üzere iki tip interesterifikasyon vardır. Kimyasal ve enzimatik interesterifikasyon işleminin uygulanması ile trigliserit bünyesindeki yağ asitlerinin rasgele veya yönlendirilmiş olarak tekrar dağılımları gerçekleştirilerek, yağın fiziksel, kimyasal ve besinsel özelliklerinin modifiye edilmesi sağlanır. Kimyasal interesterifikasyon işlemi vakum altında, yüksek sıcaklıkta (85–95ºC), katalizör varlığında(sodyum metoksit) ve hızlı bir karıştırma ortamında gerçekleştirilmektedir. Lipaz enziminin kullanılması ile yağ asitlerinin yer değiştirilmesine yönelik ümit verici sonuçlar elde edilmesine rağmen, yüksek maliyeti nedeni ile büyük ölçekli uygulamalarda inorganik katalizörlerle yapılan interesterifikasyon işlemi tercih edilmektedir [27]. Dünya çapında yağların yaklaşık %10'unun interesterifikasyon / fraksiyonlama ile üretildiği tahmin edilmektedir [28].

2.2.1.3 Transesterifikasyon

Transesterifikasyon reaksiyonu, iki ester arasındaki açil gruplarının yer değişimidir. Esterifikasyon reaksiyonlarında oluşan su problemi, transesterifikasyon reaksiyonlarında oluşmaz. Bunun sebebi transesterifikasyon reaksiyonlarında hidrolizin esterifikasyondan önce gelmesidir. Yapılandırılmış yağ üretmek ve yağlara farklı özelikler kazandırmak için kullanılan en temel yöntemlerden biri transesterifikasyondur. Şekil 2.4' de iki farklı triaçilgliserol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu görülmektedir [22,29].

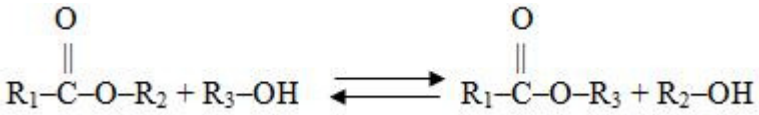


Şekil 2.4: İki farklı triaçilgliserol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu [22]

Transesterifikasyon çoğunlukla sıvı ve katı yağların veya bunların karışımlarının, triaçilgliserol yapısındaki yağ asitlerinin pozisyonel konumlarını değiştirerek fiziksel özelliklerinde değişiklikler yapmak için kullanılır [22].

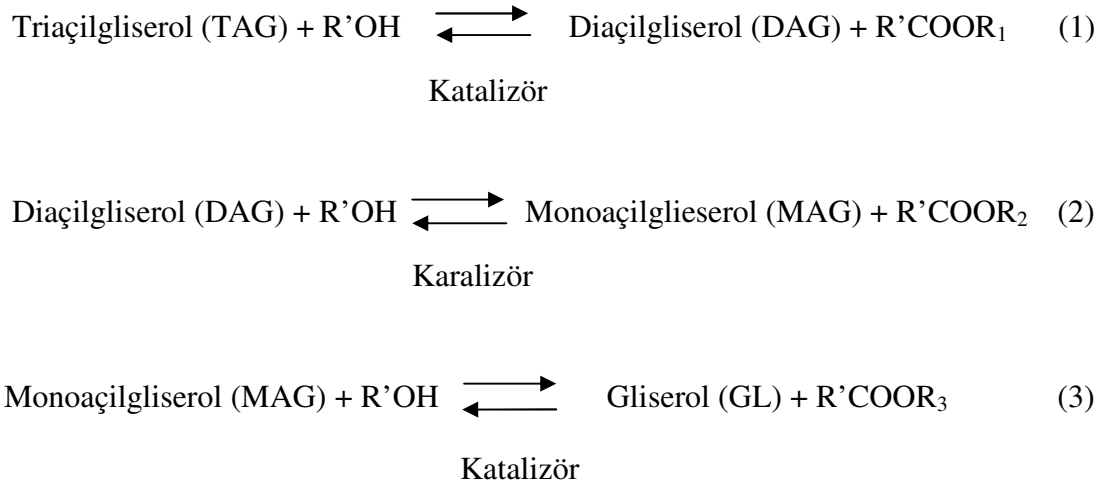
2.2.1.4 Alkoliz

Bir alkol ve bir esterin reaksiyona girmesi sonucu alkil gruplarının yer değiştirmesi ile yeni bir alkol ve ester oluşmasına alkoliz denir [25]. Şekil 2.5' de bir açilgliserol ve bir alkol arasındaki alkoliz reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.5: Bir açilgliserol ve bir alkol arasında gerçekleşen alkoliz reaksiyonu [22]

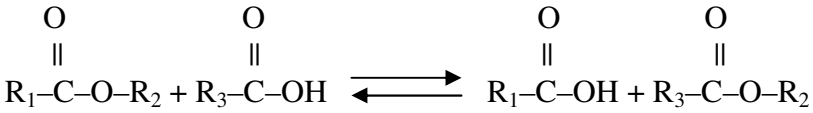
Alkoliz reaksiyonunda yağ, monohidrik bir alkolle (etanol, metanol vb.), katalizör (asidik, bazik katalizörler ile enzimler) varlığında ana ürün olarak yağ asidi esterleri ve gliserin vererek esterleşir. Ayrıca esterleşme reaksiyonunda yan ürün olarak di- ve monogliseridler, reaktan fazlası ve serbest yağ asitleri oluşur [30]. Alkoliz reaksiyonu, di- ve monogliseridlerin ana ürün olduğu 3 ardışık reaksiyon şeklinde gerçekleşir, bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdür. Stokiometrik oran, 3 mol alkole karşılık 1 mol trigliserid gerektirir. Şekil 2.6' da bu reaksiyonlar görülmektedir.



Şekil 2.6: Alkoliz reaksiyonu kademeleri [31]

2.2.1.5 Asidoliz

Asidoliz bir asit ve bir ester arasında, açil gruplarının yer değiştirdiği interesterifikasyon reaksiyonudur. Asidoliz, yeni serbest yağ asidinin triaçilgliserole katılımını sağlamada son derece etkili bir yöntemdir. Asidoliz reaksiyonunda serbest ya da etil ester formundaki yağ asitlerinin yağlara inkorporasyonu söz konusudur. Yaygın olarak, bitkisel yağlar ve balık yağlarından asidoliz yöntemi ile yapılandırılmış yağ üretilmektedir [18,22]. Şekil 2.7'de asidoliz reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.7: Asidoliz reaksiyonu [22]

Asidoliz reaksiyonları yüksek sıcaklıklarda, asit katalizör varlığında tersinir olarak gerçekleşir [32].

2.2.2 Yapılandırılmış yağların uygulamaları

Lipaz enzimlerinin katalizörlüğünde gerçekleşen enzimatik interesterifikasyon modifikasyonları ile, kakao yağı ikameleri, anne sütü yağına benzer yapılandırılmış TAG'ler, kısmi açilgliseroller, zenginleştirilmiş yağlar, kalorisi azaltılmış yağlar, ve çeşitli lipit ürünlerinin üretimi mümkün olabilmektedir [21].

Kakao yağının şekerleme ve çikolata endüstrisinde büyük bir yeri vardır. Ancak kakao yağının çok pahalı bir hammadde olmasından dolayı, yağ sanayi diğer yağları modifiye ederek, kakao yağı benzeri yağları üretmeye yönelmiştir. Doğada kakao yağına benzer yapıda başka yağ bulunmamaktadır; bu yağın alternatifleri karışım halinde bulunan bitkisel yağlar ve modifiye yağlardır [14].

Yeni doğan bebekler için anne sütü, hücreleri için gerekli olan yapısal komponentleri ve enerjiyi sağlayan tek doğal besin kaynağıdır. Bu nedenle, bebek beslenmesi ve gelişimi açısından anne sütünün son derece önemli olduğu bilinmektedir. Anne sütü yaklaşık olarak %3-5 oranında yağ içermektedir. Anne sütünün en önemli bileşeni olan yağın gliserol molekülündeki özgün yağ asidi dizilimi bitkisel ve hayvansal yağlardan oldukça farklıdır. Anne sütü bileşimi beslenme, laktasyon (emzirme) devresi, ırk, genetik özellikler ve mevsim gibi birçok faktöre bağlı olarak değişim gösterse de genel olarak oleik (%30-35), palmitik (%20-30), ve linoleik asitçe (%7-14) zengin TAG karışımıdır. Anne sütünde bulunan TAG'ler, anne sütünün toplam yağ asitlerinin %20-25'ini oluşturan palmitik asidi (C16:0) %60-70 oranında gliserol molekülünün sn-2 pozisyonunda, uzun zincirli doymuş veya doymamış yağ asitlerini ise sn-1,3 pozisyonlarında bulundurmaktadırlar. Bu özgün yapı sadece anne sütü yağında görülmektedir [21]. Anne sütünün yağ asitlerinin dizilimine benzer nitelikte yapılandırılmış yağ üretimi, palm yağından elde edilen tripalmitin ile bitkisel yağlardan elde edilen oleik asitin 1,3-spesifik lipaz enzimi varlığında transesterifikasyonu ile gerçekleştirilebilmekte ve bu lipidler sayesinde ideal bebek maması formülasyonları elde edilebilmektedir [33].

Zenginleştirilmiş yağlar sağlık açısından faydalı yağ asitlerinin trigliserit molekülünde spesifik pozisyonlara yerleştirilmesi sonucu elde edilirler. Bu asitlere örnek olarak balık yağ asitleri ve gamma linoleik asidi gösterebiliriz [34].

Gıdalardaki yağ miktarının azaltılıp yağ benzeri maddelerle ikame edilmesi ve yeni katkılarla kalori değerinin azaltılması son yıllarda üzerinde oldukça durulan konulardan biri haline gelmiştir. Süt, peynir, yoğurt, dondurma gibi pek çok gıda maddesi üzerinde bu tür uygulamalara rastlamak mümkündür [35]. Kalorisi azaltılmış yağlar ise yüksek oranda yağ tüketiminin yol açtığı risklere karşı büyük önem taşımaktadır. Protein ve karbonhidrat bazlı yağ ikame maddeleri yüksek sıcaklıklara maruz bırakılamadıklarından, doğal yağın tüm özelliklerini sağlayan tek alternatif yağ bazlı yağ ikame maddeleridir. Düşük kalorili yapılandırılmış yağlar

uzun zincirli doymuş yağ asitlerinin kısıtlı emilimi ve kısa zincirli yağ asitlerinin düşük kalori değeri gibi avantajları biraraya getirilerek elde edilmektedirler.

Tıbbi uygulamalarda da yapılandırılmış yağların kullanımı söz konusudur. Enteral (ağızdan tüple beslenme) ve parenteral (damardan serumla) beslenmede orta zincirli triaçilgliserol (MCT) ve uzun zincirli triaçilgliserol (LCT)'lerden oluşan fiziksel karışımlar kullanılmaktadır [36].

2.3 Enzimatik Yöntem ile Yapılandırılmış Yağ Üretimi

2.3.1 Enzimler

Enzimler canlı hücrelerinde meydana gelen kimyasal reaksiyonları katalizleyen ve bu sayede reaksiyonların daha hızlı ve daha verimli bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan çoğunluğu protein yapısında olan biyomoleküllerdir.

Üstün özelliklere sahip olan enzimler tepkimelerin yüksek hızlarda meydana gelmesini sağlarlar. Örnek olarak alkali fosfataz enzimi katalizledigi tepkimeye 10^{17} mertebesinde bir hız artışı getirir [37].

Enzimlerin önemli özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

- Ilımlı tepkime koşullarında çalışırlar. Enzimler, pH 5–8 arasında genellikle de 7 ye yakın değerlerde etkilidirler. Enzimler düşük sıcaklıkta, 20–40 ^{o}C'de genellikle vücut sıcaklığı olan 37 ^{o}C'de tepkimeleri katalizlerler.

- Yan ürün oluşturmazlar. Organik kimyasal tepkimelerde az veya çok yan ürün meydana gelir. Enzim katalizli tepkimelerde yan ürün meydana gelmez, verim %100'dür. Aksi halde, örneğin milyonda bir bile yan ürün meydana gelse idi, bu zamanla birikerek yaşamın gidişini olumsuz yönde etkileyebilirdi. Bozunma, izomerizasyon, rasemizasyon ve yeniden düzenlenme tepkimeleri kimyasal olarak gerçekleşmez.

- Spesifiktirler. Enzimler sadece bir substrata veya aynı fonksiyonlu grubu olan substrat serisine karşı etkindir. Molekülü yakın olsa bile bunun dışındaki maddelere karşı etkinlik göstermez.

- Enzim molekülü büyük olmakla birlikte, substrat bunun her yerine değil, 'aktif merkez' denilen özel bir yerine bağlanır ve biyokimyasal tepkime orada meydana

gelir. Aktif merkezdeki enzim ve substratın geometrileri birbirine uygundur ve aralarında anahtar kilit ilişkisine benzer bir ilişki vardır [38].

Enzimlerin aktivite göstermeleri için gerekli olan ve protein yapısında olmayan, genellikle metal iyonlarından oluşan yan gruplara "kofaktör" denilir. Enzimlerin aktivite göstermeleri için gereksinim duyduğu kompleks organik moleküllere "koenzim" denir. Bazı durumlarda enzim aktivite göstermek için hem kofaktöre hem de koenzime gereksinim duyabilir ve enzime kovalent olarak bağlanabilir. Bu durumda diyaliz ile uzaklaştırılmaları mümkün olmaz. Enzim yüzeyine sıkıca bağlanmış ve protein yapısında olmayan bu gruplara "prostetik grup" denir. Eğer enzim koenzim veya kofaktörü ile birlikte ve katalitik bakımdan aktif durumda ise enzimin bu haline "haloenzim" denir. Koenzim ve kofaktör enzimden ayrılacak olur ve enzim inaktif hale gelirse, diyalizle ayrılmayan yalnız proteinden oluşan enzimin inaktif şekline "apoenzim" denir.

