İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOKLU DOYMAMIŞ YAĞ ASİTLERİ ELDESİ: TEPKİ YÜZEY METODOLOJİSİ İLE OPTİMİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Leyla KENT

Anabilim Dalı : Kimya Mühendisliği

Programı : Kimya Mühendisliği

OCAK 2009

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOKLU DOYMAMIŞ YAĞ ASİTLERİ ELDESİ: TEPKİ YÜZEY METODOLOJİSİ İLE OPTİMİZASYONU

DOKTORA TEZİ
Leyla KENT
(506862008)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06 Ağustos 2008
Tezin Savunulduğu Tarih : 15 Ocak 2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. H. Ayşe AKSOY (İTÜ)
Prof. Dr. Artemis KARAALİ (YÜ)
Prof. Dr. Ülker BEKER (YTÜ)
Prof. Dr. Bülent GÜRLER (İÜ)

OCAK 2009

ÖNSÖZ

Bu çalışmada beni yönlendiren, yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sn. Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN'e teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca değerli katkı ve bilgileri ile tezimin şekillenmesinde emekleri olan hocalarım Prof. Dr. H. Ayşe AKSOY ve Prof. Dr. Melek TÜTER'e, laboratuar çalışmalarımda yardımlarını gördüğüm Yard. Doç. Dr. Sevil YÜCEL, Demet ŞELECİ, Tarık ÖZTÜRK, Hülya ELMALI, Nazife KALENDER, Çağlar KULU ve Ayhan GÖKSU'ya en derin teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmam sırasında hep yanımda olan her zaman bana maddi ve manevi desteğini esirgemeyen annem, babam ve kardeşime, ayrıca çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Ağustos 2008 Kimya Yük. Müh. Leyla KENT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMALAR	**ix**
ÇIZELGE LİSTESİ	**xi**
ŞEKİL LİSTESİ	**xvii**
SEMBOL LİSTESİ	**xix**
ÖZET	**xxi**
SUMMARY	**xxv**
1. GİRİŞ	**1**
1.1. Giriş ve Çalışmanın Amacı	**1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ	**3**
2.1. Çoklu Doymamış Yağ Asitleri, Metabolizmaları ve Biyolojik Fonksiyonları Hakkında Genel Bilgi	**3**
2.2. EPA ve DHA'nın Besin Değeri ve Sağlık Açısından Önemi	**6**
2.2.1. EPA ve DHA'nın kalp ve damar hastalıklara olan olumlu etkisi	6
2.2.2. EPA ve DHA'nın beyin, sinir sistemi ve göz sağlığına olan olumlu etkisi	7
2.2.3. EPA ve DHA'nın deri ve inflamatuar hastalıklarına olan sağlık etkisi	9
2.2.4. EPA ve DHA'nın diyabet hastalığına olan sağlık etkisi	10
2.2.5. EPA ve DHA'nın kanser hastalığına olan sağlık etkisi	10
2.2.6. EPA ve DHA'nın astım hastalığına olan sağlık etkisi	11
2.2.7. EPA ve DHA'nın diğer bazı hastalıklara olan sağlık etkisi	11
2.3. GLA'nın Besin Değeri ve Sağlık Açısından Önemi	**11**
2.4. ALA'nın Besin Değeri ve Sağlık Açısından Önemi	**12**
2.5. EPA, DHA, GLA ve ALA Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Kaynakları	**13**
2.5.1. EPA ve DHA kaynağı olarak balık ve balık yağları hakkında genel bilgi	13
2.5.2. Gamma-Linolenik Asit (GLA) Kaynakları	18
2.5.3. Alfa-linolenik asit (ALA) kaynakları	20
2.6. Çoklu Doymamış Yağ asitlerinin zenginleştirilmesi için uygulanan yöntemler	**23**
2.6.1. Kromatografik yöntemler	24
2.6.2. Distilasyon yöntemi	24
2.6.3. Düşük sıcaklık fraksiyonlu kristalizasyon yöntemi	24
2.6.4. Süperkritik CO_2 ekstrksiyon yöntemi	24
2.6.5. Enzimatik yöntemler ile zenginleştirme yöntemleri	25
2.6.6. Üre fraksiyonlama yöntemi	26

2.7. Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin Zenginleştirilmesi Üzerine Literatürde Yapılan Çalışmalar..... 27

2.7.1. Balık yağlarından Omega-3 Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin İzolasyonu ve Konsantre Edilmesi Üzerine Yapılan Çalışmalar..... 27
2.7.2. GLA içeren yağlardan GLA'in zenginleştirilmesi üzerinde yapılan çalışmalar 31
2.7.3. ALA içeren yağlardan ALA'in zenginleştirilmesi üzerinde yapılan çalışmalar 33

2.8. Tepki Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology) 34

2.8.1. Merkezi bileşik deney tasarımları 35
2.8.2. Varyans analizi (ANOVA) 37
2.8.3. Regresyon analizi 38
2.8.4. Kalanların toplamı..... 38
2.8.5. Korelasyon katsayısı 38

3.DENEYSEL ÇALIŞMALAR..... 41

3.1 Kullanılan Hammaddeler 41

3.2 Çalışma Yöntemi..... 41

3.2.1 Kullanılan hammaddelerin karakterizasyonu 41
3.2.2 Alabalık, çuha çiçeği ve keten yağlarından serbest yağ asitlerinin eldesi 41
3.2.3 Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık, çuha çiçeği ve keten yağı yağ asitlerinden çoklu doymamış yağ asitlerince zengin ürünlerin eldesi 43
3.2.4 Deneysel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi 44
3.2.5 Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu..... 45

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 47

4.1 Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri.....48

4.2 Alabalık Yağı Yağ Asitlerinden Çoklu Doymamış Yağ Asitlerince Zengin Ürünler Eldesinin Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Optimizasyonu.....49

4.2.1 Alabalık yağ asitlerinin fraksiyonlanması tepki yüzey metodolojisi'nde kullanılacak değişken seviye değerlerinin belirlenmesi.....49
4.2.2 Alabalık yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'ne göre uygulanan deneysel tasarım ve reaksiyon parametrelerinin optimizasyonu..... 61
4.2.3 Farklı reaksiyon koşullarının alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'ince zengin ürün eldesi üzerindeki etkilerinin istatiksel açıdan değerlendirilmesi 68
4.2.4 Alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'ince zengin ürün eldesi için oluşturulan Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması.....72

4.3 Çuha Çiçeği Yağı Yağ Asitlerinden GLA'ca Zengin Ürünler Eldesinin Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Optimizasyonu Yüzey Metodolojisine Göre Optimizasyonu 76

4.3.1 Çuha çiçeği yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'nde kullanılacak değişken seviye değerlerinin belirlenmesi 76

4.3.2 Çuha çiçeği yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'ne göre uygulanan deneysel tasarım ve reaksiyon parametrelerinin optimizasyonu 84

4.3.3 Farklı reaksiyon koşullarının çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesi üzerindeki etkilerinin istatiksel açıdan değerlendirilmesi 89

4.3.4 Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesi için oluşturulan Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması..... 94

4.4 Keten Yağı Yağ Asitlerinden ALA'ca Zengin Ürünler Eldesinin Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Optimizasyonu.....99

4.4.1 Keten yağı yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'nde kullanılacak değişken seviye değerlerinin belirlenmesi.....99

4.4.2 Keten yağı yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'ne göre uygulanan deneysel tasarım ve reaksiyon parametrelerinin optimizasyonu.....106

4.4.3 Farklı reaksiyon koşullarının keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesi üzerindeki etkilerinin istatiksel açıdan değerlendirilmesi.....110

4.4.4 Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesi için oluşturulan Tepki Yüzey ve izdüşüm grafiklerinin yorumlanması.....114

5. SONUÇLARIN GENEL DEĞERLENDİRİLMESİ VE ÖNERİLER..... 117

KAYNAKLAR 121

ÖZGEÇMİŞ 133

KISALTMALAR

ÇDYA : Çoklu Doymamış Yağ Asiti
TDYA : Tekli Doymamış Yağ Asiti
EPA : Eikosapentaenoik Asit
DHA : Dokosaheksaenoik Asit
LA : Linoleik Asit
ALA : Alfa Linoleik Asit
GLA : Gama linoleik Asit
AA : Araşidonik Asit
UCF : Üre Kompleks Fraksiyonu
NUCF : Üre Olmayan Kompleks Fraksiyon

ÇİZELGE LİSTESİ

		Sayfa
Çizelge 2.1:	Dünya balık yağı üretiminin ülkelere göre dağılımı (1000 ton)…..	14
Çizelge 2.2:	Bazı balık yağı türlerinin yağ asidi bileşimleri……	16
Çizelge 2.3:	Çuha çiçeği yağının yağ asitleri bileşimi……..	18
Çizelge 2.4:	Hodan yağı yağ asitlerinin bileşimi	19
Çizelge 2.5:	Frenk üzümü yağı yağ asitlerinin bileşimi	20
Çizelge 2.6:	Perilla, ketencik ve şia yağları yağ asitleri bileşimleri	22
Çizelge 2.7:	Yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarımı	37
Çizelge 3.1:	Gaz kromatografik analiz koşulları…… .	41
Çizelge 4.1:	Alabalık yağı yağ asitleri bileşimi……	47
Çizelge 4.2:	Çuha çiçeği ve keten yağlarının yağ asitleri bileşimleri……...	48
Çizelge 4.3:	Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ./ağ.) oranı, 1:3; süre 8 saat)	50
Çizelge 4.4:	Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3; süre 8 saat)..	51
Çizelge 4.5:	Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, EPA, DHA ve ÇDYA içerikleri ile kazanımlarının üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3; süre 8 saat)……	52
Çizelge 4.6:	Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol oranı, 1:7; süre 8 saat)……..	55
Çizelge 4.7:	Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol oranı, 1:7; süre 8 saat)……..	56
Çizelge 4.8:	Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, EPA, DHA ve ÇDYA içerikleri ile kazanımlarının yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol oranı, 1:7; süre 8 saat)…….	57
Çizelge 4.9:	Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3; üre:etanol oranı, 1:7)…….	59
Çizelge 4.10:	Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3; üre:etanol oranı, 1:7)…….	60

Çizelge 4.11: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, EPA, DHA ve ÇDYA içerikleri ile kazanımlarının zaman ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3, üre:etanol oranı, 1:7)……. 61

Çizelge 4.12: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden ÇDY A'nin eldesinde, yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviyeler…. 62

Çizelge 4.13: Yüzey merkezli küp deney tasarımında belirlenen deney tasarım noktaları…… 62

Çizelge 4.14: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:YA oranı, 2:1) (Deney No: 1-4 sonuçları)…….. 63

Çizelge 4.15: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:YA oranı, 4:1) (Deney No: 5-8 sonuçları)…….. 64

Çizelge 4.16: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Zaman, 8 saat) (Deney No: 9-12 sonuçları)……. 65

Çizelge 4.17: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:YA oranı, 3:1; Etanol:Üre oranı, 7:1) (Deney No: 13-17 sonuçları)….. 66

Çizelge 4.18: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda ekstratlardan elde edilen tepki değerleri……... 67

Çizelge 4.19: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda rafinatlardan elde edilen tepki değerleri…… 68

Çizelge 4.20: Alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'ce zengin ürün eldesinde, bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları……. 69

Çizelge 4.21: Varyans analizi (ANOVA) sonuçları……... 70

Çizelge 4.22: Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri……... 71

Çizelge 4.23: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ./h) oranı, 1:5; süre 8 saat)…….. 78

Çizelge 4.24: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ./h) oranı, 1:5; süre 8 saat)…….. 78

Çizelge 4.25: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, GLA içerikleri ile kazanımlarının yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:5; süre 8 saat)……. 79

Çizelge 4.26: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^o C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3,25; süre 8 saat)……. 81

Çizelge 4.27: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^o C;yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı,1:3,25;süre 8 saat) 81

Çizelge 4.28: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, GLA içerikleri ile kazanımlarının üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^o C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3,25; süre 8 saat)……. 82

Çizelge 4.29: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3,25; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:6,5)…….. 84

Çizelge 4.30: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3,25; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:6,5)…….. 84

Çizelge 4.31: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, GLA içerikleri ile kazanımlarının zaman ile değişimi (T= 4^o C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3,35, üre:etanol oranı, 1:6,5)……. 85

Çizelge 4.32: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'nin eldesinde, yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviye değerleri…… 86

Çizelge 4.33: Yüzey merkezli küp deney tasarımında belirlenen deney tasarım noktaları…… 86

Çizelge 4.34: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:yağ asitleri oranı, 2,5:1) (Deney No: 1-4 sonuçları)……... 87

Çizelge 4.35: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:yağ asitleri oranı, 4:1) (Deney No: 5-8 sonuçları)…….. 87

Çizelge 4.36: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Zaman, 16 saat) (Deney No: 9-12 sonuçları)…… 88

Çizelge 4.37: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:YA oranı, 3,25:1; Etanol:Üre oranı, 6,5:1) (Deney No: 13-17 sonuçları)…….. 88

Çizelge 4.38: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda ekstratlardan elde edilen tepki değerleri…….. 89

Çizelge 4.39: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda rafinatlardan elde edilen tepki değerleri……... 90

Çizelge 4.40: Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesinde, bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları……. 91
Çizelge 4.41: Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesinde varyans analizi (ANOVA) sonuçları…… 92
Çizelge 4.42: Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesinde Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri……... 93
Çizelge 4.43: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ./h) oranı, 1:5; süre 8 saat)…….. 99
Çizelge 4.44: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ./h) oranı, 1:5; süre 8 saat)…….. 100
Çizelge 4.45: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, ALA içerikleri ile kazanımlarının yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:5; süre 8 saat)…….. 100
Çizelge 4.46: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:2,5; süre 8 saat)…….. 102
Çizelge 4.47: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:2,5; süre 8 saat)…….. 103
Çizelge 4.48: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, ALA içerikleri ile kazanımlarının üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:2,5; süre 8 saat)……... 103
Çizelge 4.49: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:2,5; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:7)……. 105
Çizelge 4.50: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1: 2,5; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:7)……. 105
Çizelge 4.51: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, ALA içerikleri ile kazanımlarının zaman ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre oranı, 1:2,5, üre:etanol oranı, 1:7)…… 106
Çizelge 4.52: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden ALA'nin eldesinde, yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviye değerleri…….. 107
Çizelge 4.53: Yüzey merkezli küp deney tasarımında belirlenen deney tasarım noktaları…….. 107

Çizelge 4.54: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:Yağ asitleri oranı:1,5:1; Zaman:2 saat) (Deney No: 1, 2 ve 5 sonuçları) 108
Çizelge 4.55: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:Yağ asitleri oranı:3,5:1; Zaman:2 saat) (Deney No: 3, 4 ve 6 sonuçları) 108
Çizelge 4.56: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:Yağ asitleri oranı:2,5:1; Zaman:2 saat) (Deney No: 7-9 sonuçları)……. 109
Çizelge 4.57: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda ekstratlardan elde edilen tepki değerleri……... 109
Çizelge 4.58: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda rafinatlardan elde edilen tepki değerleri……... 110
Çizelge 4.59: Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesinde, bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları……. 111
Çizelge 4.60: Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesinde varyans analizi (ANOVA) sonuçları…… 112
Çizelge 4.61: Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesinde bağımsız değişkenlerin kritik değerleri…… 113