Enzimlerle katalize edilen tepkimeye katılan kimyasal moleküllere substrat adı verilir. Bir enzimatik reaksiyonun hızı, enzimin etkinliği veya enzimin aktivitesi ile ilişkilidir. Bir enzimin aktivitesi, o enzim tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonun hızının, enzim etkisiyle optimal koşullarda belirli sürede ürüne dönüştürülen substrat miktarına göre ifadesidir. Etkinliği veya aktivitesi fazla olan bir enzim, belirli bir sürede daha fazla substrat molekülünü ürün haline dönüştürür.

Birçok enzim, substratlarının adına veya aktivitelerini tanımlayan bir kelime veya sözcük grubuna "az" soneki ekleyerek adlandırılır. Üreaz, amilaz, arjinaz, proteaz ve lipaz, substratı tanımlayan; DNA polimeraz, laktat dehidrojenaz ve adenilat siklaz, tepkimeyi tanımlayan adlandırmalardır. Çok az da olsa "in" takısı getirilerek adlandırılan özel enzimler vardır. Bunlar genellikle proteolitik enzimlerdir. (Pepsin, Kimotripsin, Tripsin).

Enzimler yaptıkları işe göre, oksidoredüktazlar, transferazlar, hidrolazlar, liyazlar, izomerazlar, ligazlar olarak altı ana grupta sınıflandırılırlar [39].

2.3.2 Yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan lipaz enzimleri

Hidrolaz grubuna giren lipazlar (triaçilgliserol açil hidrolaz, E.C.3.1.1.3) esterazların özel bir sınıfının etkilerini de gösterirler, hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan elde edilmektedirler. Lipazlar, suda çözünmeyen lipid substratlarına karşı yüksek bir enzim aktivitesi gösterirler. Lipazlar, özellikle su-yağ fazı arasındaki iç yüzeyde

substrata karşı katalitik etki göstererek, trigliseridleri; digliserid, monogliserid, gliserol ve yağ asitlerine hidrolizlemektedirler. Aynı zamanda, su ile karışmayan organik çözücülerde lipid substratlarının esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını da katalizlemektedir [40].

Lipazlar organik çözücü ortamında esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, susuz ortamda kararlı ve aktif olmaları, kofaktör gerektirmemeleri, yüksek katalitik güçleri, ucuz olmaları, yüksek substrat seçicililikleri ve yan ürün oluşumunu engellemelerinden dolayı tercih edilirler. Endüstride ve bilimsel araştırmalarda; hidroliz, esterleşme, transesterleşme, peptit sentezi gibi reaksiyonları ve pozisyon seçimli, stereoseçimli dönüşümleri katalizlemekte kullanılırlar. Birçok tepkimeyi katalizleyebilme yetenekleri ile deterjan, gıda, deri, kağıt, kozmetik ve farmasötik endüstrilerinde geniş kullanıma sahiptirler. Endüstriyel lipazlar, genellikle hücre dışı lipaz üreten mikroorganizmalardan sağlanır [41]. Çizelge 2.1'de lipazların endüstriyel uygulama alanları görülmektedir.

Çizelge 2.1: Lipazların Endüstriyel Uygulama Alanları [38]

Endüstri	Tepkime	Ürün / Uygulama
Deterjan	Yağların Hidrolizi	Yağ atıkların uzaklaştırılması
Süt Ürünleri	Süt yağının hidrolizi Peynirin olgunlaştırılması	Süt, peynir ve tereyağda Tat geliştirme
İçki	Aroma geliştirme	İçkiler
Yağ	Transesterleşme Hidroliz	Kakao yağı, Margarin, Yağ asitleri, Gliserol
Et ve Balık	Tat arttırma	Et ve balık ürünleri
Kimyasallar	Enantiyoseçimlilik Sentez	Kiral yapı taşları
Farmasötik	Transesterleşme Hidroliz	Sindirime yardımcı özel yağlar
Kozmetik	Sentez	Nemlendirme
Deri	Hidroliz	Deri ürünleri
Kağıt	Hidroliz	Kaliteli kağıt üretimi
Temizlik	Hidroliz	Yağların uzaklaştırılması

2.3.3 Enzimatik prosesi ve ürün verimini etkileyen faktörler

Enzimatik yöntem ile yapılandırılmış yağ üretiminde enzimatik prosesi ve ürün verimini etkileyen pek çok faktör vardır. Reaksiyonda kullanılan enzimin çeşidi,

enzimin aktivitesi, enzimin miktarı, enzimin yükü, enzimin substrata göre değişen seçiciliği ve diğer özellikleri prosesi etkileyen önemli faktörlerdir. Ayrıca ortamda bulunan su miktarı, ortamın pH'sı, substrat mol oranı, inkübasyon süresi, reaksiyon sıcaklığı, ışık ve diğer fiziksel parametreler ürün verimini etkileyen diğer faktörlerdir [23, 33].

2.3.3.1 Lipaz seçimi

Lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen reaksiyonlarda amaç en yüksek verimle en yüksek saflıkta ve istenen özelliklerde ürün elde etmektir. Bu yüzden lipaz seçiminin reaksiyon ve ürün verimi üzerine etkisi oldukça önemlidir [33]. Seçilen enzim yapılandırılmış yağ üretimini etkiler. Lipazlar su, pH, sıcaklık, çözücü (solvent) gibi reaksiyon koşullarından etkilenirler. Lipazlar organik çözücü ortamında aktif haldeyken kataliz için belli miktarda su gerekmektedir. Lipazın aktivitesinin belirlenmesinde, su ve solvent sistemi kritik rol oynar [29]. Lipazlar substrat seçiciliği açısından değişiklik gösterirler. Enzimin hangi substratla çalışılacağını saptayan kısmı apoenzim kısmıdır. Apoenzim kısmı ile substrat arasında bir ilişki vardır. Lipazların pozisyonel seçiciliği, yağ asidi seçiciliği ve stereospesifikliği, istenen TAG'ın sentezi için en yüksek verimi elde etmeye olanak sağlar [14].

2.3.3.2 Sıcaklık

Enzimlerin çalısma mekanizmalarına etki eden en önemli faktörlerden biri sıcaklıktır. Çalısma prensiplerinde üç boyutlu yapıları oldukça önemli olduğundan ve sıcaklıkla da bu yapı kolaylıkla değistiğinden dolayı, enzimler genel olarak yüksek sıcaklıklarda inaktif olmaktadırlar. Buna denaturasyon denir. Genel olarak sıcaklık yükseldiginde tepkime hızı artar; yani tepkime hızının yükselmesi, sıcaklıkla doğru orantılıdır. Fakat belirli bir noktadan itibaren tepkime hızı düşmeye başlar ve tamamen durur. Enzimin en iyi çalısabileceği sıcaklığa "Optimum Sıcaklık" denir. Her enzim için optimum sıcaklık farklıdır [38]. İmmobilize lipazların çoğunluğu için optimum sıcaklık 30-62 ^{o}C arasıdadır. Sıcaklığın yükselmesiyle uzun zincirli yağ asitlerinin çözünme hızı, kısa zincirli yağ asitlerininkinden daha hızlı olur. Ayrıca yüksek sıcaklık, reaksiyon karışımının viskozitesini azaltır ve açil transferini etkiler [29].

2.3.3.3 pH

Enzimatik reaksiyonlar ortamın H^+ iyonu konsantrasyonundan (pH) kolaylıkla etkilenirler. Enzimler pH değişimine karşı çok duyarlıdırlar. Genellikle çok fazla asidik ve alkalik ortamda etkisizdirler. Bazı hallerde enzimler en yüksek etkinliği belirli bir pH derecesinde gösterirler. Bu pH derecesine "Optimum pH" denir. Her enzim için optimum pH farklıdır [38].

2.3.3.4 Su miktarının etkisi

Reaksiyon karışımında bulunan su miktarı hem rekasiyon verimi hem de reaksiyon hızını etkiler. Tersinir reaksiyonlar olan hidroliz ve esterifikasyon reaksiyonlarından, hidroliz reaksiyonunda su reaksiyona girerken, esterifikasyon reaksiyonunda ise su ürün olarak ortaya çıkmaktadır. Su miktarına göre reaksiyon hidroliz ya da esterifikasyon yönünde gerçekleşir. Bu yüzden su miktarı reaksiyonun yönünü belirleyen önemli bir faktördür [42, 43].

2.3.3.5 Sürenin etkisi

Enzimatik yöntemle yapılandırılmış yağ üretiminde, üretim maliyetini düşürmek için reaksiyonların en kısa sürede ve en yüksek verimle gerçekleşebilmeleri oldukça önemlidir. Genel olarak uzun reaksiyon sürelerinin açil migrasyonunu arttırdığı bildirilmektedir. Enzimatik reaksiyonlarda belli bir süreden sonra TAG'lara yağ asitlerinin katılımı sabitlenmektedir [43].

2.3.3.6 Substrat mol oranının etkisi

Reaksiyonlarda substrat miktarı ve substratı oluşturan bileşenler arasındaki mol oranı yeni oluşturulan triaçilgliserolün verimini etkilemektedir. Substrat mol oranının arttırılması TAG yapısına katılan yağ asidi miktarını arttırır. Ancak aşırı substrat kullanmak enzimin inhibasyonuna sebep olur. Bu yüzden substrat mol oranı enzimin inhibasyonuna neden olmayacak bir aralıkta seçilmelidir. Reaksiyonlardaki substrat mol oranı seçilirken prosesin maliyeti ve serbest yağ asitlerinin ve diğer açil kaynaklarının uzaklaştırılmalarındaki güçlükler göz önünde bulundurulmalıdır [42, 43].

2.4 Tripalmitin, Konjuge Linoleik Asit ve Laurik Asit ile Yapılan Literatür Çalışmaları

Carrin ve Crapiste tarafından yapılan bir çalışmada, kesikli bio-reaktörde ayçiçek yağının palmitik-stearik asit karışımı ile enzimatik asidolizi gerçekleştirilmiş ve yapılandırılmış yağ üretilmiştir. 3 immobilize lipaz arasında eleme yapmak için fraksiyonel faktöriyel metod kullanılmıştır. Bu enzimler; *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM, sn-1,3 spesifik), *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IM, sn-1,3 spesifik) ve *Candida antarctica* (Novozym 435, nonspesifik lipaz) orjinli enzimlerdir. En yüksek katılımı Lipozyme RM IM sağlamıştır. Toplam substrat ağırlığının %8'i kadar enzim kullanıldığında, palmitik-stearik asit: ayçiçek yağı mol oranı 6:1 alındığında ve reaksiyon, solvente su eklenmeden yürütüldüğünde en yüksek doymuş yağ asidi katılımı ve maksimum verimle yapılandırılmış yağ üretimi sağlanmıştır. 50-60°C'de 24-48 saat arasında çalışıldığında katılımın daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu koşullarda yapılandırılmış yağın erime profilinin ayçiçek yağından farklı olduğu gözlenmiştir. Açil migrasyonu özellikle substrat mol oranı, sıcaklık ve reaksiyon süresinden etkilenmiştir [44].

Bektaş ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada hekzan varlığında tripalmitinin kaprik asit ile enzimatik asidolizi incelenmiştir. Bu çalışma için seçilen enzim *Thermomyces lanuginosa* orjinli Lipozyme TL IM enzimidir. Enzimatik olarak tripalmitinden kaprik asitçe zenginleşmiş TAG'ların eldesinde, reaksiyon parametrelerinin (değişkenlerin) ürün bileşimi üzerine olan etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla deneysel tasarımdan yararlanılmıştır. Bu amaçla Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılmıştır. 3 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak asidoliz deneylerinin tasarımı yapılmıştır. Substrat mol oranı KLA/TP, 4-8; enzim miktarı toplam subtrat miktarının %9-15'i ve reaksiyon süresi 6-10 saat arasında alınarak deneyler yürütülmüştür. En yüksek KLA katılımının (%35.7) KLA/TP mol oranı 6.5, enzim miktarı %11.6 ve reaksiyon süresi 8.9 saat iken gerçekleştiği gözlenmiştir [14].

Guncheva ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada yeni izole edilmiş termostabil bir lipaz katalizörlüğünde tripalmitinin oleik asit ile asidolizine ilişkin bir çalışma yürütülmüştür. Tripalmitinin oleik asit ile asidolizinde, sağlık açısından faydalı yapılandırılmış yağ üretmek için *Bacillus stearothermophilus* MC7 (lipaz

MC7) orjinli lipazın katalitik etkinliği incelenmiştir. İmmobilize enzim, çözücüsüz ortamda, 60°C'de 50 günlük yarılanma ömrü ile iyi bir işlevsel termostabilite göstermiştir. 48 saatlik bir reaksiyon sonunda %50' nin üzerinde dönüşüm miktarı gözlenmiştir. Çok geniş bir spektrumda, farklı çözücülerle yapılan deneylerde de, lipase MC7 enziminin orta polaritedeki çözücülere tolerans gösterdiği gözlenmiştir [45].

Alim ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada düşük sıcaklıkta fraksiyonlanmış pirinç kepeği yağının konjuge linoleik asit ile enzimatik transesterifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *Thermomcyces lanuginosus* orjinli 1,3-spesifik Lipozyme TL IM enzimi kullanılmıştır. Enzim miktarı toplam substrat miktarının %10'u oranında belirlenmiştir. Pirinç kepeği yağı: KLA mol oranı ise 1:1 olacak şekilde seçilmiştir. Reaksiyonlarda çözücü olarak hekzan kullanılmıştır. Reaksiyonlarda lipazın su aktivitesi, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi deneysel tasarım değişkenleri olarak belirlenmiş ve 3 değişkenli 3 seviyeli faktöriyel tasarım uygulanmıştır. Reaksiyonlar lipazın su aktivitesi 0.158, 0.344, 0.526, sıcaklık 45^{o}C, 55^{o}C, 65^{o}C ve reaksiyon süresi 12, 24, 36 saat olacak şekilde yürütülmüştür. Maksimum konjuge linoleik asit katılımının (%20,5) sağlandığı optimum koşullar lipaz su aktivitesi 0,177, reaksiyon sıcaklığı 55.66 ^{o}C ve reaksiyon süresi 29,25 saat olarak belirlenmiştir [20].

Şahin ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada anne sütüne özdeş yağ elde etmek için tripalmitinin fındık yağı yağ asitleri ve stearik asit ile enzimatik asidolizi incelenmiştir. Tripalmitinin fındık yağı yağ asitleri ve stearik asit ile asidolizi sonucu elde edilen palmitik, oleik, stearik ve linoleik asitleri içeren yapılandırılmış yağlar anne sütü yağını andırırlar. Çalışmalarda *Rhizomucor miehei* kaynaklı sn-1,3-spesifik lipaz olan Lipozyme RM IM kullanılmıştır. Enzim miktarı toplam substrat miktarının %10'u olacak şekilde alınmıştır. Substrat mol oranının, reaksiyon sıcaklığının ve reaksiyon süresinin stearik ve oleik asit katılımına etkileri incelenmiştir. Çözücü olarak hekzan kullanılmıştır. Asidoliz reaksiyonları tripalmitin/fındık yağı yağ asitleri/stearik asit 1:1.5:0.5, 1:3:0.75, 1:6:1, 1:9:1.25 ve 1:12:1.5 substrat mol oranlarında, 55, 60, 65 ^{o}C'de, 3, 6, 12, 14 saat ve toplam substrat miktarının %10'u kadar Lipozyme RM IM kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak en yüksek C18:1 bağlanma miktarı %47,1 ve en yüksek C18:1/C16:0 oranı 65^{o}C'de, 24 saat sonunda ve 1:12:1.5 (tripalmitin/fındık yağı yağ asitleri/stearik asit) substrat mol

oranında gerçekleşmiştir. Elde edilen yağın bebek mamalarında kullanılabileceği belirlenmiştir [46].

Villeneuve ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sn2 pozisyonunda KLA ve sn1,3 pozisyonlarında laurik asit içeren yapılandırılmış yağlar elde etmişlerdir. İlk olarak yüksek oranda KLA(>%95) içeren modifiye edilmiş yeni bir yağ elde etmek için hint tohumu yağı kimyasal olarak dehidrate ve izomerize edilmiştir. Sonra bu elde edilen yeni yağ, 1,3 pozisyon seçici enzimler kullanılarak yürütülen enzimatik transesterifikasyon reaksiyonlarında kullanılmıştır. Transesterifikasyon reaksiyonlarında katalizör olarak *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TL IM) ve *Carica papaya* orijinli lipaz enzimleri kullanılmıştır. Bu enzimlerden *Aspergillus niger* lipazı memnun edici sonuçlar vermemiştir ve lauroil katılımı çok düşük olmuştur(<5%). Buna karşılık *Thermomyces lanuginosa* ve *Carica papaya* enzimlerinin yüksek reaksiyon verimliliği sağladığı gözlenmiştir. *Thermomyces lanuginosa* enzimi katalizörlüğünde katılımın %88,4 transesterifikasyon verimi ile 72. Saatte %58,9 olduğu gözlenmiştir. *Carica papaya* enzimi ile çalışıldığında lauroil katılımının *Thermomyces lanuginosa* enzimine göre daha düşük olduğu saptanmıştır [47].

Goli ve arkadaşları margarin üretimi için konjuge linoleik asit içeren yapılandırılmış yağın palm stearin ile enzimatik inesterifikasyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada *Candida antarctica* kaynaklı lipaz enzimi kullanılmıştır. Palm stearin yapılandırılmığ yağ oranı ağırlıkça 70:30, 60:40, 50:50, 40:60 ve 30:70 olacak şekilde deneyler yürütülmüştür. Elde edilen ürünlerin, orijinal karışım ile kıyaslandığında, daha düşük erime noktasına, farklı erime özelliklerine ve düşük katı yağ içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca X-ray difraksiyon analizi ile, inesterifikasyon sonucunda elde edilen tüm lipid karışımlarının daha çok beta kristal yapısına sahip olduğu gözlenmiştir. İnesterifikasyon sonucunda elde edilen karışımın, margarin ve benzer ürünlerin üretiminde kullanılmasının uygun olduğu görülmüştür [48].

Goli ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise konjuge linoleik asidin (KLA) iki önemli izomeri (cis9,trans11- and trans10,cis12-KLA) aspir yağının alkali izomerizasyonu ile üretilmiş, saflaştırılmış ve kanola yağı ve saflaştırılmış konjuge linoleik asidin lipaz katalizli inesterifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Kanola yağı ve 2 KLA izomerinin, *Thermomyces lanuginosus* kaynaklı lipaz enzimi ile katalizlenen

interesterifikasyon reaksiyonunda, 48 saat sonunda TAG'a katılan KLA miktarının %26.6 (mol) olduğu saptanmıştır [49].

Martinez ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada hekzan ortamında gliserinin KLA ile enzimatik esterifikasyonu gerçekleştirilmiştir [50]. *Rhizomucor miehei* enzimi (15%, w/w) ile 1:2 gliserin: serbest asit mol oranında 50^oC'de, 8 saat yürütülen reaksiyon sonunda esterleşme derecesinin %80 olduğu görülmüştür. Ayni miktarda *Candida antartica* enzimi (15%, w/w) ile çalışıldığında ise 1:1 substrat mol oranında 40^oC de 8 saat sonunda esterleşme derecesinin %80'in üzerine çıktığı tespit edilmiştir. 50^oC'de ve 1:1 substrat mol oranında %5 (w/w) enzim kullanımında da hem *Rhizomucor miehei* hem de *Candida antartica* enzimleri ile KLA esterleşmesinin 4 saatlik bir reaksiyon sonunda %90'ın üstüne çıktığı saptanmıştır [50].

Habulin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada sitronelol'ün laurik asit ile lipaz katalizli esterifikasyon reaksiyonu yürütülmüştür. Bu çalışmada, co-solvent olarak görev yapan iyonik sıvıların ve organik çözücülerin süper kritik CO_2 ortamında *Candida antarctica* enzimi ile yürütülen laurik asit ve sitronelol'ün direk esterifikasyonuna etkileri incelenmiştir. En yüksek sitronelol laurat konsantrasyonu, 3.95 mmol/g substrat kullanılarak, 60^oC'de 10Mpa basınçta yürütülen 1 saatlik reaksiyon sonunda, co-solvent olarak etil metilketon kullanılan çalışmada elde edilmiştir [51].

Senanayake ve arkadaşları balina yağı ile laurik asidin asidolizi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmanın amacı laurik asit katılımı ile balina yağının yağ asidi kompozisyonunu modifiye etmektir. Çalışmada 3 ticari enzim kullanılmıştır. Bunlar *Mucor miehei* orjinli Lipozyme IM, *Candida antarctica* orjinli Novozym-435, *Pseudomonas sp* orjinli PS-30'dur. Bu enzimlerden *M. Miehei* kaynaklı sn-1,3-spesifik lipaz en yüksek aktiviteyi göstermiştir ve balina yağı ile laurik asidin asidolizi için yapılan çalışmaların ilerlemesine yardımcı olmuştur. Elde edilen yapılandırılmış lipidin yağ asidi konsantrasyonunun orjinal yağdan farklı olduğu görülmüştür. *M. Miehei* lipazı için optimum substrat mol oranı balina yağı:laurik asit 1:3 olarak belirlenmiştir. 24 saat sonunda %29.7 laurik asit katılımı elde edilmiştir [52].

Kowalski ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmada sığır iç yağı ile laurik asidin enzimatik asidolizi gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar 60^{o}C'de, Lipozyme IM ile %4-10 su, Novozym 435 ile %2-10 su varlığında yürütülmüştür. Lipozyme IM katalizörlüğünde gerçekleştirilen asidoliz reaksiyonunda trigliseridin 1 ve 3. pozisyonlarına yaklaşık %95 laurik asit katılımı görülmüştür. Novozym 435 katalizörlüğünde gerçekleştirilen asidoliz reaksiyonunda ise trigliseride laurik asit katılımınında gelişigüzel bir dağılım görülmüştür [53].

Sellappan ve Akoh tristearinin laurik asit ve oleik asit ile enzimatik asidolizi üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada enzim olarak Lipozyme IM60, çözücü olarak da hekzan kullanılarak süre, sıcaklık, substrat mol oranı, su miktarı, enzim miktarı gibi reaksiyon parametrelerinin etkileri incelenmiştir. Uygun bir erime profiline sahip olan ürün, 1:4:1 (tristearin/laurik asit/oleik asit) substrat mol oranında yürütülen reaksiyon sonunda elde elde edilmiştir. Bu ürünün erime noktası 31.4^{o}C' dir. Bu ürünün kaplama maddesi olarak etkinliğini belirlemek için, reaksiyon ayni koşullarda karıştırmalı kesikli reaktörde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen 1200g lipidin etkinliği kaplanmamış kraker ve kakao yağı ile kaplı krakerlerle karşılaştırılarak incelenmiş ve sentezlenen lipidin nem absorbsiyonunu engellemede kakao yağından daha etkili olduğu saptanmıştır [54].

Literatürede tripalmitinin konjuge linoleik asit ve laurik asit ile enzimatik asidolizi konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Hammaddeler

Bu çalışmada kullanılan tripalmitin Sigma-Aldrich (Buchs, İsviçre), laurik asit Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Almanya)'dan temin edilmiştir. KLA One (Hard Line Nutrition) marka günlük beslenmeye takviye olarak kullanılan KLA kapsülleri ise piyasadan temin edilmiştir. Asidoliz reaksiyonlarında Lipozyme TL IM ticari lipaz enzimi kullanılmıştır. *Thermomyces lanuginosa* kaynaklı ve 1,3-spesifikliği olan bu enzim Novo-Nordisk A/S (Copenhagen, Danimarka) firması tarafından hediye edilmiştir. Reaksiyon ürünlerinin analizlerinde, yağ asitlerinin bileşimlerinin saptanması ve tanımlanmasında kullanılan tüm çözücüler ve kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiş saf ürünlerdir.

3.2 Çalışma Yöntemi

3.2.1 Kullanılan hammaddelerin karakterizasyonu

Çalışmamızda substrat olarak kullanılan KLA kapsüllerinin kalitatif içeriğinin saptanması İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography) ile yapılmıştır. Çalışmada kullanılan substratların (tripalmitin, laurik asit ve KLA) yağ asidi bileşimleri kapiler gaz kromatografisi (GC) ile saptanmıştır. Bu amaçla önce substratların metil esterleri hazırlanmış ve Hewlett-Packard 5890 Seri II (Hewlett-Packard, Waldron, Almanya) gaz kromatografisi cihazına beslenmiştir. Kromatogramlarda elde edilen piklerin tanımlanmasında, 8:0, 12:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2, 18:3 ve 20:0 yağ asitlerinin metil esterleri karışımı (Sigma-Aldrich) ile standard KLA metil esterleri karışımı'nın (Arkansas Üniversitesi, Gıda Bilimleri Bölümü, Amerika Birleşik Devletleri) aynı cihaz ve koşullarda yapılan analizlerinden elde edilmiş kromatogramları kullanılmıştır. Uygulanan kromatografik analiz koşulları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1: Gaz kromatografik analiz koşulları

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

[(1)] Alev iyonizasyon dedektörü

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

Gaz kromatografisi, hareketli fazı gaz olan, sabit fazına göre sıvı-gaz veya katı-gaz kromatografisi olarak ikiye ayrılan genel kromatografi tekniğinin özel bir uygulamasıdır. Gaz kromatografisi yöntemi uçucu maddelerin, oda sıcaklığı veya altındaki değerlerde gaz halindeki numunelerin tanımlanmasında ve uzun zincirli yağ asitlerinin analizinde kullanılır. Bu yöntemde numune gaz fazına beslenir. Numune bileşenleri hareketli ve sabit faz arasında dağılarak kolon boyunca hareket eder. Adsorbsiyonu veya çözünürlüğü farklı olan bileşenler kolon boyunca farklı hızlarda taşınırlar ve dedektör alanında saf gaz ile ayrılırlar.