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa
Şekil 2.1	**:** Esansiyel yağ asitlerinin metabolik reaksiyonları ……	4
Şekil 2.2	**:** Gökkuşağı alabalığı	17
Şekil 2.3	**:** Merkezi bileşik deney tasarımında üç değişkenli bir sistem için deney noktaları örneği	36
Şekil 2.4	**:** Yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarımında üç değişkenli bir sistem için deney noktaları örneği……	36
Şekil 4.1	**:** Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ÇDYA içeriklerinin etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3; süre 8 saat)……	53
Şekil 4.2	**:** Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ÇDYA kazanımlarının etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3; süre 8 saat)……	54
Şekil 4.3	**:** Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ÇDYA içeriklerinin üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; üre:etanol oranı, 1:7; süre 8 saat)……	58
Şekil 4.4	**:** Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ÇDYA kazanımlarının üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; üre:etanol oranı, 1:7; süre 8 saat)……	58
Şekil 4.5	**:** Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki……	72
Şekil 4.6.a	**:** Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Üre:YA oranı ve Etanol:Üre oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği……	73
Şekil 4.6.b	: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Üre:YA oranı ve Etanol:Üre oranı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği……	73
Şekil 4.7.a	: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Etanol:Üre oranı ve zaman ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği ……	74
Şekil 4.7.b	: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Etanol:Üre oranı ve zaman ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği…….	75
Şekil 4.8.a	: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Üre:YA oranı ve zaman ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği……...	76
Şekil 4.8.b	: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Üre:YA oranı ve zaman ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği……..	76
Şekil 4.9	: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların GLA içeriklerinin üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; üre:etanol oranı, 1:5; süre 8 saat)…….....	79
Şekil 4.10	: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların GLA kazanımlarının üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; üre:etanol oranı, 1:5; süre 8 saat)……	80

Şekil 4.11 : Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların GLA içeriklerinin etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3,25; süre 8 saat)…….. 83
Şekil 4.12 : Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların GLA içeriklerinin etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3,25; süre 8 saat)…….. 83
Şekil 4.13 : Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesinde gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki…….. 94
Şekil 4.14.a : Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin Üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği…… 95
Şekil 4.14.b : Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği…… 95
Şekil 4.15.a : Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin etanol:üre oranı ve zaman ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği…….. 96
Şekil 4.15.b : Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin etanol:üre oranı ve zaman ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği…….. 97
Şekil 4.16.a : Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin üre:yağ asitleri oranı ve zaman ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği……... 98
Şekil 4.16.b : Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin üre:yağ asitleri oranı ve zaman ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği……... 98
Şekil 4.17 : Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ALA içeriklerinin üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; üre:etanol oranı, 1:5; süre 8 saat)…… 101
Şekil 4.18 : Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ALA kazanımlarının üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; üre:etanol oranı, 1:5; süre 8 saat)……... 101
Şekil 4.19 : Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ALA içeriklerinin etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:2,5; süre 8 saat)…… 104
Şekil 4.20 : Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ALA içeriklerinin etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:2,5; süre 8 saat)…… 104
Şekil 4.21 : Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesinde gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki……... 114
Şekil 4.22.a : Keten yağı ekstratları ALA içeriğinin Üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği……. 115
Şekil 4.22.b : Keten yağı ekstratları ALA içeriğinin üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği……. 115

SEMBOL LİSTESİ

α	: Karboksil grubuna bitişik 2 nolu karbon atomu
β	: Karboksil grubuna bitişik 3 nolu karbon atomu
ω	: Son metil grubundaki karbon atomu
y	: Deneylerde gözlenen çıktı değerleri
$\hat{y}$	: Deneysel tasarımdan elde edilen çıktı değerleri
$\sum \varepsilon$	: Kalanların toplamı
R	: Korelasyon katsayısı
Y	: Tepki
β_0	: Ortalama tepki
$\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{iii}$	: Regresyon katsayıları
X_i, X_j	: Bağımsız değişkenler

ÇOKLU DOYMAMIŞ YAĞ ASİTLERİ ELDESİ: TEPKİ YÜZEY METODOLOJİSİ İLE OPTİMİZASYONU

ÖZET

ω-3 ve ω-6 çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA), özellikle eikosapentaenoik asit (EPA), dokosahekzaenoik asit (DHA), alfa-linolenik asit (ALA) ve gamma-linolenik asit (GLA) insan sağlığı açısından önemlerinden dolayı artan bir ilgi görmektedirler.

Linoleik asit (LA) ve ALA sırasiyle ω-3 ve ω-6 familyasına ait esansiyel yağ asitleridir. Tohum yağlarının çoğu LA içerirken balık yağı, kanola yağı, keten tohumu yağı va yeşil yapraklı bitkiler ALA, EPA ve DHA ω-3 yağ asitlerinin major kaynaklarıdır. LA ve ALA öncü yağ asitleri olup zincir uzatma reaksiyonları ile eikosanoid öncü asiti olan araşidonik asit (AA), EPA ve DHA çoklu doymamış yağ asitlerine dönüştürülürler. EPA prostaglandinlerin, tromboksanların ve lökotrienlerin öncüsü olup bu maddeler etkin anti agregasyon bileşikleridir. DHA beyin ve retina hücrelerinin membran fosfolipidlerinin ana komponentidir. Klinik çalışmalar DHA'nın çocuklarda büyüme ve beyin gelişiminin ve yetişkin insanlarda normal beyin fonksiyonlarının idamesi için esansiyel olduğunu göstermektedir.

Günümüzde EPA ve DHA desteğinin koroner kalp hastalıkları risk faktörlerinin (yüksek tansiyon, yüksek lipid, damar sertliği ve glukoz toleransının) azalmasında, eikosanoid (hücresel bağışıklık sisteminin ve deri sağlığında etkili) sentezinin düzenlenmesinde ve tümör oluşum aktivitesinin durdurulmasında pozitif sağlık etkileri gösterdiği ortaya çıkarılmıştır.

Son yıllarda birçok çalışmanın bazı hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için GLA üretimine yönlendirilmiş olduğu görülmektedir. GLA LA'in AA'e normal biyodönüşümünde yer alan ara kimyasal maddedir. Biyodönüşüm bir seri alternatif desaturasyon ve zincir uzatma basamakları içerir. LA'nın desaturasyonu karaciğer Δ6 desaturaz enzimi ile katalizlenir. Δ6 desaturaz enzimi yaşlılık, diabet, yüksek seviyede alkol kullanımı veya yüksek kolesterol etkisiyle, bazı kanserli ve virütik enfekte olmuş hücrelerde etkinliğini kaybedebilir. Bu durumlarda vücutta kolaylıkla sentezlenemeyen GLA gıda ile temin edilmelidir. GLA ayrıca romatizma yangısı, diabetik nöropati, yüksek tansiyon, adet ağrıları, astım, ekzama, multipl skleroz, migren ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır. GLA'nın ticari kaynakları hodan, çuha çiçeği ve frenk üzümü tohum yağlarıdır.

Bazı çalışmalarda ÇDYA konsantrelerinin, vücuda alınan günlük toplam lipid miktarını mümkün olduğu kadar düşük tutmaya imkan sağladığı için, yağlara göre daha iyi kaynak olduğu vurgulanmaktadır.

ÇDYA konsantreleri, fraksiyonlu kristalizasyon, üre fraksiyonlama (kompleksleme), moleküler distilasyon, süper kritik akışkan ekstraksiyonu, gümüş iyonları ile kompleksleme ve enzimatik hidroliz ve esterleşme yöntemleri ile üretilebilmektedir. ÇDYA konsantrelerinin serbest yağ asitleri formunda eldesinde en basit ve en verimli teknik üre fraksiyonlamasıdır. Bu yöntemde, önce yağ triaçilgliserolleri

alkollü KOH kullanılarak alkali hidroliz ile yağ asitlerine parçalanır ve daha sonra kompleks oluşumu için ürenin etanollü çözeltisi ile karıştırılır. Doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri üre ile kolaylıkla katılım ürünleri oluşturur ve oluşan bu ürün soğutulduğunda kristaller halinde çöker ve filtre edilerek ortamdan uzaklaştırılır. Sıvı ortamda kalan üre ile kompleks yapmayan yağ asitleri fraksiyonu (ekstrakt) böylece ÇDYA'ce zenginleşmiş olur.

Üre fraksiyonlamasının bir avantajı oluşan kristallerin son derece stabil olmasıdır. Bu kristallerin filtrasyonunun yağ asitlerinin fraksiyonlu kristalizasyonunda olduğu gibi çok düşük sıcaklıklarda yapılmasına ihtiyaç yoktur. Bu yöntemin keza birçok araştırı tarafından tercih edilmesinin diğer bir nedeni üre-yağ asitleri kompleks oluşumunun yağ asitlerinin ergime noktası, çözünürlük gibi fiziksel özelliklere yerine tamamiyle çift bağların yeri ve sayısına göre şekillenen konfigurasyonuna bağımlı olmasıdır.

Bu çalışmada, alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), çuha çiçeği (*Oenothera bienis* L.) ve keten (*Linum usitatissimum* L.) yağlarından üre fraksiyonlama yöntemine göre sırasıyla ÇDYA (EPA, DHA, 18:3ω-3, 20:4ω-3 ve 22:5ω-3), GLA ve ALA konsantratları üretilmiştir. Üre fraksiyonlama deneyleri 4 °C da iki veya üç değişkenli ve üç seviye değerli yüzey merkezli küp tasarım noktalarında yapılmıştır. Üç bağımsız değişkenin [üre:yağ asitleri oranı (ağ/ağ), etanol:üre oranı (hac/ağ) ve kristalizasyon zamanının (saat)] elde edilen ürünlerin ÇDYA veya GLA içeriğine, iki bağımsız değişkenin [üre:yağ asitleri oranı (ağ/ağ) ve etanol:üre oranının (hac/ağ)] elde edilen ürünlerin ALA içeriğine olan etkileri incelenmiş ve reaksiyon koşulları Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM)'ne göre optimize edilmiştir.

Serbest yağ asitleri (4 g) ürenin % 95'lik etanoldeki çözeltisi ile karıştırılmış ve 60 ºC da berrak homojen çözelti elde edilene kadar ısıtılmıştır. Üre:yağ asitleri oranı ortama değişik miktarlarda üre katılması ile etanol:üre oranı ise ortama değişik miktarlarda etanol ilavesi ile değiştirilmiştir. Elde edilen homojen çözelti daha sonrta oda sıcaklığına soğutulmuş ve müteakiben bir buzdolabında +4 ºC kristalizasyon süresi tamamlanana kadar bekletilmiştir. Oluşan kristaller (üre-yağ asitleri katılım ürünü, üre ile kompleks oluşturan fraksiyon) sıvı ortamdan (üre ile kompleks oluşturmayan fraksiyon) hızlı filtrasyon uygulanarak ayrılmıştır. Sıvı fraksiyona hacmi kadar su ilave edilmiş ve 6N HCl ile pH 2-3 olana kadar asitlendirilmiştir. Çözeltiye hacmi kadar hekzan ve 10 mL doymuş tuz çözeltisi ilave edildikten sonra karışım 1 saat karıştırılmış ve bu karışım ayırma hunisine aktarılmıştır. Serbest hale geçen yağ asitlerini içeren hekzan fazı üreli sulu fazdan ayrılmıştır. Hekzan fazı üre kalmayana kadar su ile yıkanmış, anhidrik sodyum sulfat ile kurutulmuş ve döner buharlaştıcıda 65 ºC da hekzanı uçurulmuştur. Elde edilen yağ asitleri tartılmış ve bu çalışmada elde edilen bu yağ asitleri 'ekstrakt' olarak adlandırılmıştır. Üre ile kompleks oluşturan fraksiyondan yağ asitleri yukarıda açıklanan prosedüre göre elde edilmiş ve 'rafinat' olarak isimlendirilmiştir. Ekstrakt ve rafinat fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimleri gaz kromatografisi ile belirlenmiştir.

Herbir yağ örneği için, TYM uygulanmadan önce, herbir bağımsız değişken için uygun çalışma aralığı (düşük, orta ve yüksek seviye değerleri) diğer değişkenler sabit tutularak o değişkenin değişimi ile belirlenmiştir. İki değişkenli üç seviye değerli yüzey merkezli kübik tasarım noktalarında toplam 11,üç değişkenli üç seviye değerli yüzey merkezli kübik tasarım noktalarında ise toplam 17 deney yürütülmüştür.

Alabalık yağ asitlerinin üre ile fraksiyonlanmasında, her değişkenin çalışma aralığı: üre:yağ asitleri oranı 2-4, etanol:üre oranı 5-9 ve zaman 1-15 saat olarak seçilmiştir. Optimum koşullar olarak üre:yağ asitleri oranı 3,5, etanol:üre oranı 5,6 ve zaman 4,8

saat olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda yürütülen deneylerle içerisinde % 88,1 ÇDYA bulunan ürün elde edilebilecektir.

Çuha çiçeği yağ asitlerinin üre ile fraksiyonlanmasında, her değişkenin çalışma aralığı: üre:yağ asitleri oranı 2,5-4, etanol:üre oranı 5-8 ve zaman 8-24 saat olarak seçilmiştir. Optimum koşullar olarak üre:yağ asitleri oranı 3,8, etanol:üre oranı 5,3 ve zaman 10,9 saat olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda yürütülen deneylerle içerisinde % 42,7 GLA bulunan ürün elde edilebilecektir.

Keten yağ asitlerinin üre ile fraksiyonlanmasında, her değişkenin çalışma aralığı: üre:yağ asitleri oranı 1,5-3,5 ve etanol:üre oranı 5-9 olarak seçilmiştir. Optimum koşullar olarak üre:yağ asitleri oranı 3,3 ve etanol:üre oranı 5,5 olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda yürütülen deneylerle içerisinde % 88,2 ALA bulunan ürün elde edilebilecektir.

Alabalık, çuha çiçeği ve keten yağı yağ asitlerinden üre fraksiyonlama yöntemine göre çoklu doymamış yağ asitlerin eldesi için tepki değerlerinin bağımsız değişkenlere baplı olarak değişimini gösteren kuadratik model denklemleri oluşturulmuştur. Varyans analizi ile herbir kuadratik model denklemin regresyon katsayısı (R^2) 0,99 olarak bulunmuştur. Bu da model denklemlerin güvenilir olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile gıda ve farmasötik amaçlar için değeri yüksek destek maddesi olarak kullanılabilecek EPA ve DHA, GLA ve ALA'ca zenginleşmiş ürünler elde edilmiştir.

PRODUCTION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS: OPTIMIZATION BY RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

SUMMARY

The ω-3 and ω-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), alpha-linolenic acid (ALA) and gamma-linolenic acid (GLA) are attracting increasing attention because of their importance to human health.

Linoleic acid (LA) and ALA are the essential fatty acids of ω-3 and ω-6 families, respectively. Most seed oils contain LA while fish oil, canola oil, flaxseed oil, and green leafy vegetables are the major sources of ALA, EPA and DHA ω-3 fatty acids. LA and ALA are precursor fatty acids that are converted by elongation reactions to form PUFA like arachidonic acid (AA) which is an eicosanoid precursor, EPA and DHA. EPA is the precursor of prostaglandins, tromboxanes and leukotrienes, which are effective anti aggregatory substances. DHA is a main component of membrane phospholipids of brain and retina cells. Clinical studies show that DHA is essential for the growth and development of the brain in infants and for maintenance of normal brain functions in adults.