3.2.2 Tripalmitinin KLA ve laurik asit ile asidoliz reaksiyonunda uygulanan yöntem

Asidoliz reaksiyonları 30 mL'lik koyu kahverengi, kapaklı ve ısıya dayanıklı cam reaksiyon şişelerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şişesine yaklaşık 1g substrat karışımı (belirli reaktan mol oranında tripalmitin, KLA ve laurik asitten hazırlanmış karışım) konulmuştur. Karışıma 5 mL hekzan eklenmiş ve üzerine toplam substrat miktarının ağırlıkça belli orandaki yüzdesi kadar Lipozyme TL IM enzimi ilave

edilmiştir. Böylece reaksiyonun gerçekleşeceği karışım hazırlanmış ve bu karışım sıcaklığın 50 °C'de sabit tutulduğu orbital çalkalayıcıya (Edmund Bühler, KS-15, Almanya) yerleştirilmiştir. Reaksiyon sırasında reaksiyon karışımı 220 rpm sabit hızla karıştırılmıştır. Karışımdan belirli zaman aralıklarında 3'er mL'lik numuneler alınmıştır. Bu numunelerin analizleri yapılarak asidoliz reaksiyonunun ilerleyişi incelenmiş ve değerlendirmeler yapılmıştır.

3.2.3 Asidoliz ürünlerinin analizi

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

Yapılandırılmış TAG'ların yağ asidi bileşimleri gaz kromatografik olarak incelenmiştir. Bu amaçla bu TAG'lardan A.O.C.S. Official Method Ce 2-66 yöntemi kullanılarak yağ asidi metil esterleri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Saf olarak elde edilen TAG fazından alınan yaklaşık 0,1-0,2 g yağa 4 mL 0,4 M metanolik NaOH eklenip 20 dakika geri soğutucu altında kaynatılmıştır. 20 dakika sonunda soğutucunun tepesinden karışıma 5 mL BF_3 metanol kompleksi, 5 dakika

sonra da 5 mL heptan eklenerek kaynatmaya birkaç dakika daha devam edilmiştir. Karışım soğuduktan sonra balon soğutucudan ayrılmış ve karışıma tuzlu su ilave edilerek heptan fazı çekilmiştir. 20 mL'lik yeni numune şişelerine alınan metil esterleri içeren heptan fazı susuz Na_2SO_4 ile kurutulmuş ve Bölüm 3.2.1'de açıklanan koşullarda uygulanan gaz kromatografisi yöntemi ile TAG'ların yağ asidi bileşimleri ve tripalmitine katılan KLA ve laurik asit miktarları (% Ağır.) tespit edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada tripalmitinden düşük kalorili yağların ve yağ ikame maddelerinin üretiminde kullanılabilecek, sağlığa daha yararlı olan, vücut metabolizmasını ve bağışıklık sistemini olumlu yönde etkileyen ve hızlı metabolize edilebilen orta zincirli laurik asit ve uzun zincirli doymamış bir yağ asidi olan konjuge linoleik asitçe zenginleştirilmiş triaçilgliserollerin, enzimatik yöntem ile üretimi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır.

Çalışmamızda öncelikle tripalmitin, konjuge linoleik asit ve laurik asidin yağ asitleri bileşimleri saptanmıştır. Daha sonra, tripalmitinin sabit sıcaklıkta (50°C'de), KLA ve laurik asit karışımı ile asidoliz reaksiyonları yürütülmüş ve reaksiyon parametrelerinin (enzim miktarı, tripalmitin:KLA:laurik asit mol oranı ve reaksiyon süresi) KLA ve laurik asit katılımına etkileri incelenmiştir. Kullanılan enzim için optimum sıcaklık olan 50°C'de çalışıldığından sıcaklık parametre olarak incelenmemiştir. Lipozyme TL IM enzimi, yapısında %2-3 su taşıdığından reaksiyon için gerekli su enzim ile sağlanmaktadır. Bu yüzden ortamdaki suyun etkisi de incelenmeye alınmamıştır.

4.1 Substratların Yağ Asidi Bileşimleri

Bu çalışmada önce substrat olarak kullanılan tripalmitin, KLA ve laurik asidin (LaA) bileşimleri Bölüm 3.2.1. de sunulan koşullarda gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. Çizelge 4.1 de tripalmitin, KLA ve LaA'nın yağ asitleri bileşimleri birlikte verilmiştir. Çizelge 4.1'den görüldüğü üzere, tripalmitin % 96,5 palmitik asit içermektedir. KLA % 79 saflıktadır. Laurik asit ise % 99,5 saflıktadır.

Çizelge 4.1: LA, KLA ve tripalmitinin yağ asidi bileşimleri

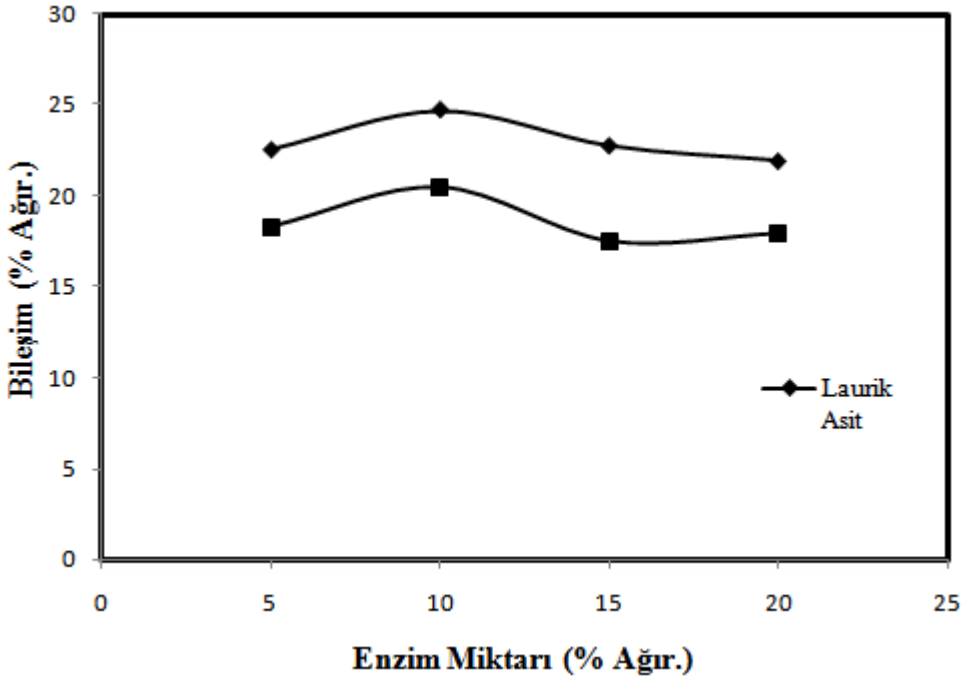
Yağ asidi	Bileşim (% Ağır.)		
	Tripalmitin	KLA	LaA
Laurik Asit, 12:0	0,07	-	99,45
Miristik Asit, 14:0	0,44	-	0,07
Palmitik Asit, 16:0	96,51	4,78	0,11
Linolenik Asit, 18:3		0,7	
Linoleik Asit, 18:2	-	12,85 (+18:1)	0,07
Oleik Asit, 18:1	-		0,16
Stearik Asit, 18:0	2,92	2,45	-
Konjuge Linoleik Asit	-	79,21	-

4.2 Tripalmitinin KLA ve Laurik Asit karışımı ile Enzimatik Asidolizinde Enzim Miktarının Etkisi

Çalışmamızın bu ilk bölümünde, tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile asidoliz reaksiyonunda enzim miktarının ürün TAG' larına katılan KLA ve laurik asit miktarına olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla yürütülen ilk denemelerde, tripalmitin:KLA:laurik asit mol oranı 1:1:3 olarak alınmış, enzim olarak 1,3-spesifik Lipozyme IM adlı *Thermomyces lanuginosa* orijinli ticari lipazı kullanılmış ve enzim miktarı substratların toplam ağırlığının %5'i ila %20'si arasında olacak şekilde 4 farklı değerde ortama ilave edilmiştir. Reaksiyonlar 50°C'de hekzan ortamında Bölüm 3.2.2'de açıklanan yönteme göre 2 saat yürütülmüştür. Reaksiyon sonunda karışımdan alınan örneklerden asidoliz ürünü olan TAG'lar ayrılmış ve bu TAG'ların yağ asitlerinin bileşimleri gaz kromatografı kullanılarak belirlenmiştir. TAG yağ asidi bileşimlerinin enzim miktarı ile değişimi Çizelge 4.2'de topluca verilmiştir. Bu verilerden faydalanarak çizilen, TAG'lara katılan KLA ve laurik asit miktarlarının enzim miktarı ile değişim eğrisi Şekil 4.1'de görülmektedir.

Çizelge 4.2: Tripalmitinin KLA ve laurik asit ile Asidolizinde, ürün yağ asitleri bileşiminin enzim miktarı ile değişimi (50°C; Tripalmitin:KLA:Laurik asit mol oranı 1:1:3)

Yağ Asitleri	Bileşim (% Ağır.)				
	TAG Orijinal	TAG %5	TAG %10	TAG %15	TAG %20
12:0	0,1	22,5	24,7	22,7	21,9
14:0	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
16:0	96,5	52,9	49,0	53,6	54,1
18:3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:2	0,0	3,6	3,6	3,5	3,5
18:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	2,9	2,4	1,9	2,4	2,2
KLA	0,0	18,3	20,5	17,5	18,0



Şekil 4.1: Tripalmitinin KLA ve laurik asit ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve laurik asit yüzdesinin enzim miktarı ile değişimi (tripalmitin:KLA:laurik asit; 1:1:3)

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.1'den görüldüğü üzere, %5 enzim miktarı ile çalışıldığında, orijinal TAG (tripalmitin) yağ asitleri bileşiminde KLA miktarı %0 iken ürün TAG'larının KLA içeriği % 18,3, laurik asit miktarı ise %0,1 iken ürün TAG'larının laurik asit içeriği %22,5 olmuştur. Enzim miktarının %10'a yükseltilmesiyle tripalmitine katılan KLA miktarı %20,5, laurik asit miktarı ise %24,7'değerlerine yükselmiştir. Enzim miktarının %15'e ve %20'ye yükseltilmesi ürün bileşimindeki KLA miktarını %17'lere, laurik asit miktarını ise %22'lere düşürmüştür. Bu sonuçlardan, maksimum KLA ve laurik asit katılımının %10 enzim miktarı ile sağlandığı görülmektedir. Asidoliz reaksiyonlarında tripalmitine KLA ve laurik asit katılım yüzdesi %10 enzim miktarı dışındaki değerlerde pratik olarak sabit kalmıştır. Bundan sonraki çalışmamızda tripalmitinin KLA ve laurik asit ile enzimatik asidolizinde, TP:KLA:LaA mol oranının etkisi ve reaksiyon süresinin etkisi incelenirken substratların toplam ağırlığının %10'u kadar enzim kullanılmıştır.

4.3 Tripalmitinin KLA ve Laurik Asit karışımı ile Enzimatik Asidolizinde Tripalmitin:KLA:Laurik Asit Mol Oranının Etkisi

Çalışmamızın bu bölümünde, tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile asidoliz reaksiyonunda substratların mol oranının ürün TAG'larına katılan KLA ve laurik asit

miktarına olan etkisi incelenmiştir. Bu reaksiyonlarda maksimum KLA ve laurik asit katılımını sağlayan enzim miktarı (%10) ile çalışılmıştır. Tripalmitin:(KLA+laurik asit) mol oranları 1:3, 1:4, 1:5 olmak üzere 3 ayrı seriden oluşan asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonların herbirinde kullanılacak asit miktarları, LaA:KLA oranı 0,33; 1 ve 3 olacak şekilde sabit tutulmuştur. Yapılan hesaplar sonucunda, 1:3 Tripalmitin: Toplam yağ asidi mol oranında yürütülen 1. seri deneyler, KLA:laurik asit mol oranları 2,25:0,74, 1,5:1,5, 0,75:2,25 olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.1:4 mol oranında çalışılan 2. seride KLA:laurik asit mol oranları 3:1, 2:2, 1:3 olacak şekilde asidoliz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. 1:5 mol oranında çalışılan 3. seri deneylerde ise asit miktarları, KLA:laurik asit mol oranları 3,75:1,25, 2,5:2,5, 1,25:3,75 olacak şekilde seçilmiştir. Böylece Laurik asit/KLA oranı her üç seride de sırasıyla 0,33;1 ve 3 olmuştur. Reaksiyonlar 50°C'de hekzan ortamında Bölüm 3.2.2 de açıklanan yönteme göre 2 saat yürütülmüştür. Reaksiyon ürünü TAG'lar reaksiyon ortamından izole edilmiş ve bu TAG'ların yağ asitlerinin bileşimleri gaz kromatografi kullanılarak belirlenmiştir. %10 enzim kullanılarak 1:3, 1:4 ve 1:5 Tripalmitin:KLA+Laurik asit mol oranlarında yürütülen bu reaksiyonlardan elde edilen ürünlerin TAG yağ asidi bileşimlerinin mol oranı ile değişimi sırasıyla Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Mol oranı etkisi incelenirken oluşturulan grafikler 2 farklı türde çizilmiştir. 1. grafik türünde TP:(KLA+LaA) (1:3, 1:4, 1:5) mol oranının tripalmitine katılan KLA ve LaA miktarlarına etkisi gösterilmiştir. 2. grafik türünde ise tripalmitine katılan KLA ve LaA miktarlarının LaA/KLA (0.33, 1, 3) mol oranına bağlı olarak değişimi gösterilmiştir. Buna göre, TP:(KLA+LaA) mol oranının KLA ve LaA katılımına etkisinin gösterildiği, Şekil 4.2 , Şekil 4.3 ve Şekil 4.4 sırasıyla LaA/KLA=0,33, LaA/KLA=1 ve LaA/KLA=3 mol oranları için çizilen grafiği göstermektedir. Tripalmitine farklı TP/KLA+LaA mol oranlarında katılan KLA ve LaA'nın LaA/KLA mol oranı ile değişimi sırasıyla Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.3: Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin laurik asit/ KLA oranı ile değişimi (50°C; %10 enzim; 2 saat; TP/toplam yağ asitleri mol oranı 1:3)