Recently it has been shown that EPA and DHA supplementation has positive health effects including attenuation of coronary heart disease risk factors (hypertension, hyperlipidemia, platelet aggregation, glucose tolerance); modulation of eicosanoid synthesis (cellular immune system, dermal integrity) and tumoricidal activity.

In recent years, it was observed that numerous studies have been directed towards the production of GLA for the prevention and treatment of certain diseases. GLA is an intermediate in the normal bioconversion of LA to AA. The bioconversion includes a series of alternating desaturation and elongation steps. The desaturation of LA is catalyzed by the liver Δ6 desaturase. The Δ6 desaturase may be impaired by aging, diabetes, high levels of alcohol consumption or cholesterol, and in certain cancer and virally infected cells. In these cases GLA must be provided in food because it cannot be easily synthesized within the body. GLA is also used in the treatment of rheumatoid arthritis, diabetic neuropathy, hypertension, premenstrual syndrome, asthma, atopic dermatitis, multiple sclerosis, migraine and cancer. The commercially available sources of GLA are the seed oils of borage, evening primrose and blackcurrant.

Some studies indicated that the PUFA concentrates, devoid of more saturated fatty acid, are much better than oils themselves since they allow the daily intake of total lipid to be kept as low as possible.

The PUFA concentrates can be produced by several methods, including fractional crystallization, urea fractionation (complexation), molecular distillation, supercritical fluid extraction, silver ion complexation and enzymatic hydrolysis and esterification reactions. However, the simplest and most efficient technique for obtaining PUFA

concentrates in the form of free fatty acids is urea fractionation. Initially the triacylglycerol of the oil are split into their constituent fatty acids by alkaline hydrolysis using alcoholic KOH and these fatty acids are then mixed with an ethanol solution of urea for complex formation. The saturated and monounsaturated fatty acids easily complex with urea and crystallize out on cooling and may subsequently be removed by filtration. The liquid or non-urea complexed fraction (extract) is enriched with PUFA.

Urea fractionation has the advantage that complexed crystals are extremely stable, and filration does not necessarily have to carried out at the very low temperatures which solvent crystallization of the fatty acids would require. This method is also favored by many researchers because complexation depends upon the configuration of the fatty acid moities due to the presence of multiple double bonds, rather than pure physical properties such as melting point or solubility.

In this study, urea fractionation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), evening primrose (*Oenothera bienis* L.) and linseed (*Linum usitatissimum* L.) oils was carried out to produce PUFA (EPA, DHA, 18:3ω-3, 20:4ω-3 and 22:5ω-3), GLA, and ALA concentrates, respectively. Urea fractionation experiments were carried out at 4 °C according to a three or two factor and three level face-centered cube design points. The effects of three independent variables such as urea-to-fatty acid ratio (w/w), ethanol-to-urea ratio (v/w) and crystallization time (h) on the PUFA or GLA content of the obtained products and the effects of two independent variables, urea-to-fatty acid ratio (w/w) and ethanol-to-urea ratio (v/w) on the ALA content of the obtained product were investigated and reaction conditions were optimized by Responce Surface Methodology (RSM).

Free fatty acids (4 g) were mixed with urea in 95 % aqueous ethanol and heated at 60°C with stirring until the mixture was turned into a clear homogenous solution. The ratio of urea-to-fatty acids was changed by using different amounts of urea, and the ratio of ethanol-to-urea was changed by using different amounts of ethanol. The homogenous solution was cooled to room temperature, placed in refrigerator kept at 4 °C for different periods for further crystallization. The crystals formed (urea-fatty acid adducts, also referred to as the urea complexing fraction) were separated from the liquid (non-urea complexing fraction) by fast filtration. The liquid was diluted with an equal volume of water and acidified to pH 2-3 with 6 N HCl; an equal volume of hexane and 10 mL of saturated salt solution were subsequently added and the mixture was stirred thoroughly for 1 h, and then transferred to a separatory funnel. The hexane layer containing the liberated fatty acids was separated from the aqueous layer containing urea. The hexane layer was washed with distilled water to remove any containing urea and then dried over anhydrous sodium sulfate and the solvent was removed at 65 °C using a rotary evaporator. The obtained fatty acids were weighted and designated as ‘extract’ throughout this study. Fatty acids from urea complexing fraction designated as ‘raffinate’ were recovered after addition of water/6 N HCl and hexane in a similar manner. The fatty acid composition of the two fractions, extract and raffinate was determined using a gas chromatography.

For each oil sample, before RSM was applied, an appropriate range (lower, middle, and upper points, levels) for each independent variable was determined by varying one independent variable at a time while keeping the others constant. A total of 11 and 17 experiments were carried out according to a two and three factor, three level face-centered cubic design points, respectively.

In the urea fractionation of rainbow trout fatty acids, the range of each variable was selected as follows: urea-to-fatty acids ratio, 2-4; ethanol-to-urea ratio, 5-9; time, 1-15 h. Optimal conditions were determined to be a urea-to-fatty acids ratio of 3.5, ethanol-to-urea ratio of 5.6 and a time of 4.8 h. Experiments conducted under these optimised conditions will be yielded an product containing 88.1 % PUFA.

In the urea fractionation of evening primrose fatty acids, the range of each variable was selected as follows: urea-to-fatty acids ratio, 2.5-4; ethanol-to-urea ratio, 5-8; time, 8-24 h. Optimal conditions were determined to be a urea-to-fatty acids ratio of 3.8, ethanol-to-urea ratio of 5.3 and a time of 10.9 h. Experiments conducted under these optimised conditions will be yielded an product containing 42.7 % GLA.

In the urea fractionation of flaxseed fatty acids, experiments were carried out according to two variable, three level face-centered cube design points. The range of each variable was selected as follows: urea-to-fatty acids ratio, 1.5-3.5 and ethanol-to-urea ratio, 5-9. Optimal conditions were determined to be a urea-to-fatty acids ratio of 3.3 and ethanol-to-urea ratio of 5.5. Experiments conducted under these optimised conditions will be yielded an product containing 88.2 % ALA.

For the preparation of polyunsaturated fatty acids enriched products from rainbow trout, evening primrose and flaxseed fatty acids via urea fractionation method, good quadratic models were obtained for the responce variables. The analysis of variance indicated that the each quadratic model was highly significant and adequate to present the actual relationship between the responce and the significant variables with a satisfactory regression coefficient (R^2) found as 0.99.

In conclusion, the EPA and DHA, GLA and ALA enriched products were obtained by this study which are to be used as valuable supplements for food and pharmaceutical purposes.

1. GİRİŞ

1.1 Giriş ve Çalışmanın Amacı

Günümüzde obezite, kalp ve damar hastalıkları gibi rahatsızlıklar insanların en büyük sorunlarından biridir. Bu hastalıklarda gözlenen hızlı artış, endüstriyelleşme, şehirleşme, teknolojinin hızlı gelişimi ve gıda marketlerinin globalleşmesi sonucu insanların beslenme tarzının değişimine ve iş koşulları gereği fiziksel aktivitelerinde gözlenen azalmaya bağlanmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, son yıllarda insanlar yüksek enerjili, fazla miktarda yağ, tuz, protein ve rafine karbonhidrat içeren, buna karşılık vitamin ve mineral değeri düşük gıda maddelerini daha fazla tüketmektedir. Örgüt bu hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde, öncelikle yağ, protein ve karbonhidratca dengeli gıda tüketilmesini, kompleks karbonhidratlar ve özellikle ω-3 çoklu doymamış yağ oranı yüksek yağlar kullanılmasını ve ayrıca yağlarla alınan ω-6 / ω-3 oranının 1:5-1:10 arasında olmasına dikkat edilmesini önemle tavsiye etmektedir.

Son yıllarda yapılan bilimsel ve klinik çalışmalarla ω-3 ve ω-6 çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA'nin) insan sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkisinin olduğunu ortaya çıkarılmıştır. ω-3 çoklu doymamış yağ asitleri olan alfa-linolenik asit (ALA), eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosahekzaenoik asit (DHA) antiinflamatuar, antitrombotik, antiaritmik, antimitojenik, hipolipemik ve vazodilatatör özellikler gösterirler. Bu özellikleri ile başta koroner kalp hastalıkları olmak üzere, hipertansiyon, tip 2 diyabet, ülseratif kolit, romatoid artrit, depresyon ve kanser gibi birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel etkiye sahiptir. Ayrıca, özellikle DHA'nın, beyin gelişmesini, öğrenmeyi, hafızayı ve görsel fonksiyonları geliştirdiği de saptanmıştır. Diğer taraftan, ω-6 sınıfı çoklu doymamış yağ asiti olan gamma-linolenik asit (GLA) ise egzama gibi çeşitli cilt hastalıklarının, romatizmal eklem iltihabının ve eklem katılaşmasının ve şeker hastalığında gözlenen nöropati şikayetleri ile bazı kanser türlerinin tedavisinde olumlu etkiler göstermektedir.

Sağlık konusundaki bu hızlı gelişmeleri yakından takip eden toplumlarda, kaliteli ve uzun yaşam sürmek isteyen insanlar beslenmelerinde özellikle yağlar açısından dikkatli davranmakta, doğal yoldan ω-3 ve ω-6 yağ asitlerince zengin gıda maddelerini tüketmeğe özen göstermekte ve ayrıca ω-3 ve ω-6 asitlerince zenginleştirilmiş ürünleri de destek olarak kullanmak istemektedir.

Çoklu doymamış yağ asitleri olan ALA, EPA, DHA ve GLA'nın gıda ve farmasötik alanda kullanımına olan son yıllardaki talep artışı, bu asitlerce zengin ürünlerin eldesi üzerindeki çalışmaları da hızlandırmıştır. Literatürde ALA, EPA, DHA ve GLA içeren yağlardan bu asitlerin konsantre edilmesi üzerine yapılmış çalışmalarda, fraksiyonlu kristalizasyon, üre fraksiyonlama, kromatografik ayırım, enzimatik ve süperkritik CO_2 ekstraksiyon yöntemi gibi yöntemlerinin denendiği görülmektedir. Üre fraksiyonlama yöntemi diğerlerine göre basitliği, çabuk sonuç verebilmesi ve uygulama maliyetinin düşüklüğü açısından endüstriyel ölçekte uygulamalar için daha elverişli gözükmektedir.

Literatürde, üre fraksiyonlama yöntemine göre ton balığı, ayı balığı, ringa balığı yağlarından EPA ve DHA'nın ve boraj (*Borago officinales*) yağından GLA zenginleştirilmesinde reaksiyon koşullarının optimizasyonu üzerine yapılmış birkaç çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda, üre:etanol/metanol oranı sabit tutulup özel soğutuculardaki fraksiyonlama işlemleri yapılmıştır. Optimum kristalizasyon sıcaklıklar ise sıfır derecenin altında belirlenmiştir. Bilimsel yayınlarda, alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) yağından ÇDYA'nin (EPA, DHA, ALA, 20:4ω-3 ve 22:5ω-3), çuha çiçeği (*Oenothera bienis*) yağından GLA'nın ve keten (*Linum usitatissimum*) yağından ALA'nın üre ile fraksiyonlanmasında optimizasyon çalışmalarının yapıldığı herhangi bir kayda rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, ülkemizde yüksek üretim potansiyeline sahip alabalık yağından ÇDYA'nin, çuha çiçeği yağından GLA ω-6 asitinin ve keten yağından ALA esansiyel ω-3 asitinin üre fraksiyonlama yöntemi ile zenginleştirilmesi üzerinde çalışılmıştır. Çalışmalarda kristalizasyon sıcaklığı +4 ºC olarak belirlenmiş ve normal bir soğutucuda bu sabit sıcaklıkta çalışmalar sürdürülmüştür. Reaksiyon parametreleri olarak yağ asitleri:üre oranı, üre:etanol oranı ve kristalizasyon zamanının ÇDYA, GLA ve ALA zenginleşme yüzdesi üzerine olan etkileri Tepki Yüzey Metodolojisi esaslarına uygun olarak incelenmiş ve reaksiyon parametreleri optimize edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Çoklu Doymamış Yağ Asitleri, Metabolizmaları ve Biyolojik Fonksiyonları Hakkında Genel Bilgi

Yağlar insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptirler ve sağlık açısından son derece faydalı gıda maddelerinin başında gelmektedirler. Fakat sağlığa olan faydalarının yanında, doğru tüketilmediklerinde obezite, kalp ve damar hastalıkları gibi rahatsızlıklara neden olabilmektedirler. Günümüzde obezite, kalp ve damar hastalıkları gibi rahatsızlıklar insanların en büyük sorunlarından biridir. Bu hastalıklarda gözlenen hızlı artış, endüstriyelleşme, şehirleşme, teknolojinin hızlı gelişimi ve gıda marketlerinin globalleşmesi sonucu insanların beslenme tarzının değişimine ve iş koşulları gereği fiziksel aktivitelerinde gözlenen azalmaya bağlanmaktadır [1,2]. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, son yıllarda insanlar yüksek enerjili, fazla miktarda yağ, tuz, protein ve rafine karbonhidrat içeren, buna karşılık vitamin ve mineral değeri düşük gıda maddelerini daha fazla tüketmektedir. Örgüt bu hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde, öncelikle yağ, protein ve karbonhidratca dengeli gıda tüketilmesini, kompleks karbonhidratlar ve özellikle omega-3 çoklu doymamış yağ oranı yüksek yağlar kullanılmasını ve ayrıca yağlarla alınan omega-6/omega-3 oranının 1:5-1:10 arasında olmasına dikkat edilmesini önemle tavsiye etmektedir.

Bu bölümde ω-3 ve ω-6 çoklu yağ asitlerinin kimyasal yapısı, metabolik reaksiyonları ve biyolojik fonksiyonları hakkında genel bilgi verilecektir.

Kimyasal yapılarında birden fazla cis konfigürasyonunda çift bağ içeren ω-3 ve ω-6 yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) olarak adlandırılır. Yağ asitlerindeki karbon atomları, karboksil grubundan itibaren numaralandırılır. Karboksil grubuna bitişik karbon atomu 2 nolu karbon atomudur ve bu karbon atomu aynı zamanda α -karbon diye de bilinir. Üç nolu karbon atomu β-karbondur. Son metil grubundaki karbon atomu ise ω veya n-karbon atomu olarak bilinir. Bütün ω -3

yağ asitlerinde, ilk çift bağ omega karbon atomundan sonra gelen üçüncü ve dördüncü karbon atomları arasında yeralır. Benzer şekilde bütün ω -6 yağ asitlerinde ilk çift bağ ω karbon atomundan itibaren altıncı ve yedinci karbon atomları arasında bulunur [3].

İnsanlar ve diğer memeli hayvanlarda, karboksil grubundan itibaren en fazla 9. ve10. karbonlar arasında çift bağ oluşturabilecek desaturaz enzimi bulunmaktadır. Bundan dolayı insanlar ve hayvanlarda sadece ω-9 sınıfı tekli doymamış yağ asiti olan oleik asit (18:1n-9) sentezlenebilmektedir. ω-3 ve ω -6 yağ asitleri sentezlenemediğinden mutlaka diyet yoluyla dışarıdan alınması gereklidir. İşte organizmada sentezlenemeyen ve besinler yoluyla birlikte alınması gerekli olan 18 karbonlu linoleik (LA, 18:2, ω-6, cis,cis,9,12-oktadekadienoik asit) ve linolenik (ALA, 18:3, ω-3, cis,cis,cis,9,12,15-oktadekatrienoik asit) asitlere esansiyel yağ asitleri denir [4].