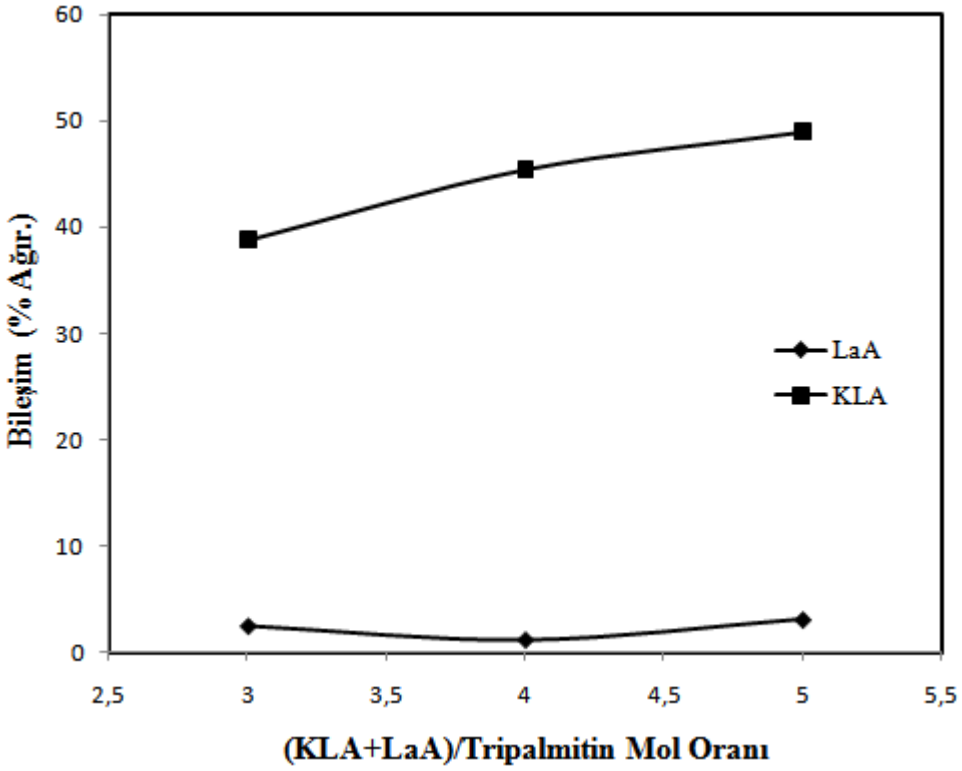
Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (% Ağır.)			
	TAG	Ürün TAG		
	Orijinal	LaA/KLA:0,33	LaA/KLA:1	LaA/KLA:3
12:0	0,1	2,5	8,2	19,7
14:0	0,4	0,2	0,3	0,3
16:0	96,5	48,1	55,0	61,0
18:3	0,0	0,0	0,5	0,0
18:2	0,0	8,0	4,1	2,7
18:1	0,0	0,0	0,1	0,0
18:0	2,9	2,4	2,1	2,4
KLA	0,0	38,8	29,7	13,8

Çizelge 4.4: Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin laurik asit: KLA oranı ile değişimi (50°C; %10 enzim; 2 saat; TP/toplam yağ asitleri mol oranı 1:4)

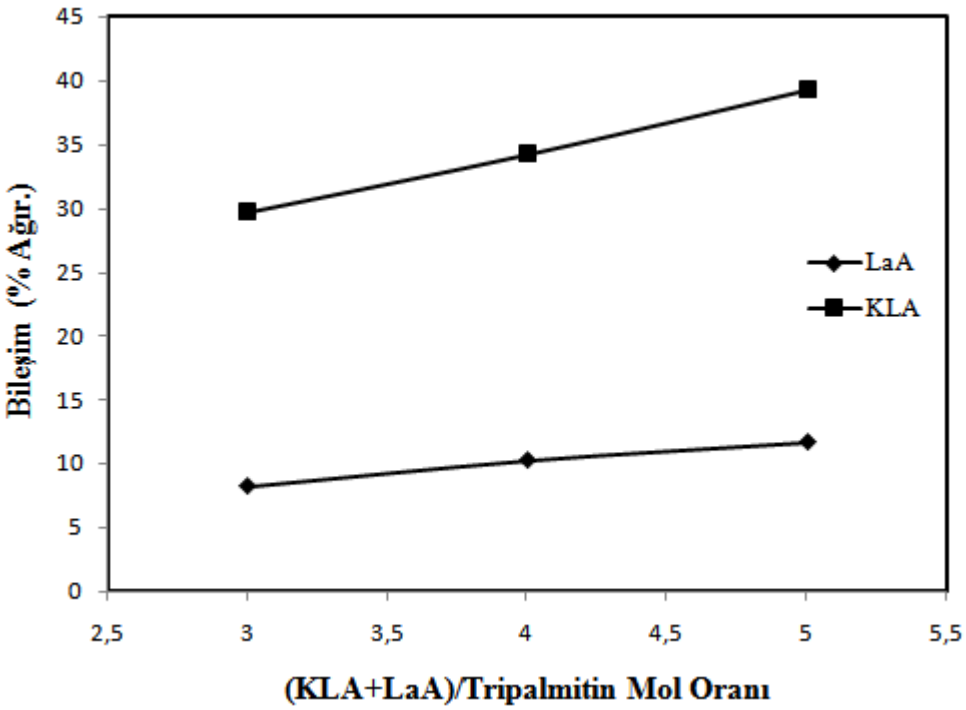
Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (% Ağır.)			
	TAG	Ürün TAG		
	Orijinal	LaA/KLA:0,33	LaA/KLA:1	LaA/KLA:3
12:0	0,1	1,2	10,2	26,4
14:0	0,4	0,1	0,2	0,3
16:0	96,5	42,3	47,0	48,4
18:3	0,0	0,5	1,2	0,3
18:2	0,0	8,3	5,0	2,6
18:1	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	2,9	2,3	2,1	1,6
KLA	0,0	45,4	34,2	20,4

Çizelge 4.5: Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin laurik asit: KLA oranı ile değişimi (50°C; %10 enzim; 2 saat; TP/toplam yağ asitleri mol oranı 1:5)

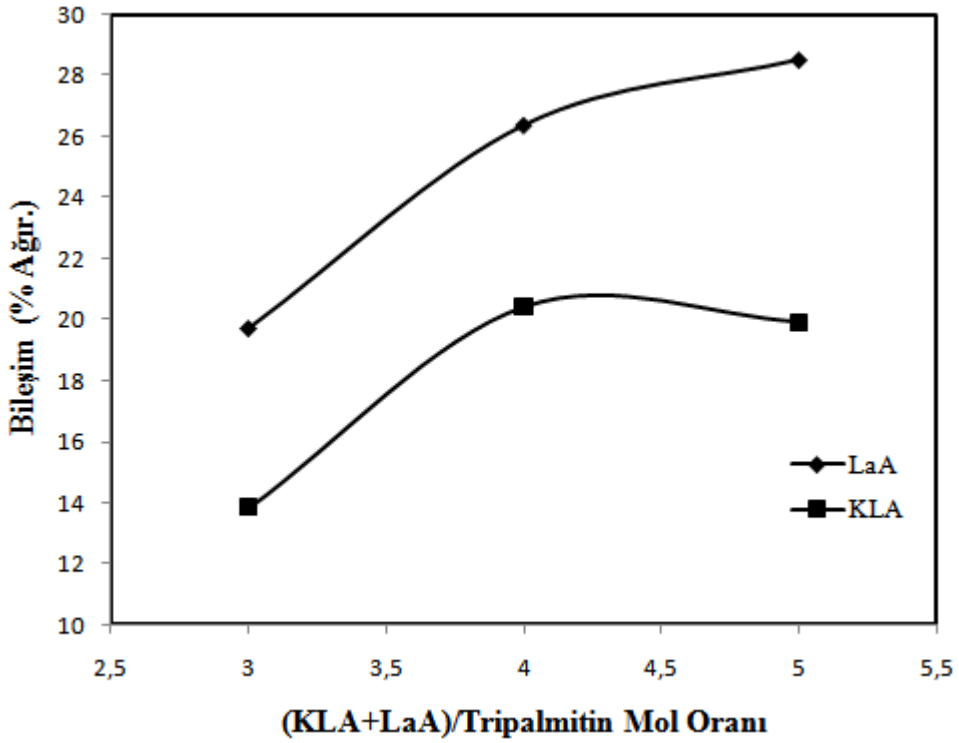
Yağ Asitleri	Yağ Asitleri Bileşimi (% Ağır.)			
	TAG	Ürün TAG		
	Orijinal	LaA/KLA:0,33	LaA/KLA:1	LaA/KLA:3
12:0	0,1	3,1	11,6	28,5
14:0	0,4	0,2	0,2	0,3
16:0	96,5	38,1	40,9	44,3
18:3	0,0	0,3	0,0	0,0
18:2	0,0	7,4	6,1	5,0
18:1	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	2,9	2,1	1,9	2,0
KLA	0,0	48,9	39,2	19,9



Şekil 4.2: Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile enzimatik asidolizinde, KLA ve LaA'in tripalmitine katılımlarının (KLA+LaA)/ TP mol oranı ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; 2 saat; LaA/KLA=0,33)

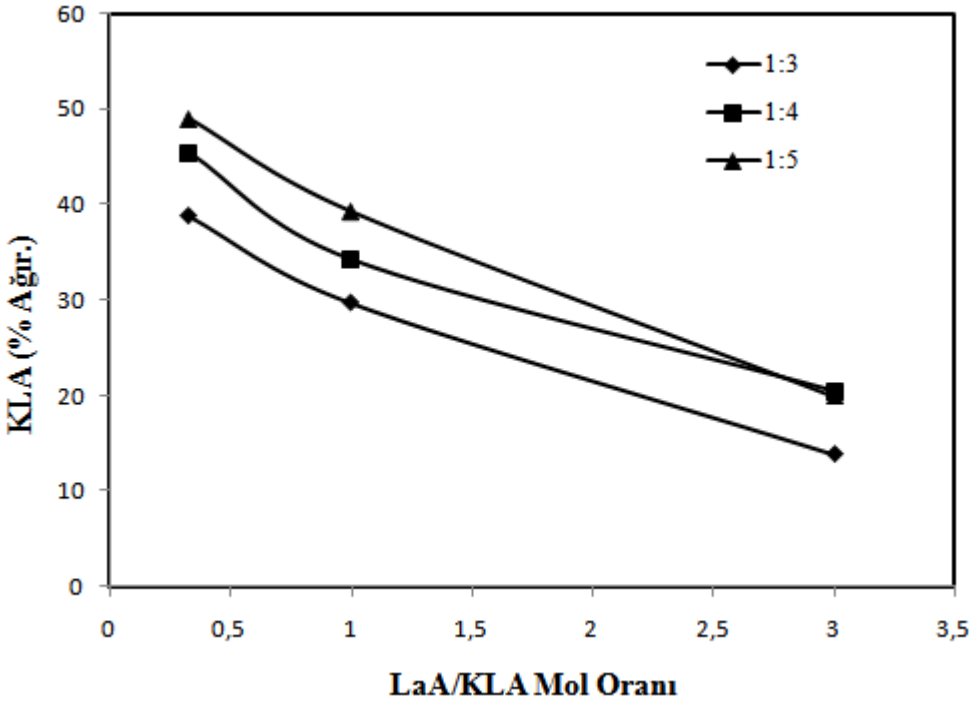


Şekil 4.3: Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve LaA miktarının (KLA+LaA)/ TP mol oranı ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; 2 saat; LaA/KLA=1)

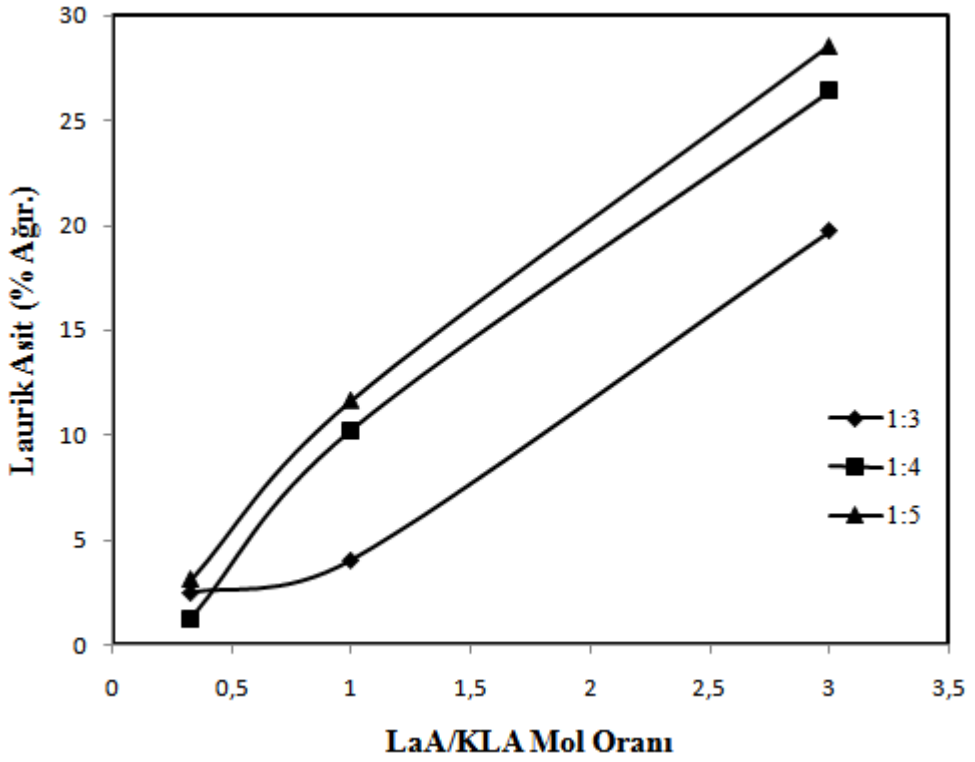


Şekil 4.4: Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve LaA miktarının (KLA+LaA)/ TP mol oranı ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; 2 saat; LaA/KLA=3)

Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'den, (KLA+LaA)/ TP mol oranının arttırılmasıyla ürün TAG moleküllerindeki KLA ve LaA miktarlarının arttığı gözlenmektedir. Her üç şekilde de KLA ve LaA yüzdelerinin TP:(KLA+LaA) 1:3 mol oranında katılım miktarlarının en az olduğu, TP:(KLA+LaA) 1:5 mol oranında ise katılım miktarlarının en fazla olduğu görülmektedir. En düzenli artış Şekil 4.3'de yani LaA/KLA mol oranının 1 olduğu durumda görülmektedir. KLA katılımı TP:(KLA+LaA) 1:3 mol oranında %29,7 iken 1:5 mol oranında yaklaşık %40'a kadar çıktığı görülmektedir. LaA miktarı ise TP:(KLA+LaA) 1:3 mol oranında %8,2 iken 1:5 mol oranında %11,6'ya çıkmıştır. Şekil 4.5'den, TP:(KLA+LaA)'nın 1:3,1:4 ve 1:5 oranında olduğu her üç durumda LaA/KLA mol oranının artması ile KLA miktarının azaldığı görülmektedir. TP:(KLA+LaA) mol oranının 1:3 olduğu durumda, LaA/KLA mol oranının artması ile KLA miktarı %38,8'den %13,8'e, TP:(KLA+LaA) 1:4 iken KLA miktarı %45,4'den %20,4'e, TP:(KLA+LaA) 1:5 olduğu durumda ise KLA miktarı %48,9'dan %19,9'a düşmüştür.



Şekil 4.5: Tripalmitinin KLA ve Laurik asit karışımı ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA miktarının LaA/KLA mol oranı ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; 2 saat)



Şekil 4.6: Tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan laurik asit miktarının LaA/KLA mol oranı ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; 2 saat)

Şekil 4.6'dan, TP:(KLA+LaA)'nın 1:3,1:4 ve 1:5 oranında olduğu her üç durumda da LaA/KLA mol oranının artması ile LaA katılımının arttığı görülmektedir. TP:(KLA+LaA) mol oranının 1:3 olduğu durumda, LaA/KLA mol oranının artması ile LaA miktarı %2,5'dan %19,7' ye, TP:(KLA+LaA) 1:4 iken LaA miktarı %1,2'den %26,4'e, TP:(KLA+LaA) 1:5 olduğu durumda ise LaA miktarı %3,1'den %28,5'e çıkmıştır. Ürün TAG bileşimindeki KLA ve LaA miktarının birbirine en yakın olduğu değerler LaA/KLA=3 iken görülmektedir. TP:(KLA+LaA) 1:3,1:4,1:5 ve LaA/KLA'nın 3 olduğu her üç durum incelendiğinde, birbirine en yakın ve en yüksek KLA ve LaA katılımının TP:(KLA+LaA) 1:4 iken olduğu görülmüştür. Buna göre etkin substrat mol oranının TP:(KLA+LaA)= 1:4 ve LaA:KLA oranının 3:1 olduğu gözlenmiştir.

4.4 Tripalmitinin KLA ve Laurik Asit Karışımı ile Enzimatik Asidolizinde Reaksiyon Süresinin Etkisi

Deneysel çalışmamızın en başından beri, reaksiyon süresinin tripalmitinin KLA ve LaA karışımı ile asidoliz reaksiyonuna olan etkisi incelenmeye alınmıştır. 3 ayrı seriden oluşan asidoliz reaksiyonları farklı sürelerde gerçekleştirilmiştir. Birinci seri olan TP:(KLA+LaA) 1:3 mol oranındaki asidoliz reaksiyonları 2,3,4 ve 6 saat olmak üzere 4 farklı sürede gerçekleştirilmiştir. İkinci seri olan TP:(KLA+LaA) 1:4 mol oranındaki asidoliz reaksiyonları ise 2,3,4 ve 5 olmak üzere yine 4 farklı sürede gerçekleştirilmiştir. Üçüncü seri yani TP:(KLA+LaA) 1:5 mol oranındaki asidoliz reaksiyonları ise 2,3 ve 4 olmak üzere 3 farklı sürede gerçekleştirilmiştir. Tüm reaksiyonlar 50°C'de hekzan ortamında Bölüm 3.2.2'de açıklanan yönteme göre %10 enzim kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon ürünü TAG'lar reaksiyon ortamından izole edilmiş ve bu TAG'ların yağ asitlerinin bileşimleri gaz kromatografi kullanılarak belirlenmiştir. TAG yağ asidi bileşimlerinin reaksiyon süresi ile değişimi Çizelge 4.6, Çizelge 4.7, Çizelge 4.8'de topluca gösterilmiştir. Bu çizelgelerden Çizelge 4.6 birinci seri, Çizelge 4.7 ikinci seri, Çizelge 4.9 ise üçüncü seri asidoliz reaksiyonları için oluşturulmuştur. Bu çizelgelerdeki KLA ve LaA verilerinden yararlanılarak TAG'lara katılmış KLA ve LaA miktarlarının reaksiyon süresi ile değişimini gösteren grafikler çizilmiş ve bunlar Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Bunlardan Şekil 4.7 birinci seri, Şekil 4.8 ikinci seri ve Şekil 4.9 ise üçüncü seri asidoliz reaksiyonları için oluşturulmuştur.

Çizelge 4.6: Tripalmitinin KLA ve LaA karışımı ile enzimatik asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin reaksiyon süresi ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) Mol Oranı 1:3)

Yağ Asitleri	Bileşim (% Ağır.)												
	TAG Orijinal	TAG LaA:KLA 2,5:0,5				TAG LaA:KLA 2:1				TAG LaA:KLA 1,5:1,5			
		2 saat	3 saat	4 saat	6 saat	2 saat	3 saat	4 saat	6 saat	2 saat	3 saat	4 saat	6 saat
12:0	0,1	22,0	19,9	20,0	20,2	15,4	12,7	13,7	15,4	8,2	9,2	6,7	8,4
14:0	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2
16:0	96,5	61,6	64,7	64,7	65,7	58,4	62,0	60,7	62,9	55,0	57,4	57,8	61,1
18:3	0,0	-	0,3	-	0,1	0,6	0,4	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4
18:2	0,0	0,2	2,1	0,2	1,4	3,0	3,6	2,7	2,7	4,1	4,3	4,0	3,3
18:1	0,0	1,7	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0
18:0	2,9	1,7	2,4	1,8	2,4	2,0	2,5	2,0	2,3	2,1	2,6	2,3	2,2
KLA	0,0	12,5	10,3	11,5	9,9	20,3	18,5	20,4	16,0	29,7	25,9	28,5	24,5

Çizelge 4.7: Tripalmitinin KLA ve LaA karışımı ile enzimatik asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin reaksiyon süresi ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) Mol Oranı 1:4)

Yağ Asitleri	Bileşim (% Ağır.)																								
	TAG Orijinal	TAG LaA:KLA 0,5:3,5				TAG LaA:KLA 1:3				TAG LaA:KLA 1,5:2,5				TAG LaA:KLA 2:2				TAG LaA:KLA 2,5:1,5				TAG LaA:KLA 3:1			
		2 saat	3 saat	4 saat	5 saat	2 saat	3 saat	4 saat	5 saat	2 saat	3 saat	4 saat	5 saat	2 saat	3 saat	4 saat	5 saat	2 saat	3 saat	4 saat	5 saat	2 saat	3 saat	4 saat	5 saat
12:0	0,1	0,5	0,8	0,4	1,0	1,2	1,5	1,2	0,6	4,2	4,7	3,2	1,8	10,2	9,6	7,8	10,5	16,1	14,8	15,0	13,3	26,4	21,7	22,7	24,5
14:0	0,4	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,3
16:0	96,5	37,8	40,0	41,5	43,6	42,2	42,9	44,0	45,3	44,9	45,3	48,8	48,8	47,0	49,7	49,4	50,2	51,5	51,6	52,2	55,1	48,4	55,4	55,5	53,3
18:3	0,0	0,5	0,3	0,3	0,0	0,5	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,2	0,4	0,9	0,4	0,4	0,4	0,6	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
18:2	0,0	7,9	7,9	7,7	7,7	8,3	7,1	6,8	6,8	6,1	6,0	5,7	5,9	5,0	4,9	5,0	4,4	3,5	4,2	3,8	3,5	2,6	2,8	2,7	2,6
18:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	2,9	2,4	2,2	2,4	2,2	2,3	2,2	2,2	2,4	2,2	2,1	2,2	2,2	2,1	2,2	2,0	2,1	2,1	2,1	2,1	1,9	1,6	2,2	2,3	1,8
KLA	0,0	50,9	48,8	47,6	45,4	45,4	45,8	45,2	44,2	41,8	41,3	39,4	40,7	34,2	33,1	34,9	32,1	26,1	26,6	26,0	25,8	20,4	17,3	16,3	17,2

Çizelge 4.8: Tripalmitinin KLA ve LaA karışımı ile enzimatik asidolizinde, ürün yağ asidi bileşiminin reaksiyon süresi ile değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) Mol Oranı 1:5)

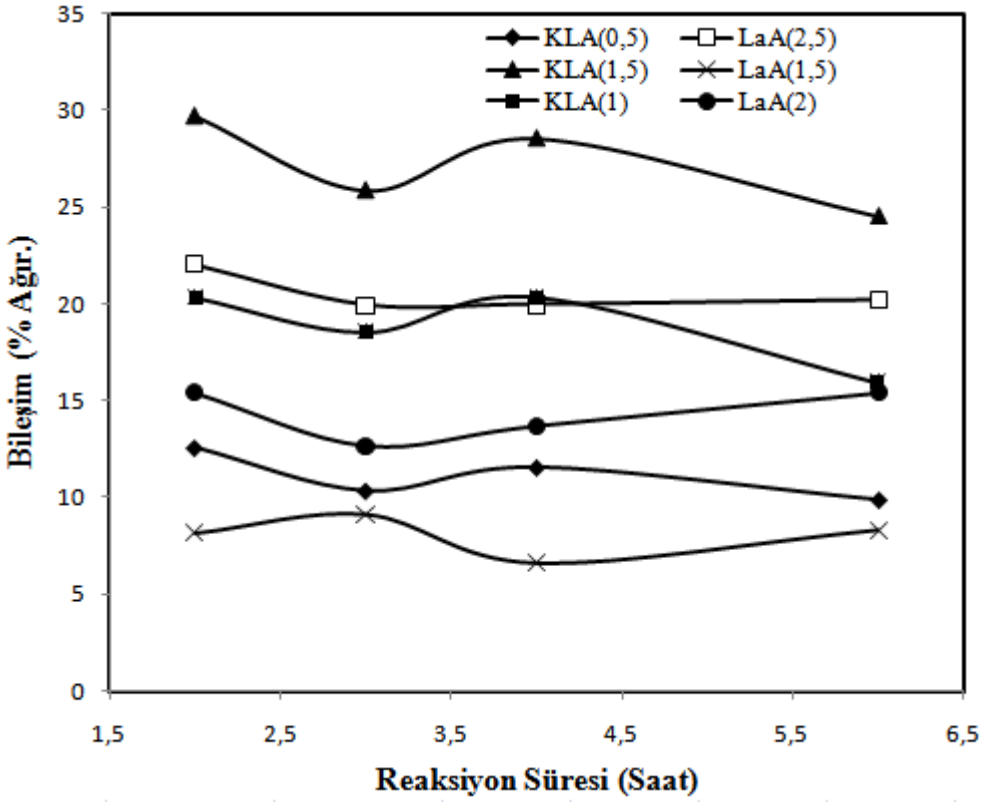
Yağ Asitleri	Bileşim (% Ağır.)									
	TAG Orijinal	TAG LaA:KLA 1,25:3,75			TAG LaA:KLA 2,5:2,5			TAG LaA:KLA 3,75:1,25		
		2 saat	3 saat	4 saat	2 saat	3 saat	4 saat	2 saat	3 saat	4 saat
12:0	0,1	3,1	2,1	2,6	11,6	10,9	13,9	28,5	24,8	27,6
14:0	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1
16:0	96,5	38,1	38,1	39,6	40,9	43,1	43,5	44,3	47,5	47,6
18:3	0,0	0,2	0,3	0,0	0,0	0,5	0,4	0,0	0,3	0,1
18:2	0,0	7,4	7,7	7,7	6,1	5,3	5,3	5,0	3,1	3,0
18:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	2,9	2,1	2,0	2,1	1,9	2,0	1,9	2,0	1,8	1,7
KLA	0,0	48,9	49,8	47,7	39,2	37,9	34,9	19,9	22,2	19,8

Çizelge 4.7'de, tripalmitine LaA katılımının incelenmesinde, LaA'nın 2,5 mol olduğu durumda 2. saatteki LaA katılımı %22 iken, 3. saatte katılım azalarak %19,9'a düşmüştür. 4.saatte LaA katılımı %20 olmuş ve 6. saatin sonunda katılım %20,2'ye yükselmiştir. En yüksek LaA katılımı KLA'da olduğu gibi reaksiyon süresi 2 saate ulaştığında gerçekleşmiştir. LaA'nın 2 mol olduğu durumda 2. saatteki LaA katılımı %15,4 iken, 3. saatte katılım %12,7'ye düşmüştür. 4. saatte LaA katılımı artarak %13,7 olmuş ve 6. saatin sonunda katılım tekrar artarak %15,4 olmuştur. 2. ve 6. saatin sonundaki LaA katılımları %15,4 değerini alarak aynı olmuştur. LaA'nın 1,5 mol olduğu durumda ise 2. saatteki LaA katılımı %8,2 iken, 3. saatte katılım artarak %9,2 olmuştur. 4. saatteki LaA katılımı %6,7'e düşmüş ve 6. saatin sonunda katılım tekrar bir artış göstererek %8,4'e çıkmıştır. Burada en yüksek katılım diğerlerinden farklı olarak 3. saatin sonunda gerçekleşmiştir. Tüm bu verilerden 1:3 TP/ (KLA+LaA) substrat oranında, LA:KLA oranının azalması ile tripalmitine KLA katılımının arttığı, LaA katılımının azaldığı, bu katılımların 6 saatlik bir reaksiyonda pratik olarak değişmediği, en yüksek KLA ve LaA katılımı için en uygun reaksiyon süresinin 2 saat olduğu sonucuna varılmıştır.