Şekil 2.1 de görüldüğü üzere, ω -6 yağ asitlerinin kaynağı olan LA'nın metabolitleri dihomo-gamma-linoleik asit (DGLA) ve araşidonik (AA) asittir. DGLA 1. grup prostaglandinlerin oluşumunu sağlar. AA ise proinflamatuar medyatörlerin, 2. grup prostaglandinler ve 4. grup lökotrienlerin sentezlenmesini sağlar. ω-6 tipi eikosanoidler (tromboksanlar, prostaglandinler ve lökotrienler) kan damarlarının daralmasına, trombosit çökmesine ve pıhtılaşmasına yardım eder, enflamasyon etki gösterir ve düz kasların kasılmasını temin eder [4,5].

Omega-3 yağ asidi		Omega-6 yağ asidi
α-linolenik asit (ALA)		Linoleik asit (LA)
18:3n-3		18:2n-6
↓	Δ-6-desaturaz	↓
Stearidonik asit		Gamma linolenik asit (GLA)
18:4n-3		18:3n-6
↓		↓
20:4n-3		20:3n-6
↓	Δ-5-desaturaz	↓
Eikosapentaenoik asit (EPA)		Araşidonik asit (AA)
20:5n-3		20:4n-6
↓		↓
22:5n-3		22:4n-6
↓	Δ-4-desaturaz	↓
Dokosaheksaenoik asit (DHA)		22:5n-6
22:6n-3		

Şekil 2.1: Esansiyel yağ asitlerinin metabolik reaksiyonları [4]

ω-3 yağ asitlerinin kaynağı ALA ise insan vücudunda LA nın kullandığı aynı desatüraz ve elongaz enzimleri ile EPA ve DHA gibi metabolitlere dönüşür. EPA'dan oluşan prostaglandinlerin ise anti-trombotik, anti-ritmik ve anti-enflamatuar etkileri vardır. Trombosit agregasyonu ve reaktivitesini azaltır. Plasma viskozitesini azaltır. Pıhtılaşma zamanını arttırır. Membran iyon kanallarını etkiler. Enflamatuar eikosanoidlerin üretimini azaltır. Damarlarda plak oluşumunu önler. Kan basıncını azaltır [6].

Uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitleri vücuttaki bütün dokuların membranlarındaki fosfolipidlerin temel yapısal bileşenidir ve ayrıca membranın akıcılığını ve iyon transferini etkiler. Bu yağ asitlerinden ω-3 ÇDYA özellikle, miyokard, retina, beyin ve spermatozoada bol miktarda bulunurlar ve bu dokuların gelişmesi, doğru ve tam çalışması ve düzenleyicisi oldukları bir çok fizyolojik sürecin işlemesi için elzemdirler. Genel olarak ω-3 yağ asitleri (ALA, EPA ve DHA) bu işlevlerine bağlı olarak, kalp ve damar hastalıkları, romatoid artirit, kanser, astım, alzheimer gibi bir çok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde ayrıca bebeklerde retina ve beyin gelişiminde etkin rol oynamaktadırlar [7,8].

ω-6 ve ω-3 yağ asitleri olmak üzere iki gruba ayrılan çoklu doymamış yağ asitlerinden ω-6'ların ana kaynağı yüksek oranda linoleik asit içeren ayçiçeği, mısır ve soya fasulyesi yağı olup, ω-3 lar ise keten tohumu, ceviz ve özellikle planktonlar ile yağlı balıklarda bol miktarda bulunur. Keten tohumu ve cevizde ALA, balık yağlarında ise EPA ve DHA en önemli yağ asitleridir [4].

Beyin ve retina membranının en önemli bileşiği olan DHA, ALA eksikliğinde yeterli miktarda oluşamaz. Diyetle çok yüksek miktarda linoleik asit alındığı zamanda linoleik asit EPA ve DHA'nın sentezini inhibe eder. Bundan dolayı linoleik asit içeren mısır ve ayçiçek yağınca zengin ve ALA'ca düşük diyetler EPA ve DHA eksikliğine sebep olur. Bu durumlarda EPA ve DHA'nın diyet yoluyla alınması gerekmektedir [9,10].

Diyetleri ile balık ve diğer deniz ürünlerini bol miktarlarda tüketen Japonya, Çin gibi ülkelerde diyetin LA:ALA oranı 1:5 iken Batı toplumlarında bu oranın 100:1 olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalar, sağlıklı yaşam için diyetin LA:ALA oranın 1:5-1:10 olması gerektiğini işaret etmektedir. Amerikan Kalp Cemiyeti (AHA)'nin 2002

yılındaki önerisi doğrultusunda bu oranın korunabilmesi için ALA, EPA ve DHA balık ve diğer deniz ürünlerinin tüketiminin artırılması gerekmektedir [7].

2.2 EPA ve DHA'nın Besin Değeri ve Sağlık Açısından Önemi

Günümüz beslenmesinde büyük önemi olduğu anlaşılan ω-3 çoklu doymamış yağ asitlerinden olan EPA ve DHA insan sağlığı için büyük değer taşımaktadır. EPA ve DHA çok sayıda önemli hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde etkilidir. Aşağıda bu konu ile ilgili detaylı bilgi verilmiştir:

2.2.1 EPA ve DHA'nın kalp ve damar hastalıklara olan olumlu etkisi

Diyetle düzenli balık tüketiminin veya destek gıda maddesi olarak balık yağı ürünleri kullanımının, koroner kalp hastalığı riskini azalttığı ve ani kardiak ölümü önlediği uzun dönemdir bilinen önemli bir gerçektir. Balık ve balık yağının kardiovasküler hastalıklara karşı potansiyel koruyucu etkileri, ilk kez 1940'lı yıllarda İngiliz fizyolog Hugh Sinclair'in Eskimo diyetlerine atıfta bulunarak, bazı yağ asitlerinin yetersizliğinin kardiovasküler hastalıklara neden olabileceği hipotezi ile ifade edilmiştir [11]. Bunu izleyen dönemde yapılan çalışmalar, ilginç bir şekilde, Grönland adasında yaşayan Eskimo'ların diyetle çok yüksek düzeyde (total kalori alımının % 40'ı) yağ tüketmelerine karşın, kardiovasküler hastalıklardan ölüm oranın çok düşük olduğunu göstermiştir [12]. "Eskimo parodoksu" olarak da ifade edilen bu durumun açıklanabilmesi için bir seri epidemiyolojik çalışma planlanmış ve 1970'li yılların sonlarında Danimarkalı araştırmacılar Dyerberg ve Bang, bu toplumlardaki düşük kardiovasküler hastalık insidansını, balık ve balık-yiyen memelilerin (fok, balina, mors gibi) tüketiminin fazla olması ile açıklamışlardır [13]. Eskimo'lar gibi diyetlerinin önemli bir kısmını balık ve diğer deniz ürünlerinin oluşturduğu Japonlar ve Çinliler üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar da, balık tüketimi ile kardiovasküler hastalık riski arasında güçlü negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir [14-16]. Günde en az 30-35 g balık tüketen erkeklerde, kardiovasküler hastalıklara bağlı ölüm oranının hiç balık tüketmeyen erkeklere göre % 40-50 daha az olduğu, kardiovasküler hastalığı olan bireylerin diyetlerine balık ve balık yağı eklendiğinde total ve kardiovasküler mortalitede azalma olduğunu, özellikle ani ölümlerin önemli düzeyde azaltıldığı saptanmıştır [17-20].

Bunların dışında, tüketilen balığın türü ve hazırlanma şeklinin de kardiovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkinliğinde önemli olabileceği vurgulanmaktadır [21]. Danimarkalı araştırmacılar da balık yağlarının kalp atış hızını ayarlıyarak kalbi koruduğunu bulmuşlardır [22].

Kalp ve damar hastalıklarından korunmak veya bu hastalıkların ilerlemesini önlemek için diyette yapılan değişikliklerin temel amacı, kan lipid düzeyinin normal aralıkta tutulmasıdır. Bunun için, diyetin doymuş yağ asitleri içeriğini azaltan ve çoklu doymamış yağ asitleri içeriğini artıran besinler diyete eklenir ki bu da doymuş yağ asidi içeriği zengin olan kırmızı et, domuz eti, tam yağlı süt gibi hayvansal kaynaklı besinlerin diyette azaltılması, onun yerine balık tüketimin artırılması önerisini beraberinde getirmektedir [23]. Çünkü bugün artık çok iyi bilinmektedir ki, balık tüketimi ile serum trigliserit düzeyi azalmakta ve HDL kolesterol düzeyi artmaktadır [12,16, 23-24].

Balık tüketiminin tansiyon düşürücü potansiyelinin kardiovasküler hastalıklara karşı yararlı etkileri arasında küçük bir paya sahip olabileceği düşünülmektedir Ancak belirtilmesi gerekir ki kan basıncının normalize edilmesinde kullanılması öngörülen balık yağı miktarı oldukça yüksektir. Bu düzeyde kullanımlarının kan reolojisi üzerine bazı olumsuz etkileri olabildiği gibi kullanılan bazı ilaçların da etkilerini artırabilmekte veya azaltabilmektedir [16].

2.2.2 EPA ve DHA'nın beyin, sinir sistemi ve göz sağlığına olan olumlu etkisi

Beyin adipoz yağ hücrelerinden sonra lipid konsantrasyonu en yüksek olan organdır. Yetişkin insan beyninin % 50-60'ı lipid olup bunun % 35'ini ise çoklu doymamış yağ asitleri oluşturur. İnsanlarda beyin gelişimi hamileliğin 3. trimesterinde başlar, doğumda en yüksek düzeye ulaşır ve doğumdan sonra 18. aya kadar hızla devam eder. DHA bebeğin beyin gelişiminde ve sinir sisteminin fonksiyonel gelişiminde elzemdir. Yapılan insan çalışmalarında ise ω-3 ÇDYA'nın 9-10 aylık bebeklerde problem çözme yeteneğini artırdığı gösterilmiştir [25].

DHA'nın düşük olması beyin serotinin seviyesinin düşük olmasına sebep olur ki, depresyon, intihar ve şiddete eğilimini artırır [26].

Hiperaktiflik ise duygusal dengesizlik, düzenli çalışma bozukluğu, dikkat süresi kısalığı, konsantrasyon zayıflığı, aşırı hareketlilik ve öğrenme güçlüğü olarak tanımlanır. Okul çağındaki çocukların % 30-40'ında yaygındır. Hiperaktiflik

üzerinde balık yağları, vitamin ve mineraller çok daha etkilidir. Önceden davranış bozukluğu bulunan 6-12 yaş grubundaki çocuklar arasında yapılan araştırmalarda ω-3 yağ asidi seviyesi düşük olan 53 çocuğun yaklaşık % 40'ında hiperaktif düzensizliğe bağlı dikkat eksikliği olduğu tespit edilmiştir [27].

Uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin özellikle DHA'nın görme, motor sinir sistemi gelişimi, bilişsel-duygusal ve davranış gelişimi üzerinde yapısal ve fonksiyonel olarak etkin olduğu bilinmektedir [25,28].

Son yapılan çalışmalarda bebeklerde DHA'nın retinal fonksiyonda önemli rol oynadığı ve görme performansının DHA düzeyi ile ilgili olduğu gösterilmektedir [25,29]. Çalışmalarda DHA yetersizliğinin ışığa karşı retinal yanıtı azalttığı, görme keskinliğinde yetersizlik yarattığı ve bazı çalışmalarda da karanlığa adaptasyon süresinde gecikme yaptığı gösterilmiştir. Diyetle alınan DHA'nın prematüre bebeklerde görme keskinliği gelişimini hızlandırdığı bilinmektedir [28-29].

EPA ve DHA'nın alzheimer hastalığına olan olumlu etkisi

Alzheimer hastalığı beynin iletim sisteminin yapısal olarak bozulması sonucu ortaya çıkan bunama hastalığıdır. Beyin hücreleri arasında amiloid birikiminin hastalığın esas nedeni olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda balık yağı ÇDYA'nin, hayvan modellerinde, alzheimer oluşumuna sebebiyet veren amiloid birikmesini, amyloid taşıyıcı bir protein salınımını artırarak önlediği gösterilmiştir. Bu özel protein amiloidi beyinden kana taşıyarak birikmesini önleyebilmektedir [30-31].

EPA ve DHA'nın antidepresyon etkisi

Depresyon, mutsuzluk ve umutsuzluk hissiyle karakterize olan strese, hormonal değişikliklere, biyokimyasal anormalliklere ve diğer nedenlere bağlı olarak gelişen bir sorundur. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kan EPA ve DHA düzeyi düşük kişilerde depresyon riskinin yüksek olduğu bildirilmektedir [32-34].

Yapılan çalışmalar, diyetle alınan ω-6/ω-3 oranındaki değişimin beyin hücre membranının yağ asidi bileşimi ve fonksiyonlarını da değiştirebildiğini göstermektedir. Bu değişim depresyon gelişiminde önemli faktörler arasında yer almaktadır [35-36]. Araştırmacılar ω-3 ÇDYA'nın depresyona karşı koruyucu etkisi olduğunu belirtmekte ve yüksek balık tüketimi olan ülkelerdeki düşük depresyon insidansına dikkat çekmektedirler [34-36]. Amerikalıların Japonlara göre daha az EPA ve DHA alması Amerika'da depresyon görülme oranının (%2,9-3,7)

Japonya'ya (% 0-0,9) göre daha yüksek olmasının bir nedeni olarak gösterilmektedir [37].

Şimdiye kadar yapılan klinik çalışmalarda balık yağının (EPA ve DHA'nın) depresyon tedavisinde kullanılması önerilmekle beraber, depresyon tedavisindeki bu olumlu etkinin hangi mekanizma ile gerçekleştiği bilinmemektedir [33-35].

EPA ve DHA'nın şizofreni hastalığına olan sağlık etkisi

Şizofreni, kan plazması ve kırmızı kan hücrelerinde yapısal bozukluk sonucu ortaya çıkan zihinsel bir hastalıktır. Kanda bulunan araşidonik asit (AA), EPA ve DHA gibi doymamış yağ asitlerinin düşük olması şizofrenik belirtileri artırabilir. Yapılan araştırmalarda yağ asitleri özellikle EPA'nın normal dozda alınması ile bu belirtilerin ortadan kalktığı gözlenmiştir. Halisünasyon gören ve bundan çok etkilenen insanlara 6 ay boyunca günde 2 g EPA verilmiş ve şizofrenik belirtilerin % 85 oranında azaldığı anlaşılmıştır [30].

2.2.3 EPA ve DHA'nın deri ve inflamatuar hastalıklarına olan sağlık etkisi

Romatoid artirit hastalığına olan sağlık etkisi

Epidemiyolojik, biyokimyasal ve hayvan çalışmalarıyla tamamlanan klinik bulgulara göre balık yağının anti-inflamatuar etkileri vardır. Balığın temel yağ asitleri EPA ve DHA'nın, araşidonik asitten inflamatuar oluşumunu baskıladığı, bu hastalarda kemik ağrılarını azalttığı ve hastalığı geciktirici etkileri olduğu saptanmıştır [38,39].