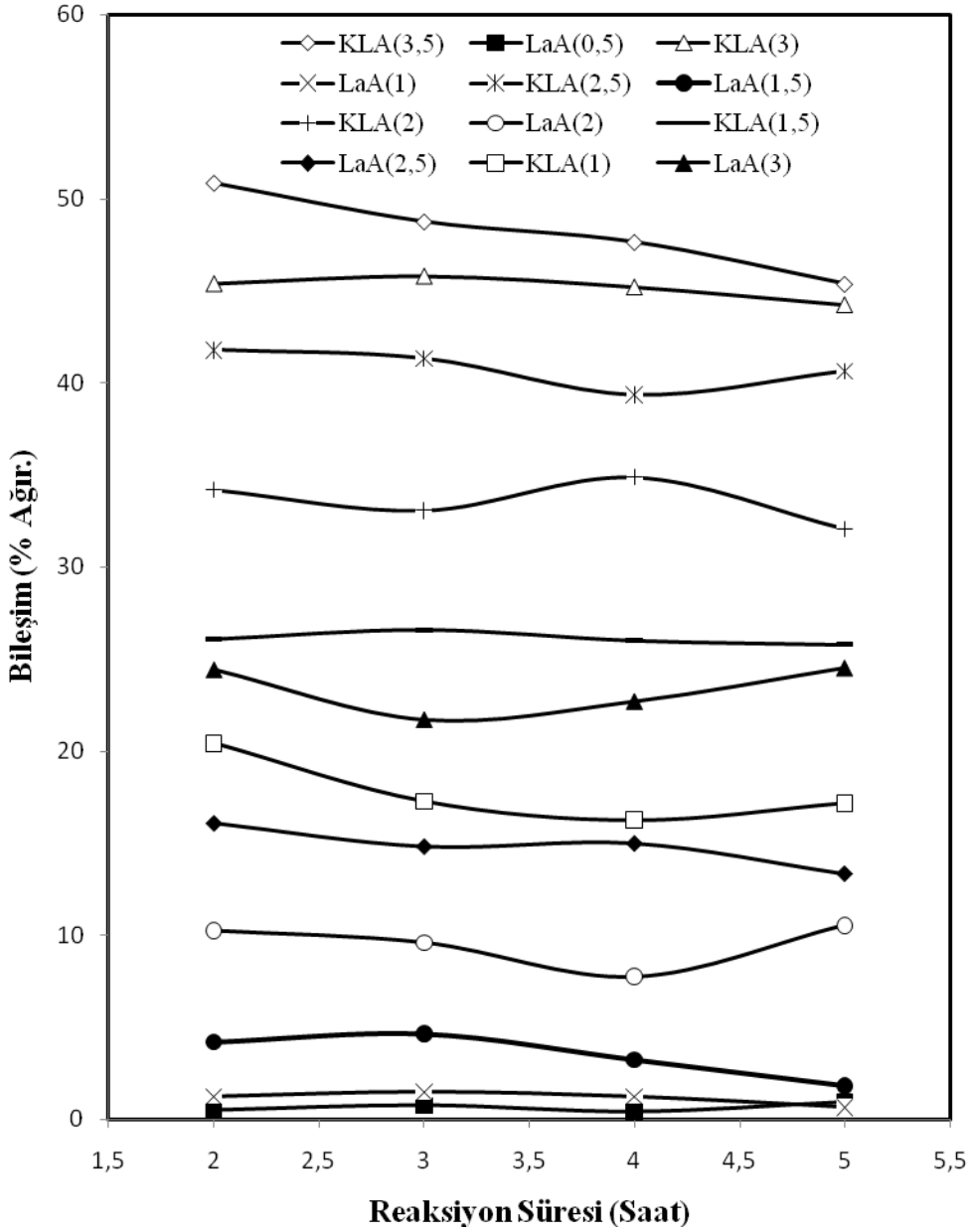
Çizelge 4.7'de, 1:4 TP:(KLA+LaA) mol oranında, %10 enzim miktarı ile 2, 3, 4 ve 5 saatlerde yürütülen asidoliz reaksiyonlarının sonuçları görülmektedir. KLA'nın 3,5 mol olduğu durumda reaksiyon süresi 2 saatten 5 saate ulaştığında KLA katılımı %50,9'dan, %45,4'e düşmüştür. KLA miktarının 3-1 mol arasında değişmesi

durumda ise sürenin KLA katılımına herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Sonuçlardan görüldüğü gibi LaA katılımında da reaksiyon süresinin önemli bir etkisi görülmemektedir. Deneyler esnasında tekrarlı sonuçların 2 saatten sonra alınabilmesi reaksiyonun 2 saatte dengeye ulaştığını göstermiştir.

Çizelge 4.8'de, 1:5 TP:(KLA+LaA) mol oranında, %10 enzim miktarı ile 2,3 ve 4 saat yürütülen deney sonuçları görülmektedir. 1:5 TP:(KLA+LaA) mol oranında da reaksiyonun 2 saatte dengeye ulaştığı, ortamdaki KLA miktarının azalması ile KLA katılımının düştüğü, LaA katılımının yükseldiği görülmüştür.

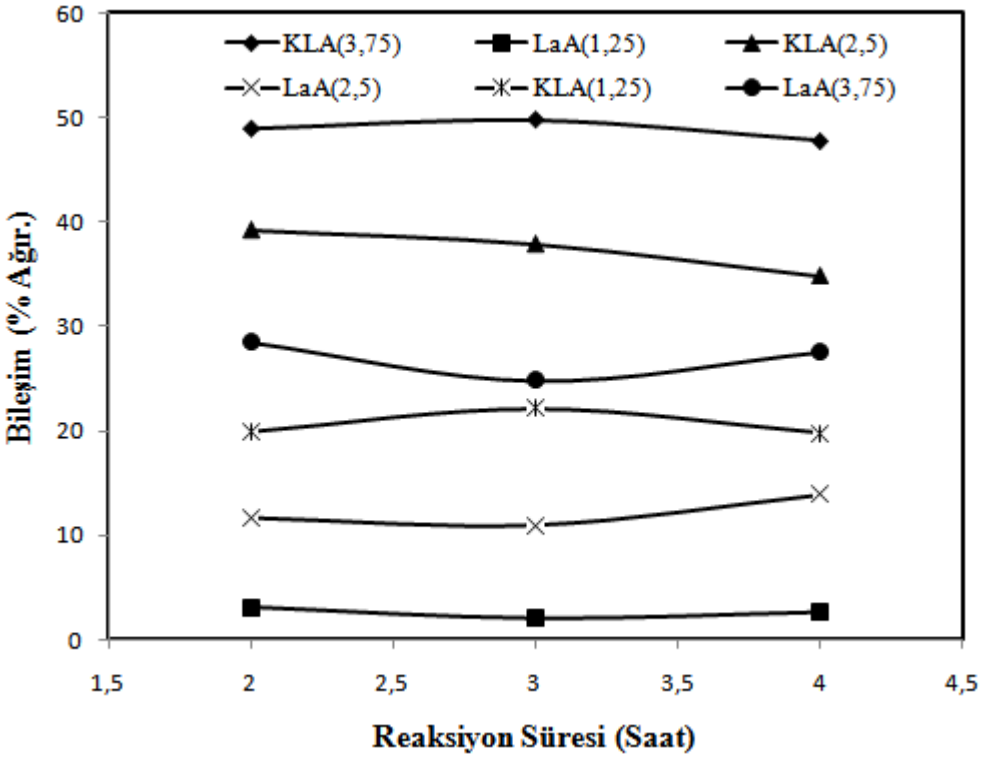


Şekil 4.7: Tripalmitinin KLA ve LaA ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve LaA yüzdesinin zamanla değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) mol oranı 1:3)



Şekil 4.8: Tripalmitinin KLA ve LaA ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve LaA yüzdesinin zamanla değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) mol oranı 1:4)

Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9'da görüldüğü gibi reaksiyon süresinin değişimi ile tripalmitine katılan KLA ve LaA miktarlarında önemli bir değişiklik olmamıştır. Grafiklerde görülen bazı sapmaların deneysel hatalardan kaynaklanmış olabileceği ve incelenen koşullarda bu reaksiyonların 2 saatte dengeye ulaştığı kanaatine varılmıştır. Bu nedenle reaksiyon süresi 2 saat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.9: Tripalmitinin KLA ve LaA ile enzimatik asidolizinde, tripalmitine katılan KLA ve LaA yüzdesinin zamanla değişimi (50°C; Enzim miktarı %10; TP:(KLA+LaA) mol oranı 1:5)

5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yağların insan sağlığı ve beslenme açısından önemi büyüktür. Tüketilen yağın miktarı ve yağ asidi kompozisyonunun kalp ve damar hastalıkları, kanser ve diğer hastalıklarla ilişkisi göz önünde bulundurulduğunda bu önem daha da artmaktadır. Günlük diyette daha az miktarda yağ tüketiminin yanı sıra kullanılan yağın kalitesinin geliştirilmesi ve iyileştirilmesi de önem kazanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda yapılandırılmış yağların insan metabolizmasının üzerinde birçok faydasının olduğu görülmüştür. Bu amaçla son yıllarda yapılandırılmış yağlar üretilerek, tüketiciler için insan sağlığına olumlu etkileri olan, besin içeriği zenginleştirilmiş yeni alternatif yağlar sunulmaktadır.

Konjuge linoleik asit (KLA), linoleik asidin (18:2) geometrik ve pozisyonal izomerlerinin bir karışımıdır. Bu izomerler insan sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkiler gösterir. Özellikle kalp ve damar hastalıkları ile kanser üzerine yapılan çalışmalar KLA'in insan sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkisinin olduğunu göstermektedir. Laurik asit ise vücudun bağışıklık sistemini inşa eden ve koruyan en önemli temel yağ asididir.

Bu çalışmada, tripalmitinden düşük kalorili yağların ve yağ ikame maddelerinin üretiminde kullanılabilecek, sağlığa daha yararlı, vücut metabolizmasını ve bağışıklık sistemini olumlu yönde etkileyen ve hızlı metabolize edilebilen orta zincirli laurik asit ve uzun zincirli doymamış bir yağ asidi olan konjuge linoleik asitçe zenginleştirilmiş triaçilgliserollerin enzimatik üretimi amaçlanmıştır. Bu amaçla tripalmitinin konjuge linoleik asit ve laurik asit karışımı ile 1,3-spesifik *Thermomyces lanuginosa* kaynaklı Lipozyme TL IM ticari lipazı varlığında asidoliz reaksiyonu sistematik olarak incelenmiştir.

Çalışmada tripalmitinin KLA ve laurik asit karışımı ile sabit sıcaklıkta (50°C'de) yürütülen asidoliz reaksiyonlarında, enzim miktarı, tripalmitin:KLA:laurik asit mol oranı ve reaksiyon süresinin asidoliz ürünü olan yapılandırılmış triaçilgliserollerin (TAG) yağ asitleri bileşimine, özellikle KLA ve laurik asit içeriklerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, üç seri asidoliz reaksiyonu yürütülmüştür. Bu reaksiyonlar

sonucunda, reaksiyon parametrelerinin yüksek KLA ve laurik asit içerikli ürünler verebilecek etkin çalışma değerleri belirlenmiştir.

Enzim miktarının substratların toplam ağırlığının %5'i, %10'u, %15'i ve %20'si olacak şekilde yürütülen reaksiyonlarda elde edilen bulgulara göre, optimum enzim miktarının %10 olduğu tespit edilmiştir.

%10 enzim kullanılarak farklı tripalmitin:KLA:LaA (1:3, 1:4, 1:5) ve KLA:LaA mol oranlarında 2 saat yürütülen asidoliz reaksiyonlarının sonuçlarına göre, TP:(KLA+LaA) 1:4 ve 1:5 substrat mol oranlarında, KLA:LaA mol oranının 1:3 olduğu reaksiyonlarda en yüksek ve birbirine en yakın değerlerde KLA (%20) ve LaA (1:4 TP:(KLA+LaA) mol oranında %26,4; 1:5 TP:(KLA+LaA) mol oranında %28,5) katılımlarının gerçekleştiği görülmüştür.