Deri sağlığına olan etkisi

Deri genel anlamıyla üç temel tabakadan (epidermis, dermis ve deri altı dokusundan) oluşmaktadır. Derinin epidermis tabakası özellikle derinin zararlı bakteri ve ultraviyole (UV) radyasyonu gibi dış etkenlerden korunmasında önemli roller üstlenmektedir Dermis tabakası kollojen ve elastin doku tarafından oluşturulurken deri altı yağ dokusu (hipodermis) yağ hücrelerinin elastin doku tarafından sarılmasıyla oluşmaktadır. Bu tabakaların tümünün sağlıklı olması derinin bütünlüğünü ve sağlığını korumaktadır [40].

Yapılan çalışmalarda, yaşlanmanın UV ışığın deri üzerindeki zararlı etkileri diyetin yağ miktarı ve yağ asidi kompozisyonuna bağlı olarak azaltılabilmektedir. Balık yağının temel yağ asidi bileşenlerinden DHA'nın dermis ve deri altı dokunun kalınlığını olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir [40,41].

Melanoma olmayan deri kanserlerinin dünya üzerinde artış gösterdiği bilinmektedir. Bunun temel nedenleri arasında UV radyasyonun DNA üzerindeki olumsuz etkileri gelmektedir. UV radyasyonu gibi zararlı etkilerin altında bulunan deriden kollojen doku kayıpları gözlenmektedir. DHA desteğinin kollojen kaybını azaltığı ve derideki askorbik asit (C vitamini) sentezini arttırdığı rapor edilmiştir. Artan askorbik asit sentezi derinin zararlı etkilerden korunmasında rol alabilmektedir [42].

Yapılan bir çalışmada günlük 10 g balık yağı tüketiminin sedef hastalığındaki cilt lezyonlarını düzelttiği ancak bu etkinin hangi mekanizma ile gerçekleştirdiği bilinmemektedir [43,44].

2.2.4 EPA ve DHA'nın diyabet hastalığına olan sağlık etkisi

Epidemiyolojik araştırmalar balık tüketiminin fazla olduğu toplumlarda diabetes mellitus (şeker) hastalığının görülme sıklığının daha düşük olduğunu göstermektedir. Yapılan klinik çalışmalarda bu durum balığın içerdiği ω-3 ÇDYA'nın kan basıncı ve plasma trigliserid düzeylerini düşürerek, insulin direncini azaltabilme yeteneği ile açıklanmıştır [45]. Ayrıca, ω-3 ÇDYA'nın trombosit agregasyonunu azaltıcı ve antiaritmik etkilerinin de diabetik bireylerin kardiovasküler hastalık insidansını azaltmaktadır. Sonuç olarak balık ve balık yağı tüketimi fazla olan diabetik bireylerde kardiovasküler hastalık insidansının daha düşük olduğu söylenebilir [46].

2.2.5 EPA ve DHA'nın kanser hastalığına olan sağlık etkisi

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik, ekolojik ve deneysel çalışmalarda, balık tüketiminin kolon, rektum, meme, prostat ve over tümörlerinin ilerlemesini ve riskini azalttığı, kanserli hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği ve koruyucu etkisi olabileceği rapor edilmiştir [47,49].

İsviçre'de yapılan geniş, ulusal bir çalışma sonucu balık tüketimi ile meme kanseri riski arasında ilişki olduğu saptanmıştır. Çalışmada balık tüketim miktarı kadar tüketilen balık türünün de meme kanser riski ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [50].

İtalya'da 1983-1996 yılında 7990 kişide yapılan epidemiyolojik çalışmada balık tüketimi ile gastrointestinal kanser riski arasındaki pozitif ilişki olduğu gösterilmiştir [51]. Balık tüketiminin yüksek olduğu ülkelerde, yüksek olmayan ülkelere göre prostat ve meme kanser oranlarının daha düşük olduğu da belirtilmektedir [47,48].

2.2.6 EPA ve DHA'nın astım hastalığına olan sağlık etkisi

Astımın yaş, cinsiyet, sigara kullanımı ve aile hikayesi gibi değişik risk faktörleri söz konusudur. Astımda bu risk etmenlerinin yanında, beslenme alışkanlıkları da önemlidir. Japonların yüksek miktarda balık tüketiminin olduğu ve bu ülkedeki astım insidansının batı ülkelerine göre daha düşük olduğu saptanmıştır [52].

Balık tüketimi ve astım arasındaki pozitif ilişkinin mekanizması net olarak bilinmemekle beraber, çalışmalarda balık yağının antijenlere karşı bronkokonstruktör yanıtı arttırdığı belirtilmektedir [53,54].

2.2.7 EPA ve DHA'nın diğer bazı hastalıklara olan sağlık etkisi

Balık yağı tüketiminin akut ve kronik böbrek iltihaplarında tedaviye katkısı bulunduğu, proteinüriye karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir. Hastalarda ω-3 yağ asidi desteğiyle böbrek hastalığı ilerlemesinin azaldığı gösterilmekle beraber bu konuda yapılan çalışmaların arttırılması gerektiği düşünülmektedir [55].

Net olmamakla birlikte ince barsakta uzun zincirli yağ asitlerinin gastrik asit sekrasyonunu inhibe ettiği kabul görmektedir. Yapılan bir çalışmada, balık yağının gastrin uyarımını azaltması nedeniyle gastrik asit sekrasyonunu önemli oranda azaltabildiği gösterilmiştir [56].

2.3. GLA'nın Besin Değeri ve Sağlık Açısından Önemi

GLA (18:3 n-6; cis,cis,cis-6,9,12-oktadekatrienoik asit) insanlar ve diğer memeli hayvanlarda, linoleik asitin araşidonik asite dönüşümünde ilk ara üründür. Linoleik asitin (18:2 n-6) Δ6-desaturaz enzimi ile desaturasyonu sonucunda oluşur. GLA dihomo-gamma linoleik aside ve müteakiben araşidonik aside dönüşür. Araşidonik asit daha sonra prostaglandin, tromboksan ve lökotrien sınıfı bağışıklık sağlayan ve iltihaplanmayı önleyici hormon benzeri bileşiklerin sentezinde görev alır. Desaturaz enzimi yüksek kolesterollü ve alkol içeren ortamlarda, kanserli yada virüs bulaşmış hücrelerde bozulmaya uğrayabilir, GLA ve GLA'dan oluşan bu hormonların eksikliği önemli derece de bağışıklık sistemini etkiler ve bu asitin diyet yoluyla organizmaya verilmesi gerekir. GLA bu açıdan gerek gıda, gerek sağlık sektöründe oldukça önemi olan bir ω-6 sınıfı çoklu doymamış yağ asitidir [57,58].

Diyetteki eksikliği atopik ekzema, diyabetik nöropati, romatoid artrit, kardiovaskülar ve bağışıklık sisteminde düzensizliklere sebep olur. GLA nın terapötik değeri kanser, viral enfeksiyonlar, osteoporoz ve alkolizm tedavisindeki rolü ile ispatlanmıştır. Romatoid artrit, kardiovasküler hastalıkları, diabetik nöropati, kansere yol açan kötü huylu tümörler ve egzema, sedef gibi deri hastalıklarının tedavisinde kullanılır [59].

GLA' in insan sağlığına olan direkt etkileri üzerine yapılmış çalışmalarda bu asidin deri ile ilgili çeşitli hastalıkların tedavisinde oldukça etkili olduğu gözlenmiştir. Örneğin, egzama hastalarında Δ6-desaturaz enzimi eksikliğinden ötürü yüksek seviye linoleik asit ve düşük seviye GLA varlığı saptanmış olup bu hastalara GLA diyetinin uygulanması ile kaşıntının ve antihistamin kullanım ihtiyacının azaldığı saptanmıştır. Dahası, GLA içeren yağ ile romatizmal eklem iltihabının ve eklem katılaşmasının ve şeker hastalığınında gözlenen nöropati şikayetinin de tedavisi mümkün olabilmektedir [58].

Yapılan bir grup çalışmalarda, GLA' in kolesterol metabolizmasını düzenlediği, toplam kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein konsantrasyonunu düşürecek ve yüksek yoğunluklu lipoprotein konsantrasyonunu arttıracak şekilde etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca bu çalışmalarda, GLA'nın kan basıncını düşürücü etki gösterdiği bu nedenle de yüksek tansiyon hastalarına GLA'ca zengin diyet uygulanması tavsiye edilmektedir [60,61].

GLA'nin ayrıca bazı kanser türlerinde tümör gelişimini durdurduğu belirlenmiştir. GLA'ca zengin çuha çiçeği yağı ile beslenen fare ve memeli hayvanlarda, özellikle deri ve meme kanseri oluşumuna karşı GLA'nın etkin bir koruma sağladığı sonucuna varılmıştır [62,63]. Bu konuda çalışmalar devam etmekte olup, GLA'ce zenginleştirilmiş ürünlerin gıda ve ilaç sanayiinde kullanımının önümüzdeki günlerde hızla artacağı beklenmektedir.

2.4 ALA'nın Besin Değeri ve Sağlık Açısından Önemi

ALA (18:3ω-3; cis,cis,cis-9,12,15-oktadekatrienoik asit) insanlar tarafından sentezlenemeyen esansiyel yağ asitlerinden biridir. ALA Bölüm 2.1'de detaylı olarak açıklanan metabolik reaksiyonlara göre EPA ve DHA'ya dönüşmektedir. ALA'nın EPA ya dönüşümü, ALA'nın diyetle alınmasından sonra birkaç gün içinde desaturasyon, elongasyon oluşumu ile oldukça hızlıdır. EPA'dan oluşan

eikosanoidlerin etkisi ile ALA koroner kalp hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde potansiyel etkiye sahiptir [64-66]. ALA'nın düşük yağunluklu kolesterol değerini ve tansiyonu düşürdüğü klinik olarak saptanmıştır [67-69]. Keten tohumu ve perilla yağının eklem ağrılarına ve iltihaplarını iyileştirici etki gösterdiği belirlenmiştir [70,71].

2.5 EPA, DHA, GLA ve ALA Çoklu Doymamış Yağ Asitleri Kaynakları

2.5.1 EPA ve DHA kaynağı olarak balık ve balık yağları hakkında genel bilgi

ω-3 yağ asitlerinin en önemlileri olan EPA ve DHA, besin zinciri yoluyla deniz ürünlerinde birikmektedir. Bu yağ asitleri ilk olarak deniz algleri tarafından sentezlenir, sonra da plankton ve diğer küçük deniz hayvanları tarafından tüketilerek onların bünyesine yerleşirler ve böylece besin zincirine katılmış olurlar [70].

Balık ve diğer deniz ürünleri, insanların en eski besin kaynaklarınından biridir. Bitkilerin ekilip yetiştirilmesi ve hayvanların besin olarak kullanımı için evcilleştirilmesinden önceki dönemlerde en kolay elde edilebilen ve bu nedenle de en çok tüketilen besinlerin balık ve diğer deniz ürünleri olduğu bilinmektedir. Bilim ve teknolojinin gelişmesine paralel olarak tarihin ilk dönemlerinde tüketilen bazı canlı türlerinin zaman içinde besin olarak tüketimi tercih edilmemişken, balık ve diğer deniz ürünleri tarihin ilk dönemlerinden günümüze kadar insanların diyetlerinde yer almıştır. Günümüzde dünya sularında 20.000'den fazla yenilebilen balık, kabuklu deniz hayvanı ve memeli deniz türü yaşamaktadır. Bunların yaklaşık 250 türü insanların diyetlerinde çeşitli şekillerde yer almaktadır [7].

Ticari olarak önemli balık yağları balina, morina, ringa, hamsi, sardalye ve menhaden türü balıklardan elde edilmektedir. 2005 yılı dünya balık üretimi 93 253 346 ton'dur [71]. Genelde balık üretiminde deniz sularının ısınması, kirlilik ve üretim tekniklerinin modernleşmesi sonucu düşme söz konusudur ve dolayısiyle balik yağı üretimi de azalmaktadır. Çizelge 2.1' de balık yağı üretiminin ülkelere göre dağılımı görülmektedir [71].

Çizelge 2.1: Dünya balık yağı üretiminin ülkelere göre dağılımı (1000 ton)[71].

Ülke	2004	2005
Çin	16892,8	17053,2
Japonya	4311,9	4072,9
Şili	4918,7	4330,3
Peru	9604,5	9388,7
A.B.D.	4959,8	4888,6
Norveç	2524,5	2392,9
İzlanda	1728,1	1661,0
Rusya	2941,5	3190,9
Endonezya	4642,4	4381,3
Hindistan	3391,0	3481,1
Tayland	2839,6	2599,4
Danimarka	804,7	848,8
Türkiye	550,5	426,5

Balık etinin yağ içeriği büyük çeşitlilik gösterir. Sadece balık türüne göre değil, aynı balık türü içinde mevsimsel koşullar, beslenme özellikleri, suyun tuz oranı ve diğer çeşitli faktörler balık etinin içerdiği yağ miktarını büyük ölçüde değiştirebilmektedir. Bu nedenle balıkların yağ içerikleri ile ilgili genel bir miktar belirtmek zordur. Genel olarak % 1-14 gibi geniş bir aralıkta yağ içerikleri değişebilir. Ancak balıklar aynı miktardaki sığır, domuz, koyun veya kümes hayvanlarının etleri ile karşılaştırıldığında genellikle daha az miktarda yağ içerirler ve bu nedenle de genellikle düşük yağlı besinler olarak kabul edilirler [72].

Balık yağı %95 veya daha fazla trigliserid, %1 kadar fosfolipid, %2-5 arasında ise kolesterol, hidrokarbonlar, yağ alkolleri ve yağda çözünen vitaminlerden oluşan sabunlaşmayan maddeleri içermektedir.

Balık trigliseridleri yağ asidi bileşiminin ve balık yağının balığın yakalanmadan önce tükettiği gıdalardan büyük ölçüde etkilendiği kanıtlanmıştır. Pek çok bilimsel yayında, balık yağının yağ asidi kompozisyonunun balık türü ve yaşı, coğrafik bölge, sene ve yakalanma mevsimine bağlı olarak önemli ölçüde değiştiğini ifade

etmektedir. Deniz ürünlerinden elde edilen balık yağları EPA ve DHA gibi çoklu doymamış yağ asitleri bakımından en zengin kaynaktır ve bu çoklu doymamış yağ asitlerinin omega-3 ailesine ait olmasından dolayı diğer bitkisel ve hayvansal yağlara benzememektedir [71].

Balık yağının yapısı sayısı 30-45 arasında değişen, farklı zincir uzunluğunda ve 1-6 çift bağ içeren C_8-C_{26} yağ asitlerinin çeşitli izomerlerinden oluşmaktadır. Bu yağ asitlerinin gliserid yapısındaki dağılımında da bir homojenlik bulunmamaktadır.

Balık yağı yağ asitleri doymuş, tekli doymamış ve çoklu doymamış olarak üç ana sınıfa ayrılabilir: Doymuş yağ asitleri özellikle düz zincirli ve 12 ile 24 karbonlu yağ asitleri içermektedir. 16 ile 24 karbonlu zincir uzunluğundaki (n-11, n-9, n-7, n-5) tekli doymamış yağ asitlerinin pek çok izomeri de bulunmaktadır. 18:1 ve 20:1 için ana izomer n-9 iken, 16:1 için ana izomer 16:1 (n-7) dir. 22:1 için ana izomer 22:1 (n-11)'dir.

Balık yağının yağ asidi kompozisyonu çok karmaşık olmasına rağmen, toplam yağ asidinin %80-85 ini 8 çeşit yağ asidi (14:0, 16:0, 16:1, 18:1, 20:1, 22:1, 20:5 n-3 ve 22:6 n-3) oluşturur.

Çizelge 2.2'ye göre balık yağlarını yağ asitleri içerikleri açısından iki ana kategoriye ayırmak mümkündür. Birincisi yüksek oranda tekli doymamış yağ asitleri (20:1 ve 22:1) ve orta miktarda çoklu doymamış yağ asitleri EPA ve DHA içeren ringa balığı çeşididir. İkincisi ise çok az miktarda tekli doymamış yağ asitleri (C20:1 ve C22:1) ve çok fazla EPA ve DHA içeren hamsi, sardalya ve menhaden gibi balık türleridir. Menhaden balık yağı çok yaygın balık yağıdır. A.B.D.'nin Atlantik Okyanusu'nun kuzey ve güney kıyılarında ve Meksika Körfez'inde yakalanmaktadır. EPA ve DHA içeriği sırasıyla %14-19 ve %5-8 aralığında değişmektedir. En yüksek miktarlar Atlantik Okyanus'unun güneyinden elde edilmektedir [73]. Kültür balıklarında omega-3 seviyesi biraz daha düşüktür. Fakat omega-3 yönünden zengin yemlerle beslenen kültür balıklarında doymamış yağ asitleri miktarı da yüksek olmaktadır [83].

Çizelge 2.2: Bazı balık yağı türlerinin yağ asidi bileşimleri [73].

	Ringa	Hamsi	G.Afrika Hamsisi	Sardalya Portekiz	Menhaden A.B.D.
12	0,1	0,1	0,2	0,1	0,15
14	6,1	7,4	7,8	6,7	7,3
16 : dallanmış	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
15 : 0	0,4	0,6	0,4	0,7	0,6
16 : 0	10,8	17,4	15,6	17,8	19,0
16 : 1	7,3	9,0	8,5	6,0	9,0
16 : 2 (n-7)	0,2	0,2	0,6	0,4	0,5
16 : 2 (n-4)	0,4	1,0	1,4	0,7	1,3
16 : 3 (n-4)	6,7	2,15	2,0	0,4	1,4
16 : 3 (n-3)	-	-	-	0,2	0,2
16 : 4 (n-4)	0,1	-	-	0,1	0,2
16 : 4 (n-1)	1,2	2,4	3,2	1,6	2,3
17 : dallanmış	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2
17 : 0	0,3	0,5	0,8	0,8	0,9
17 : 1	0,3	-	-	0,3	-
18 : dallanmış	0,8	0,7	0,6	0,6	0,4
18 : 0	1,4	4,0	3,7	3,6	4,2
18 : 1	10,3	11,6	9,2	13,0	13,2
18 : 2 (n-9)	tr	0,1	0,2	0,2	0,3
18 : 2 (n-6)	0,9	1,2	0,8	1,2	1,3
18 : 2 (n-4)	0,1	0,6	0,5	0,3	0,4
18 : 3 (n-6)	0,1	0,3	0,3	0,2	0,3
18 : 3 (n-3)	2,0	0,7	0,5	1,0	1,3
18 : 4 (n-3)	3,2	3,1	2,0	3,1	2,7
19 : 0	0,2	0,1	0,2	0,4	0,4
20 : 0	0,1	0,3	0,6	0,4	0,4
20 : 1	13,4	1,5	2,5	4,3	2,0
20 : 2 (n-9)	-	0,3	0,4	0,2	0,4
20 : 2 (n-6)	0,15	0,4	0,2	0,2	0,3
20 : 3 (n-3)	0,3	1,1	1,4	0,8	0,8
20 : 4 (n-3)	0,8	0,7	0,7	1,0	1,3
20 : 5 (n-3)	7,4	17,0	19,3	11,0	11,0
22 : 1	21,1	1,1	3,1	3,8	0,6
22 : 2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2
22 : 4 (n-3)	0,3	0,6	0,4	0,7	0,5
22 : 5 (n-3)	0,8	1,6	2,4	1,3	1,9
22 : 6 (n-3)	6,7	8,7	6,4	13,0	9,1
24 : 0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2
24 : 1	0,8	0,5	0,5	0,6	0,3
İyot indisi	135,7	121,0	182,0	169,7	162,1

Alabalık ve yağı hakkında genel bilgi

Çalışmalarımızda kullandığımız alabalık Salmonidae familyasının en tanınmış mensubudur ve somon balığı ile yakın akrabadır. Ülkemizde deniz ve tatlı su alabalığı olarak bir çok türü bulunmaktadır. Anadolu alabalığı (*Salmo platycephalus*), Gökkuşağı alabalığı (*Oncarhynohus mykiss veya Salmo gairdneri*), Karadeniz alabalığı (*Salmo trutta labrax*), Büyük benekli alabalık (*Salmo trutta macrostigma*), Deniz alabalığı (*Salmo trutta trutta*), Dere alabalığı (*Salmo trutta forma fario*), Göl alabalığı (*Salmo trutta lacustris*) bunlara örnektir.

Pasifik okyanusu somonu ile yakın akraba olan Gökkuşağı alabalığı (*Oncarhynohus mykiss veya Salmo gairdneri*) suni göllerde yetiştirilmek için Amerika'dan ülkemize getirilmiştir. Gökkuşağı alabalıkları Dünyada ve ülkemizde yetiştiriciliği en yaygın olan alabalık türüdür. Türkiye'nin neredeyse her yerinde alabalık üretilen küçük veya büyük çiftliklere rastlamak mümkündür. Ege koşullarında 10-11 ayda porsiyonluk ortalama 250 gr ağırlığa ulaşabilmektedir. Evcil bir balık türüdür. Diğer kültür alabalıklarına oranla daha dayanıklıdır [75].



Şekil 2.2: Gökkuşağı alabalığı [75].

Son yıllarda ülkemizde Karadeniz'de tuzlu suda alabalık yetiştirilmesi yaygınlaşmış bulunmaktadır. Bu nedenle kış aylarında su sıcaklığının 17-18 °C'den daha az olduğu dönemlerde Karadeniz'de ağ kafeslerde alabalık yetiştirilebilmektedir [76].

Su ürünleri üretimini geliştirmek göl, gölet, baraj gölleri ve akarsular gibi doğal kaynakların balıklandırılması ve özel sektörün yavru ihtiyacını karşılamak üzere Antalya-Kepezde bulunan üretme istasyonunda 2005 yılında 375.000 adet alabalık yavrusu üretilmiş olup, 2006 yılında ise 700.000 adet alabalık yavrusu üretimi gerçekleşmiştir [77]. Kültür balıkçılığında 2005 yılı ihracatlarımıza bakıldığında, 10.555 ton levrek, 2.884 ton çipura, 3.615 ton alabalık, 4.549 ton orkinos olup toplam 21.603 ton ihracatımız olduğu görülmektedir. İtalya, İspanya, İngiltere, Fransa ve Japonya başlıca ihracat yaptığımız ülkelerdir [78].

2.5.2 Gamma-Linolenik Asit (GLA) Kaynakları

GLA, Akşam sefası veya Çuha çiçeği (Evening primrose) (*Oenothera bienis*), Hodan veya Boraj (Borage) (*Borago officinales*), Frenk üzümü (Blackcurrant) (*Ribes nigrum* L.) bitkileri ile çilekgiller ailesine mensup bazı bitkilerinin tohumlarında doğal olarak bulunmaktadır [79,80]. Son yıllarda bazı kültüre küflerden *(Mucor, Mortierella* spp.) GLA içeren yağlar üretilebilmiş olup ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir [81,82]. Aşağıda sadece doğal olarak en fazla GLA içeren bitkiler hakkında bilgi verilmiştir.

Çuha çiçeği bitkisi, tohumları ve yağı:

Çuha çiçeği bitkisi ılıman iklim kuşağında özellikle Amerika ve Avrupa'da doğal olarak yetişmektedir. Son yıllarda tarımı da yapılmakta olup hektar başına tohum verimi 18 ton civarındadır. Türüne bağlı olarak uzunluğu 1,2-2,2 mm ve genişliği 0,5-1,0 mm arasında değişen prizmatik tohumları bir embrioludur. Şimdiye kadar 25 türünün analizi yapılmış olup, tüm türlerinde GLA bulunduğu ve tohumların % 24,0 – 33,1 arasında yağ içerdiği; tohumların % 2,0-3,7 oranında GLA taşıdıkları ve tohum yağlarında ise GLA yüzdesinin 8,5- 12,1 arasında değiştiği belirlenmiştir. Ortalama olarak hektar başına yağ verimi 4,8 ton ve ortalama GLA veriminin ise 47,7 kg olduğu da saptanmıştır [83].

Genellikle tohumlardan yağ eldesinde, önce presleme ile yağ sızdırılır ve daha sonra küspede kalan yağ hekzan kullanılarak ekstrakte edilir. Süper kritik karbon dioksit kullanarak çuha çiçeği tohumlarından yağ ekstrakte edilebileceği de gösterilmiştir [84]. Çizelge 2.3 de çuha çiçeği yağ asitleri bileşimi görülmektedir [83].

Çizelge 2.3: Çuha çiçeği yağının yağ asitleri bileşimi [83].

Yağ Asitleri	% Bileşimi
14:0	< 0,1
16:0	5-9
16:1	< 0,1
18:0	1-2
18:1	8-12
18:2	70-79
18:3	< 0,1
18:3 (n-6)	8-13
20:0	< 0,3
20:1	< 0,1
22:0	< 0,1

Hodan bitkisi, tohumları ve yağı :

Avrupada özellikle Akdeniz yöresinde doğal olarak yetişen bu bitki çok eski zamanlardan beri tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. GLA'nın sağlık açısından değerinin anlaşılmasıyla, GLA içeren bitkiler arasında en yüksek yüzdede GLA içermesinden dolayı bu bitkiye karşı ilgi de artmıştır. Bu yüzden, hodan yağı GLA' in konsantre edilmesi için en uygun hammadde olma özelliğini taşımaktadır. Dolayısiyle birçok ülkede özellikle Fransa'da tarımının yapılmasına başlanmıştır [83]. Yaklaşık 6 mm uzunluğunda ve 3 mm genişliğinde oval yapıda tohumlarının ortalama ağırlığı 15-20 mg dır. Tohumların yağ içeriği türlerine ve tohumların olgunluk derecelerine göre değişim gösterir. Olgun tohumlarda % 28-33 arasında yağ bulunurken, olgunlaşmamış tohumlarda ise yağ yüzdesinin 13-18 arasında değiştiği belirlenmiştir. Kalıtsal özellikler bakımından, mavi çiçekli kuzey Avrupa hodan bitkisi genotiplerinin İspanya' da yetişen beyaz çiçekli kültür genotiplerinden daha fazla GLA içerdikleri görülmüştür [85,86].

Tohumlardan yağ eldesinde, sıcakta veya soğukta preslemeyi müteakiben hekzan ile pres bakiyesinin ekstraksiyonu uygulanmaktadır. Pilot ölçekte süper kritik koşullarda karbon dioksit ile yağ ekstraksiyonu da incelenmiştir [87]. Çizelge 2.4 de hodan yağı yağ asitlerinin bileşimi görülmektedir.

Çizelge 2.4: Hodan yağı yağ asitlerinin bileşimi [83].

Yağ asitleri	% Bileşimi
16:0	9-15
16:1	< 0,4
18:0	3,7
18:1	15-19
18:2	32-38
18:3	< 1,0
18:3 (n-6)	18-25
20:0	< 0,4
20:1	2-4
22:1	2-4

Ucciani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, cüce hodan bitkisi diye adlandırılan *Borago pygmea* bitkinin tohum yağında %25-%28 oranında GLA bulunduğu saptanmıştır. *Borago pygmea* bitkisi daha zengin bir GLA kaynağıdır [88].

Frenk üzümü bitkisi, tohumları ve yağı :

Doğal olarak Avrupa ve Asya'da pekçok yörede yetişen frenk üzümü bitkisi özellikle meyva olarak tüketilmek amacıyla Fransa'da yaygın olarak yetiştirilmektedir. Tohumlar yuvarlak siyah renklidir. Kabuklarının kendine has bir aromatik, etli kısmının ise ekşi tadı vardır. Direkt olarak tohumlardan hekzan ile ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen yağın yağ asitleri bileşimi Çizelge 2.5 de görülmektedir [83].

Çizelge 2.5: Frenk üzümü yağı yağ asitlerinin bileşimi [83].

Yağ asitleri	% Bileşimi
16:0	6-8
16:1	< 0,2
18:0	1-2
18:1	9-13
18:2	44-51
18:3 (n-3)	12-14
18:3 (n-6)	15-19
18:4 (n-3)	2-4
20:1	< 0,5

Yukarıda bahsedilen önemli GLA kaynaklarının dışında, doğada çilekgiller [89] ve *Sympytum officinale* [90] familyasına mensup bazı bitkilerin tohumlarında ve Çin' de yaygın olarak yetişen Microula bitkisi [91] tohumunda GLA bulunduğu da yapılan araştırmalar sonucu ortaya çıkarılmıştır.

2.5.3 Alfa-linolenik asit (ALA) kaynakları

ALA, keten (Flax veya Linseed) (*Linum usitatissimum,* L.), perilla (Perilla) (*Perilla frutescens,* L.), ketencik (Camelina) (*Camelina sativa,* L.) ve çia (Chia) (*Salvia hispanica*, L.) gibi Europhorbiaceae ve Labiatae familyasına mensup bazı bitkilerinin tohumlarında doğal olarak % 28-63 gibi yüksek miktarlarda bulunmaktadır [92,93]. Bunların dışında, kabak çekirdeği, soya fasulyesi, ceviz ve

kanola yağlarında % 5-15 arasında yer almaktadır. Aşağıda sadece doğal olarak en fazla ALA içeren bitkiler hakkında bilgi verilmiştir.

Keten bitkisi, tohumları ve yağı:

Keten (*Linum usitatissimum,* L.) 9 cins ve 150 tütü içeren Linaceae familyasından dünyanın en eski kültür bitkilerindendir. Mısır'da M.Ö. 4. yüzyılda keten yetiştirildiği mabetler ve mezarlar üzerine yapılan resimlerden anlaşılmaktadır. İki değişik forma sahip olan keten, yağ ve lif üretiminde kullanılmakta olup 30-100 cm boylanabilen bir yıllık nadiren çok yıllık bir endüstri bitkisidir. Uzun boylu, yüksekten dallanan ve kuvvetli liflere sahip olan formları lif üretimi amacıyla, kısa boylu kısmen alçaktan dallanan formları ise yağ elde etmek amacıyla yetiştirilir.

Bitkinin tepesine doğru dallara ayrılan yeşil renkli gövdesi, almaşık dizili, ucu sivri ve uzunca yalın yaprakları, yaz boyunca açan gök mavisi renginde 5 taç yapraklı gösterişli çiçekleri vardır. Olgunlaşan çiçekleri, bir ucu sivri, yuvarlak biçimli, her biri 2 tohum içeren 5 gözlü kahverengi meyvelere dönüşür. Tohumları 4-6 mm uzunlukta, yassı, parlak ve kırmızımtrak esmer renklidir [94].

2004 yılında dünyada keten tohumu üretim 2 030 607 ton olup 58 000 tonu Rusya'da üretilmiştir [92]. Ülkemizde yetiştiği yerler, başta Batı ve İç Anadolu olmak üzere Anadolu'nun çoğu yeridir.