Reaksiyon süresinin tripalmitine katılan KLA ve LaA miktarlarına etkisinin incelendiği TP:(KLA+LaA) 1:3-1:5 mol oranlarında yürütülen reaksiyonlarda, reaksiyon süresi 2-6 saat olarak seçilmiş ve tripalmitine KLA ve LaA katılımlarının hemen hemen dengeye ulaştığı sürenin 2 saat olduğu sonucuna varılmıştır.

Tripalmitinin KLA ve LaA karışımı ile enzimatik asidolizi üzerine literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.Bu nedenle, bu çalışmanın sonuçlarının literatüre bilimsel bir katkısı olacaktır.

Enzim miktarı, substrat mol oranı ve reaksiyon süresiyle birlikte enzim aktivitesi için seçilen çalışma sıcaklığı, orbital çalkalayıcının çalışma hızı ve enzim türü de asidoliz reaksiyonunu etkileyen parametrelerdir. Bu çalışmada enzim miktarı, substrat mol oranı ve reaksiyon süresi dışındaki sabit koşullar tripalmitin, KLA, LaA ve Lipozyme TL IM enzimi kullanılarak, aynı bölümde, daha önce yapılmış olan çalışmaların sonuçlarından hareketle belirlenmiştir. KLA ve LaA karışımı ile yürütülen asidoliz reaksiyonlarının, farklı enzimlerle, reaksiyon sıcaklığı ve karıştırıcı hızının KLA ve LaA katılımlarına etkilerinin de araştırılacağı yeni deneylerle desteklenmesi, çalışmanın önemini daha da arttıracaktır.

KAYNAKLAR

[1] **Kaçar, A. and Şahan N.,** 2003: Yağ İkame Maddeleri Kullanılarak Üretilen Enerjisi Azaltılmış Dondurmaların Kimyasal Özellikleri, *HR. Ü.Z.F. Dergisi*, **8**, 7-13.

[2] **Mattes, R. D.**, 1998: Position of The American Dietetic Association: Fat replacers. *Journal of the American Dietetic Association*, **98**, 463-468.

[3] **Lucca, P. A. and Tepper, B. J.**, 1994: Fat Replacers and The Functionality of Fat in Foods, *Food Sicience & Technology*, **5**, 12-19.

[4] **Kurtzweil, P.** (1996). Taking the fat out of food. Retrieved December 23, 2008, from http://www.fda.gov/fdac/features/696_fat.html

[5] **Dietary fat, <***http://www.annecollins.com/dietary-fat/fat-substitutes-olestra.html*>, alındığı tarih 02.05.2009.

[6] **Use of Polydextrose in Edible Products, Edible Products Containing Polydextrose and Processes for Including Polydextrose in Edible Products** <*http://www.freshpatents.com/Use-of-polydextrose-in-edible-products-edible-products- containing-polydextrose-and-processes-for-including-polydextrose-in-edible-products-dt20041028ptan20040213882.php*>, alındığı tarih 18.04.2009.

[7] **Classification of Fat Substitutes by Nutrient Source, Functional Properties, and Use in Food <***http://www.fac.org.ar/amicor/material/0035.html*>, alındığı tarih 22.02.2009.

[8] **Fat Replacers: Food ingredients for healthy eating** <*http://www.caloriecontrol.org/fatrepl.html*>, alındığı tarih 22.04.2009.

[9] **Küçüköner, E. ve Doğan, İ.S**., 1999: Gıda Sanayinde Kullanılan Bazı Yağ İkamleri ve Özellikleri, *Gıda Dergisi*, **4**, 47-50.

[10] **Sanchez, C., Klopfenstein, C. F. and Walker, C. E.,** 1995: Use of carbohydratebased fat substitutes and emulsifying agents in reduced-fat shortbread cookies, *Cereal Chem*, **72,** 25-29.

[11] **Casimir, C. A.**, 1998: Fat Replacers, *Food Technology*, **52,** 47-53.

[12] **Tamime, A.Y., Barclay, M.N.I., Davies, G. and Barrantes, E.,** 1994: Production of Low Calorie Yogurt Using Skim milk Powder and Fat Substitute, 1.A Review, *Milchwissenschaft*, **49**, 85-88.

[13] **Segal M.,** 1990: Fat substitutes: A taste of the future, *FDA Consumer*, **24,** 25-27.

[14] **Bektaş, İ.,** 2005: Tripalmitinin Kaprik Asit ile Enzimatik Asidolizi: Tepki Yüzey Metodolijisi ile Reaksiyon Koşullarının Optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[15] **Hamam F. and Shahidi F.,** 2007: Incorporation of Selected Long-Chain Fatty Acids into Trilinolein and Trilinolenin, *Food Chemistry*, **106**, 33-39.

[16] **Akoh, C.C.,** 2002: Structured Lipids, in *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, pp. 877-901, Eds. Akoh, C.C., Min, D. B., Marcel Dekker, Inc., New York.

[17] **Başoğlu F.,** 2006: Katı ve Sıvı Yağların Parçalanması, *Yemeklik Yağ Teknolojisi*, pp.43-44, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.

[18] **Şeleci, D.,** 2007: Zeytinyağından Konjuge Linoleik Asit ile Yapılandırılmış Yağ Üretimi ve Optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[19] **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 Researh Internatıonal*, **37**, 967-974.

[20] **Alim, M. A., Lee, J.-H, Akoh, C. C., Choi, M.-S., Shin, J.-A. and Lee, K.-T.,** 2007: Enzymatic transesterification of fractioned rice bran oil with conjugated Linoleic Acid: Optimization by Response Surface Methodology, *Food Science and Technology*, **41,** 764-770.

[21] **Yeşilçubuk, Ş. N. ve Karaali, A.,** 2008: Gamma-linolenik asit ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların üretimi, *İtü Dergisi/d mühendislik*, **4,** 60-71.

[22] **Willis, W.M., and Marangoni, A.G.,** 2002: Enzymatic Interesterification, in *Food Lipids:Chemistry, Nutrition and Biology*, pp.839-875, Eds. Akoh, C.C. ve Min, D.B. Marcel Dekker, Inc., New York.

[23] **Camp, J. V., Huyghebaert, A. and Goeman, P.,** 1998: Enzymatic Synthesis of Structured Modified Fats, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, pp.20-42, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, America.

[24] **Akoh, C.C.,** 1998: Enzymatic Synthesis of Structured Lipids, in *Lipid Synthesis and Manufacture*, pp. 433-460, Ed. Gunstone F.D., M. Dekker, Boca Raton: Sheffield Academic Press.

[25] **Akdere, C.,** 2003: Füzel Yağı Fraksiyonu Enzimatik Alkoliz Reaksiyonunun İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[26] **Tekin, A. ve Kayahan, M.,** 1999: İnteresterifikasyon Tepkimelerinin Yağlardaki Tokoferoller ve Steroller Üzerine Etkisi, *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, **23**, 257-262.

[27] **Gıda AR-GE Bilim Kurulu Toplantı Dökümanı Gıda ve Yem Araştırmaları Yeni Teklif Projeleri,** *<http://209.85.129.132/search?q=cache:owrkZfY3W0UJ:www.tagem.gov.tr/haberler/gida_arge.pdf+interesterifikasyon&cd=4&hl=tr&ct=clnk&gl=tr>*, alındığı tarih 10.03.2009.

[28] **Taşan M. ve Dağlıoğlu O.,** 2005: Trans Yağ Asitlerinin Yapısı, Oluşumu ve Gıdalarla Alınması, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **2,** 79-88.

[29] **Kuo, M. T. and Gardner, H., W.,** 2002: Lipid Biotechnology, Marcel Deccer Press, New York.

[30] **Öztürk M.G. ve Bilen K.,** 2009: Kanola Yağı Metil Esteri ve Karışımlarının Dizel Motoru Performansına Etkisinin Deneysel İncelenmesi, *Int.J.Eng.Research & Development*, **1,** 36-37.

[31] **Fuduka, H., Kando, A. and Noda, H.,** 2001: Biodiesel fuel production by transesterification of oils, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92**, 405-416.

[32] **Piri, E.,** 2003: Ayçiçek Asidik Yağının Enzimatik Esterleşmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[33] **Wills, W. M., Lencki, K., W., and Marangani, A., G.,** 1998: Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils, *Critical Reviews in Food Science an Nutrition*, **38,** 639-674.

[34] **Dunford, N. T.,** 2002: Utilisation of Biotechnology for the Development of Functional and Bioactive Lipid-Based Products, Business Briefing: Innovative Food Ingredients.

[35] **Çapanoğlu, E., Özçelik, B. ve Boyacıoğlu, D.,** 2003: *Süt Endüstrisinde Yeni Eğilimler Sempozyumu*, Bildiri No: S18, İzmir.

[36] **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**, 93-103.

[37] **Silverman, R. E.,** 2003: The Organic Chemistry of Enzyme-Catalysed Reactions, *American Chemical Society*, **7,** 611-612.

[38] **Aklan, A. P.,** 2007: Enantiyomerik Saflıkta 1-Fenil-1-Propanolün Lipaz Katalizörlüğünde Esterleşme Tepkimesi ile Kinetik Rezülasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

[39] **Altınışık, M.,** 2009: Enzimler, ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Ders Notları.

[40] **Metin, K. ve Akpınar, M. A.,** 2000: Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792 Karaciğer Lipaz Enziminin Bazı Kinetik Özellikleri, *Turk J Biol, Tübitak*, **24**, 489-502.

[41] **Takaç, S.,** 2008: Lipaz Üretim İçin İzole Edilmiş Mikroorganizmaların Genetik Yöntem İle Tanımlanması ve Üretilen Enzimlerin Saflaştırılması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara.

[42] **Hey, C. E., and Xu, X.,** 2001: Structured Triacylglycerols, in *Structured and Modified Lipids,* pp.209-234, Ed. Gustano F. D., Marcel Dekker Inc., New York.

[43] **Akoh, C. C., Lee, K. T. and Fomusu, L. B.,** 1998: Synthesis of Positional Isomers of Structured Lipids with Lipases as Biocatalysts, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, pp.46-65, Ed. Christophe, A. B., AOCS Press, America.

[44] **Carrin, M. E. and Crapiste, G. H.,** 2007: Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic–stearic acid mixture, *Journal of Food Engineering*, **84**, 243-249.

[45] **Guncheva, M., Zhiryakova, D., Radchenkova, N. and Kambourova, M.,** 2008: Acidolysis of Tripalmitin with Oleic acid catalyzed by a newly isolated thermostable lipase, *Jornal of the American Oil Chemists' Society*, **85**, 129-132.

[46] **Sahin, N., Akoh, C. C. and Karaali, A.,** 2005: Lipase-catalyzed acidolysis of tripalmitin with hazelnut oil fatty acids and stearic acid to produce human milk fat substitutes, *Jornal of Agricultural&Food Chemistry*, **53**, 5779-5783.

[47] **Villeneuve,P., Barouh, N., Barea, B., Piombo,G., Figueroa-Espinoza, M.C., Turon,F., Pina, M. and Lago, R.,** 2007: Chemoenzymatic Synthesis of Structured Triacylglycerols with Conjugated Linoleic Acids (CLA) in Central Position, *Food Chemistry*, **100**, 1443-1452.

[48] **Goli, S. A. H., Sahri, M. M. and Kadivar, M.,** 2008: Enzymatic Interesterification of Structured Lipids Containing Conjugated Linoleic acid with Palm Stearin for Possible Margarine Production, *Europian Journal of Lipid Science&Technology*, **110**, 1102-1108.

[49] **Goli, S. A. H., Kadivar, M., Keramat, J. and Fazilati, M.**, 2008: Conjugated linoleic acid (CLA) production and lipase-catalyzed interesterification of purified CLA with canola oil, *Europian Journal of Lipid Science&Technology*, **110**, 400-404.

[50] **Martinez, C. E., Vinay, J. C., Brieva, R., Hill, C. G. and Garcia, H. S.,** 2005: Preparation of mono-and diacylglycerols by Enzymatic Esteterification of Glycerol with Conjugated Linoleic Acid in Hexane, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **125**, 63-75.

[51] **Habulin, M., Sabeder, S., Paljevac, M., Primozic, M. and Knez, Z.,** 2008: Lipase-Catalyzed Esterification of Citronellol with Lauric Acid in Supercritical Carbon Dioxide/co-solvent Media, *Journal of Supercritical Fluids*, **43**, 199-203.

[52] **Senanayake, S. P. J.N., Shahidi, F.**, 2007: Acidolysis of seal blubber oil with lauric acid, *Journal of Food Lipids*, **14**, 78-96.

[53] **Kowalski, B., Tarnowska, K., Gruczynska, E.,** 2004: Enzymatic acidolysis of beef tallow with lauric acid, *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **81**, 284-289.

[54] **Sellappan, S., Akoh, C. C.,** 2000: Enzymatic acidolysis of tristearin with lauric and oleic acids to produce coating lipids, *Journal of the American Oil Chemists' Society* , **77**, 1127-1133.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Hacer Çağlar

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 16.02.1982

Adres: Komik Hasan Ef. Sk. Bahçelievler Mah. No:38/10 Bahçelievler/İSTANBUL

Lisans Üniversite: Yıldız Teknik Üniversitesi (2000-2005)