Keten tohumları % 40-45 yağ içerir. Tohumlardan soğukta presleme, çözücü ekstraksiyonu veya süperkritik CO2 ekstraksiyonu ile keten yağı elde edilir. Özellikle presleme yolu ile elde edilen keten yağı Doğu Avrupa ülkelerinde ve Hindistanda yemeklik yağ olarak tüketilir. Endüstriyel olarak keten yağı boya, cila, boya mürekkebi, sert kontraplak, kağıt ve reçine üretiminde kullanılmaktadır.

Keten yağı yağ asitleri ALA'ca zengindir. Keten yağı yağ asitleri bileşimi bitki varyetesine, yetişme koşullarına ve ekstraksiyon yöntemine bağlı olak değişim gösterir. Yağ asitleri bileşiminde % 45-55 ALA, % 16-20 linoleik asit, % 18-24 oleik asit, % 5-7 palmitik asit ve % 0,3-5 stearik asit bulunur [92,93].

Perilla bitkisi, tohumları ve yağı:

Perilla (*Perilla frutescens,* L.) Lamiaceae familyasına ait yıllık bir bitki olup orijini Doğu Asya'dır. Çin, Hindistan, Japonya, Kore, Tayland ve diğer Asya ülkelerinde tarım bitkisi olarak yetiştirilmektedir ve gıda maddesi, baharat ve doğal ilaç olarak

tüketilmektedir. Kore'nin yıllık tohum üretimi 40 000 tondur ve Kore'de tohumları insanlar tarafından yenilmektedir ve kuş yemi olarak kullanılmaktadır. Uzakdoğu ülkelerinde yemeklik yağ olarak perilla yağının tüketimi yaygındır [93-95]. Güneydoğu Avrupa, Doğu Ukrayna, Asya ve Kuzey Amerika'da güzel kokusu için süs bitkisi olarak kültür altına alınmış ve local olarak bu bölgelerde yerlileştirilmiştir [96]. Türkiye'de Kuzeybatı Karadeniz yöresinde özellikle Artvin dolaylarında doğal olarak yetişmektedir [97].

Gövdesi 0,3-2 m uzunluğunda, yeşil ya da mor, ince tüylü yada yoğun olarak kaba tüylüdür. Yaprak sapı 3-5 cm, yaprakları yuvarlak yumurtamsı, yeşil, eflatuni ya da mor siyah renkli, kenarı testere dişlidir. Çiçek sapı tohumlu kısımdaki çiçek zarfına kadar 4,5 mm ve tüylüdür. Çiçek zarfı 3 mm, ince tüylü, sarı bezeli ve alt dudağı üst dudağından daha uzundur. Taç yaprakları 3-4 mm, hafif yumru biçiminde olup pembe-mor renkli çiçekleri vardır. Çiçeklenme Ağustos-Kasım, meyve verme Ağustos-Aralık arasındadır [97].

Perilla tohumları % 31-51 yağ içerir. Yağının özellikleri keten yağına çok benzer. Perilla yağı yağ asitleri bileşiminde % 60'ın üstünde ALA bulunmaktadır. Tipik bir perilla yağına ait yağ asitleri bileşimi Çizelge 2.6 de görülmektedir.

Çizelge 2.6: Perilla, ketencik ve şia yağları yağ asitleri bileşimleri [93].

Yağ asitleri	**Yağ asitleri bileşimi (%)**		
	Perilla yağı	**Ketencik yağı**	**Şia yağı**
16:0	7	6	6
18:3	61	39	63
18:2	17	16	20
18:1	14	13	7
18:0	1	2	3
Doymuş	8	12	9
Tekli doymamış	14	34	8
Çoklu doymamış	78	54	83

Endüstriyel olarak perilla yağı keten yağının kullanıldığı alanlarda, boya, cila, boya mürekkebi, sert kontraplak, kağıt ve reçine üretiminde kullanılmaktadır.

Ketencik bitkisi, tohumları ve yağı:

Ketencik (*Camelina sativa,* L.) Brassicaceae familyasına ait yalancı keten olarak da adlandırılan orijini Akdeniz yöresi ve Orta Asya olan yıllık bir bitkidir. Ketencik bitkisinin boyu 30-90 cm arasındadır. Gövdesi ve yaprakları hafif tüylüdür. Çiçekleri açık sarı-yeşil arasında değişir ve dört petallıdır. Nisan-Haziran arasında çiçek açar. Tohumlar çok ufak (0,7-1,5 mm), açık sarı, kahverengi veya turuncu renginde, ovalimsi ve pürtüklü yüzeye sahiptir [93].

Tohumlar % 29-45 yağ içerir. Ketencik yağın yağ asitlerinde % 30-40 arasında ALA bulunur. Tipik bir ketencik yağına ait yağ asitleri bileşimi Çizelge 2.6 da görülmektedir.

Ketencik yağının çok eski senelerden beri mide ve barsak ülserleri, gastrit, kolit ve hazım problemlerinin tedavisi için kullanıldığı bilinmektedir [92]. Ketencik yağı gıda ve margarin sanayiinde de tüketilmektedir [93].

Şia bitkisi, tohumları ve yağı:

Şia (*Salvia hispanica* L.) Labiatae familyasına mensup orijini Güney Meksika, Kuzey Guatemala olan yıllık bir bitkidir. Şia bitkisinin boyu 1 m civarında olup yaprakları 4–8 cm uzunluğunda and 3–5 cm genişliğindedir. Çiçekleri mor veya beyaz renklidir. Tohumları ufak, ve ovaldir ve kahverengi, gri, siyah ve beyaz alacalı renklidir. Tohumlar % 25-40 arasında yağ içerir. Yağ asitleri ALA'ca zengindir. Tipik bir şia yağına ait yağ asitleri bileşimi Çizelge 2.6 da görülmektedir. Yağı perilla yağına benzer olduğundan, perilla yapının kullanıldığı alanlarda tüketilir [93].

2.6 Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin Zenginleştirilmesi İçin Uygulanan Yöntemler

Literatürde, ÇDYA'nin konsantre olarak elde edilmesi üzerine çok sayıda yöntemin teklif edildiği ve uygulandığı görülmektedir. Çalışmalarda yer alan yöntemlerden kromatografik yöntemler, distilasyon yöntemleri, düşük sıcaklık fraksiyonlu kristalizasyon yöntemi, süperkritik CO_2 ekstraksiyon yöntemi, enzimatik hidroliz ve esterleşme yöntemi ile üre fraksiyonlama yöntemi hakkında aşağıda kısa açıklamalarda bulunulmuştur.

2.6.1 Kromatografik yöntemler

Kromatografik ayırma yöntemlerinde önce yağ asitleri silika, alümina gibi adsorblama kabiliyeti yüksek maddeler üzerinde adsorbe edilir. Genellikle adsorban maddeler bir kolon içerisine doldurulmuş haldedir (kolon kromatografisi). Adsorban üzerine adsorbe olmuş yağ asitleri daha sonra sulu aseton veya metanol ile sistemden elüye edilir. Adsorplanma farklılığına bağlı olarak yağ asitlerinin birbirlerinden ayrılması sağlanır. Gümüş iyonu kromatografisinde ise kolona gümüş nitrat ile emprenye edilmiş silika adsorban olarak kullanılır. Doymamış yağ asitleri gümüş iyonları ile kompleks oluşturur. Kompleks oluşumu çift bağ sayısına ve molekülün zincir uzunluğuna göre değişim gösterdiğinden yağ asitlerinin birbirlerinden ayrılması ve dolayısiyle saflaştırılması gerçekleştirilebilir. Kromatografik yöntemlerle her ne kadar yüksek oranda konsantre ürünler elde edilebilmekte ise de verim çok düşüktür ve endüstriyel boyutta uygulanması zordur. Daha ziyade bu yöntemler analitik amaçlı uygulamalar için elverişlidir [98,99].

2.6.2 Distilasyon yöntemleri

Bu yöntemlerde genellikle yağ asitleri metil esterleri haline dönüştürüldükten sonra 0,2-0,5 mmHg basıncında 250 ºC civarında vakum distilasyonuna tabi tutularak fraksiyonlanır. Bu çalışma koşullarında doymamışlık derecesi yüksek olan yağ asitlerinin termal polimerizasyonunun önüne geçmek zordur. Serbest yağ asitlerinin oksidasyonu da gerçekleşebilir [99].

2.6.3 Düşük sıcaklık fraksiyonlu kristalizasyon yöntemi

Triaçilgliserollerin ve yağ asitlerinin moleküler yapılarına bağlı olarak çözücülerdeki çözünürlükleri farklıdır. Bu yöntemde genellikle asetonlu ortamda -25 ve -40 ºC da yağ veya yağ asitleri fraksiyonlu kristalizasyona tabi tutulur. Çözücüsüz ortamda da triaçilgliserollerin düşük sıcaklıklarda fraksiyonlanması mümkün olabilmektedir. Endüstriyel olarak palm yağından palmitik asitce zengin palm stearin ve oleik asitce zengin palm olein ürünleri bu yolla elde edilmektedir. Yöntem özel soğutma ünitelerine gereksinim duymaktadır ve özellikle düşük sıcaklıklarda hızlı bir şekilde kristallerin süzülmesi gerekmektedir [99,100].

2.6.4 Süperkritik CO_2 ekstraksiyon yöntemi

Karbon dioksidin kritik sıcaklığının 31 ºC olması dolayısiyle ekstraksiyon işleminin 35 ºC gibi oldukça düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilmesi bu yöntemin sıcaklığa

hassas maddeler için kullanılmasında tercih sebebi yapmaktadır. 200 bar basıncında CO_2'in yoğunluğu hekzanın yoğunluğuna da oldukça yakındır. Bu yüzden hekzan gibi non polar çözücü özelliği gösterir. Ancak kritik koşullarda triaçilgliserollerin CO_2'deki çözünürlüğü çok düşük olduğundan yağların ÇDYA'ince zenginleştirilmesi için uygun olamamaktadır. Superkritik CO_2 ekstraksiyonda yağ asitlerinin doymamışlık derecesinden bağımsız olarak sadece karbon sayısına göre fraksiyonlanabilir olması da direkt olarak yağ asitleri ile çalışmayı engellemektedir. Yağ asitlerinin metil esterlerinin ise bu yöntemle fraksiyonlanması, ÇDYA'ince konsantre ürünler elde edilebilmesi mümkün olabilmektedir. Bu yöntem henüz pahalı bir yöntem olarak görülmekte ise de yöntemin endüstriyel uygulanabilirliğinin arttırılmasına dönük çalışmalara devam edilmektedir [98].

2.6.5 Enzimatik yöntemler ile zenginleştirme yöntemleri

Lipaz enzimleri (E.C.3.1.1.3.) doğal olarak su-yağ fazı arasındaki iç yüzeyde triaçilgliserolleri diaçilgliserollere, monoaçilgliserollere, gliserol ve serbest yağ asitlerine hidroliz eder. Su ile karışmayan organik çözücülerde ise lipid substratlarının esterifikasyon ve transesterifikasyon reaksiyonlarını katalizlerler. Lipazlar bitki ve hayvanların çeşitli dokularından, küf, maya ve bakteri gibi mikroorganizmaların kullanıldığı fermantasyon prosesleri sayesinde üretilebilmektedir. Mikroorganizma kaynaklı lipazlar kolay, ekonomik ve ayrıca sanayi boyutlarında kullanılabilecek miktarlarda elde edilebilmektedir ve endüstride çok çeşitli uygulama alanlarına sahiptir [101,102].

Lipaz enzimleri üç ayrı şekilde seçicilik gösterir. Substrat seçiciliği: lipazlar özel yağ asitlerine ve uzun, kısa veya orta zincir uzunluğundaki yağ asitlerine karşı spesifiktir. Pozisyon seçiciliği: bu gruptaki lipazların sterik engeli nedeniyle *sn*-2 pozisyonundaki yağ asitlerinin aktif bölgeye girmesi engellenmektedir. Sadece *sn*-1,3 pozisyonunda yer alan dıştaki ester bağlarını hidrolizleyebilirler veya bu pozisyonlarda yeni ester bağları oluşturabilirler. Stereospesifiklik: lipaz enziminin rasemik karışımlarda bulunan molekül formülleri birbirine eşit ancak atomların üç boyutlu yerleşimi birbirlerinin ayna aksi olan izomerlerinden birine ilgi göstermesi ve onunla reaksiyona girebilmesidir [102].

Çoklu doymamış yağ asitlerinde *cis*-çift bağlarının varlığı zincirlerin bükülmesine sebep olmaktadır. Bu yüzden, lipazlara sterik engel etkisine yol açan, yağ asidinin

uçta bulunan metil grubu ester bağlarına yakın durmaktadır. Sırasıyla 3, 5 ve 6 tane çift bağın varlığından dolayı GLA, EPA ve DHA'nın aşırı bükülmesi sterik engel etkisini arttırmaktadır. O nedenle, lipazlar da bu yağ asitlerinin ve gliseridlerin ester bağlarına kolaylıkla ulaşamamaktadır. Lipazların GLA, EPA ve DHA'ya olan bu negatif seçiciliği bu yağ asitlerinin veya bu yağ asitlerini içeren triaçilgliserollerin hidroliz veya esterleşme reaksiyonları esnasında zenginleşmesini sağlamaktadır [102]. Enzimatik reaksiyonların ılıman koşullarda gerçekleşmesi, ürün veriminin yüksekliği, spesifik ürünlerin oluşturulabilmesi ve enerji tasarrufu sağlaması gibi avantajlarından dolayı bu yöntem gelecek vaadeden yöntemlerden biridir.

2.6.6 Üre fraksiyonlama yöntemi

Üre fraksiyonlama yöntemi 1940 senesinden beri yağ asitlerinin, esterlerinin, alkollerinin ve diğer türevlerinin birbirlerinden, yağlardan ve diğer katılma yapmayan maddelerden ayrılması için geliştirilmiş klasik bir yöntemdir. Burada karbon zincir uzunluğu, moleküldeki doymamışlığın varlığı ve derecesi önemlidir. İyi bir teknikle oluşturulan üre katılım bileşiği yönteminde doymuş yağ asitleri ve tekli doymamış yağ asitleri kolaylıkla elimine edilir. Basit, çabuk ucuz olan bu yöntemin esası ürenin, düz zincirli bileşikler ile kristal yapıda katılım ürünleri vermesi ve bu ürünlerin ortamdan kolaylıkla ayrılmasına dayanır.

Bu yöntem teknik olarak basit, orta derecede operasyon şartlarını gerektiren bir yöntemdir. 1940 senesinde Bergen tarafından bulunan bu yöntemde su, metanol ve etanol ortamında hidrokarbonların, yağ asitlerinin, esterlerin, alkollerin, aldehitlerin, ketonların ve benzer yapıda düz zincirli bileşiklerin üre katılım bileşikleri oluştuğu, dallanmış ve halkalı moleküller ile katılımın olmadığını ortaya konmuştur. Bu katılım bileşikleri 2 veya daha fazla molekülün kombinasyonudur. Bunlardan biri diğerinin kristal iskeleti içindedir [103].

Genellikle saf üre kristallerinin tetragonal yapısına karşılık bu katılım bileşikleri hekzagonal kolonlar şeklinde kristallenirler ve ince veya kalın iğneler şeklinde görünürler. Ürenin çoklu doymamış bileşiklerle yapmış olduğu katılım ürünleri yassı hekzagonal yapraklar halinde de kristallenebilmektedir. Hekzagonal kristallerin dış iskeletini üre molekülleri oluşturur, ortadaki 6-8 A^0 genişliğindeki dairesel uzun kanallara girebilmiş bileşikler ise üre moleküllerine sekonder bağlarla tutunurlar. Moleküller arasında kuvvetli Vander Waals kuvvetleri mevcuttur. Moleküller

hidrojen bağları ile birbirlerine bağlanırlar. Kanal genişliğinden daha büyük molekül büyüklüğüne sahip bileşikler, örneğin dallanmış zincirli ve halkalı bileşikler bu yüzden katılım ürünü vermezken, trans pozisyonundaki doymamış yağ asitleri ise cis pozisyonundakilere göre tercihli olarak katılım verirler. Üre katılım ürününün stabilitesi zincir uzunluğunun artması ile artar. Bu yüzden daha uzun zincirli moleküller tercih edilir. Molekülde çift bağ sayısı arttıkça katılım yapma özelliği azalır. 6 ya da 8 karbon atomundan daha az zincir uzunluklu siklik moleküller veya maddeler nadiren üre katılım bileşikleri oluşturur. Hidroksil veya epoksi fonksiyonel gruplu ve çift bağlı daha kısa zincirli serbest yağ asitleri daha az uygundur. Sabit zincir uzunluğunda olan bileşiklerde, üre katılım bileşiği oluşumunda doymuş yağ asitleri tekli doymamış yağ asitlerine, tekli doymamış yağ asitleri çiftli doymamış yağ asitlerine göre tercih edilir [104,105].

Üre katılım yöntemi yağlardaki serbest yağ asitlerini % 1 e veya daha düşük değerlere düşürür. Ayrıca bu yöntemle okside olmamış yağ asitlerini okside olmuş yağ asitlerinden ayırmak mümkündür. Doymuş 1-monogliseridler üre katılım bileşikleri oluştururken, 2-monogliseridler oluşturamaz [106]. Oluşan üre katılım bileşiğindeki yağ asitleri minimal olarak hava ile temas ettiğinden doymamış yağ asitlerinin stabilitesi artar ve arzu edilen yağ asitleri yüksek saflıkta elde edilir [107]. Üre fraksiyonlama yöntemi, yukarıda açıklanan zenginleştirme yöntemleri içinde en ümit verici olanıdır. Basit ekipmanlarla malzemenin büyük miktarlarının yüklenmesi, etanol veya metanol harici başka bir organik çözücüye ihtiyaç duyulmaması bu yöntemin avantajlarıdır.

2.7 Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin Zenginleştirilmesi Üzerine Literatürde Yapılmış Çalışmalar

2.7.1 Balık yağlarından omega-3 çoklu doymamış yağ asitlerinin izolasyonu ve konsantre edilmesi üzerinde yapılmış çalışmalar

Literatürde balık yağlarından konsantre EPA ve DHA elde etmek için pek çok yöntem teklif edilmiş ve uygulanmıştır. Kromatografik yöntemlerle EPA ve DHA'nın konsantre edilmesi üzerine yapılmış çalışmalara örnek olarak bu bölümde iki çalışmaya yer verilmiştir. Wilson ve arkadaşları balık yağ asitlerini gümüş iyonu kullanılarak HPLC kullanarak ve aminopropil ile modifiye edilmiş silikajel kolon kromatografisi ile zenginleştirmiştir [108]. Abe ve Tanaka ise moleküler elek dolgu

kolonu kullanarak sardalya yağı yağ asitleri etil esterlerinden %84,5 etil EPA içeren fraksiyon elde etmiştir [109]. Bu çalışmalardan da görüldüğü üzere, kromatografik yöntemlerle yüksek saflıkta EPA ve DHA içeren ürünler elde edilebilmesine rağmen, uygulama maliyetinin yüksek olması ve endüstriyel ölçekte uygulanmasının zorluğundan dolayı bu yöntemler daha ziyade analitik amaçlı uygulamalar için elverişlidir.

Literatürde, balık yağı yağ asitlerinden EPA ve DHA'nın zenginleştirilmesi için düşük sıcaklık kristalizasyonunun olumlu sonuç verdiği belirtilmektedir. Menhaden balık yağı yağ asitlerinin asetonitrildeki çözeltisinin -40 ^{o}C'da 24 saat bekletilmesi sonucunda ele geçen filtratta EPA, DHA ve toplam n-3 ÇDYA'nin % 28,94, % 18,36 ve % 60,9 yükseldiği tespit edilmiştir [110].

Distilasyon ile zenginleştirilme üzerine yapılmış bir çalışmada, balık yağı metil esterlerinin 250 ^{o}C ve 0,2-0,5 mm Hg basıncında vakum distilasyonu ile EPA ve DHA'ca zengin fraksiyonlar elde edilebilmiştir. Fakat bu sıcaklıkta ÇDYA'nin termal polimerizasyonu önlenememiştir [111].

Süperkritik CO_2 ekstraksiyon yönteminin polidoymamış yağ asitlerinin konsantre edilmesinde kullanımı üzerinde yapılmış bir çalışmada, Nilson ve arkadaşları ringa balık yağı etil esterlerinden 15-40 mPa basınç aralığında ve 70-10 ^{o}C sıcaklık intervalinde %70 EPA ve %80 DHA içeren bir ürün elde etmişlerdir [112]. Jachmanian ve arkadaşları ise bir cins balık (hake) yağının etil esterlerini 8,63-18,04 MPa basınçta ve 40-70 ^{o}C da süperkritik CO_2 ile ekstrakte etmişler ve içerisinde % 55 DHA bulunan ekstrat elde etmeye muvaffak olmuşlardır [113].

Son yıllarda enzimatik hidroliz ve esterleşme reaksiyonu ile balık yağlarından EPA ve DHA'ca zengin ürünlerin eldesi üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir [114-118]. Okada ve Morrissey içerisinde % 26,86 EPA ve % 13,62 DHA bulunan Pasifik sardalya balık yağından ÇDYA'nin zenginleştirilmesinde hidroliz reaksiyonunu kullanmışlar ve *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Mucor javanicus* ve *Aspergillus niger* lipaz enzimlerinin zenginleşme üzerindeki etkinliğini incelemişlerdir. En iyi sonuçları *Candida rugosa* lipazı ile almışlardır. 250 ünite bu enzim ile 1,5 saat sonunda hidroliz ürününde EPA % 33,74 değerine yükselmiştir. 500 ünite enzim ile çalışmada ise 9 saat sonunda ürünün DHA % 29,94 değerine ulaşmıştır [117]. İçeriğinde mol yüzdesi olarak % 19 DHA ve % 12 EPA bulunan

mürekkep balığı yağından etanoliz reaksiyonu ile EPA ve DHA'ca zengin ürün eldesinde ise *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* ve *Rhizomucor miehei* lipazları denenmiştir. *Thermomyces lanuginosus* ile ürün olarak mono ve diaçilgliserollerden ibaret olan karışım elde edilmiştir. Bu karışımda mol yüzdesi olarak % 34 DHA ve % 17 EPA bulunduğu belirlenmiştir [118]. Schmitt-Rozieres ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada sardalya balığı konservesi hazırlayan bir tesisten temin edilen atık çözeltiden selektif esterleşme yolu ile EPA ve DHA kazanımı üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Esterifikasyon işleminde 1-butanol ile Lipozim IM 60 ve immobilize *Candida rugosa* lipaz enzimleri kullanılmıştır. Lipozim ile EPA zenginleşmesi olmamış ama DHA konsantrasyonu % 80 lere yükseltilebilmiştir. *C. rugosa* ile %30 EPA zenginleştirilmesi sağlanabilmiştir [119].

Üre fraksiyonlama yöntemi ile balık yağlarından EPA ve DHA'nın konsantre edilmesi ile ilgili literatürde yer alan ilk çalışmada, sardalya yağı yağ asitleri üre ile metanollü ortamda muamele edilmiş ve yağ asitleri iyot indisleri 30,56 ile 304,9 arasında değişen 8 fraksiyona ayrılmıştır [120].

Wille ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada, sardalya yağı yağ asitlerinden (%30 EPA ve DHA) üre ile doymuş ve monodoymamış yağ asitleri uzaklaştırılmış ve geriye kalan fraksiyonda EPA ve DHA yüzdesi %90'a ulaşmıştır [121].

Ratnayake ve arkadaşları ise çalışmalarında balık yağından EPA'nın zenginleştirilmesine kristalizasyon sıcaklığı ile üre:yağ asitleri oranının etkisini incelemiştir. Üre:yağ asiti ağırlık oranının optimum değerini 3:1 olarak tespit ettikten sonra -35 °C, -18 °C, -12 °C, +1 °C ve +6 °C lerde üre kompleksleri oluşturmuşlardır. Üre ile kompleks yapmayan yağ asitleri fraksiyonunda EPA miktarının -18 °C nin altında arttığını ancak verimin azaldığını belirlemişlerdir. EPA nın maksimum geri kazanımının +1 °C da % 91 gibi yüksek bir değere ulaştığını bulmuşlardır [122].

Grompone tarafından yapılan çalışmada ise, ayı balığı yağından ÇDYA'nin zenginleştirilmesinde üre:yağ asitleri oranı 3:1 olarak alınmış, etanol veya metanol ortamında komplekslerin oluşması sağlanmıştır. Sıcaklık olarak -6 °C, kristalizasyon süresi olarak 24 saat seçilmiştir. Elde edilen konsantratın ÇDYA yüzdesi % 90

verimi ise % 17 olarak saptanmıştır. Başlangıçta DHA % 12,7 iken yapılan işlemler sonucunda elde edilen üründe % 66,4 gibi yüksek bir değere ulaşılmıştır [123].

2000 yılında Hayes ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada, üre fraksiyonlama tekniğine göre hidroksilli yağ asitlerince zengin tohum yağlarından (hint tohumu ve *lesquerella fendleri* yağlarından) hidroksilli yağ asitlerinin ve balık, boraj ve keten yağlarından ise sırasiyle EPA ve DHA, GLA ve ALA'in elde edilmesi üzerinde çalışılmıştır. Çalışmalarda iki farklı yağ asidi:üre oranında (1:0,5 ve 1:1,5), etanollü ortamda ve oda sıcaklığında fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Bu yöntem ile hidroksil içeren yağ asitlerinin zenginleştirilmesi sağlanamamıştır. Buna karşılık, yağ asitleri:üre oranı 1:1,5 olduğu çalışma koşullarında, % 19,0 EPA ve % 10,8 DHA içeren balık yağından içerisinde % 27,8 EPA ve % 16,2 DHA bulunan ekstrat, % 21,7 GLA içerikli boraj yağından içerisinde % 31,6 GLA bulunan ekstrat ve % 49,4 ALA içerikli keten yağından ise içerisinde % 62,3 ALA bulunan ekstrat elde edilebilmiştir [104].

Yapılan başka bir çalışmada ise uskumru konserveleri hazırlayan bir tesisin atıklarından çoklu doymamış yağ asitlerinin zenginleştirilmesi incelenmiştir. Balığın derisi, iç organları ve kas kısmından ayrı ayrı elde edilen yağ asitleri, yağ asidi:üre oranı 1:3,5 ve üre:etanol oranı 1:3,7 olacak şekilde 0 ºC de 24 saat üre ile işleme tabi tutulmuştur. Balık derilerinden, iç organlarından ve kaslarından sırasiyle % 83,4, % 73,2 ve % 80,1 ÇDYA içeren konsantre preparatlar elde edilmiştir [124].

Diğer bir çalışmada ise rafine morina yağı (DHA: % 6.9, EPA % 12.2) kullanılmıştır. Rafine morina yağı önce lipaz katalizörlüğünde hidroliz edilmiştir. Elde edilen yağ asitleri 10 mL metanolde 2 gr üre ile 60-65 ºC de berrak çözelti elde edilinceye kadar ısıtılmıştır. Çözelti oda temperatüründe bütün bir gece kristallendirilmek üzere bırakılmıştır. Karışım sonra daha sonra 4 ºC de 5 saat bekletildikten sonra filtre edilmiştir. Morina balık yağı yağ asitlerinde zenginleştirme işlemi sonucunda EPA % 12,2 den % 29,6 ya, DHA % 6,9 dan % 28,1 yükselmiştir. Toplam yağ asitleri geri kazanım verimi % 17,9 olarak bulunmuştur [125].

Senanayake ve Shahidi tarafından yapılan çalışmada, algal (yosun) yağından üre katılım yöntemi ile konsantre DHA nın hazırlanmasında, 10 g yağ asidi, 150 mL %95 sulu etanolde (% 20 ağırlık/hacim) çözülmüş üre ile 60 ºC de tamamen berrak homojen bir karışım elde edene kadar karıştırılarak çözülmüştür. Çözelti oda

sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra + 4 ºC deki soğutucuda 24 saat daha bekletilmiştir. Sonuç olarak üre katılım yöntemi ile elde edilen üründe DHA % 47,4 den % 97,1 e yükselmiştir [126].

Liu ve arkadaşlarının yürüttükleri bir çalışmada, ton balığı yağından DHA ve EPA'nın üre fraksiyonlama yöntemine göre eldesi tepki yüzey metodolojisine göre optimize edilmiştir. Proseste ürün verimi ile ürünün DHA ve EPA içeriği tepki değerleri olarak seçilmiştir. 3 değişkenli merkezi kompozit dönüşümlü tasarım yöntemine göre üre/yağ asidi, kristalizasyon sıcaklığı ve kristalizasyon zamanının tepki değerlerine olan etkileri incelenmiştir. Üre katılım reaksiyonu üzerinde üre/yağ asidi oranı ve kristalizasyon sıcaklığının çok büyük etkisinin olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın sonunda tepki yüzey metodolojisine göre kritik değerler üre:yağ asitleri oranı 3,0, sıcaklık -5 ºC ve zaman 20 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda DHA ve EPA toplamı % 85,02 , ekstrat verimi % 25,1 olarak bulunmuştur [127].

Wanasundara ve Shahidi'nin yaptığı bir çalışmada ise ayı balığı yağının tepki yüzey metodolojisine göre üre ile fraksiyonlanmasında, kritik koşullar olarak üre:yağ asitleri oranı 4,5, kristalizasyon sıcaklığı -10 ºC ve kristalizasyon zamanı 24 saat olarak tespit edilmiştir. Elde edilen ürünün EPA ve DHA içeriği ise % 88 bulunmuştur [128].

2.7.2 GLA içeren yağlardan GLA'in zenginleştirilmesi üzerinde yapılmış çalışmalar

Günümüzde, GLA'nın besin ve tıbbi açıdan değerinin anlaşılması bu asitin kaynaklarından saflaştırılması, zenginleştirilmesi üzerine olan çalışmaları da hızlandırmıştır. Bu amaçla, GLA içeren yağlara değişik yöntemler uygulanarak GLA'ca zengin ürünler elde edilmeye çalışılmaktadır.

Uygulanan kromatografik yöntemlere örnek olarak Y-zeolitleri [129] ve gümüş iyonları ile emprenye edilmiş silikajel kullanılarak yapılmış çalışmalar gösterilebilir [130,131].

Düşük sıcaklık fraksiyonlu kristalizasyon yöntemi ile hodan yağı yağ asitlerinden GLA'ce zengin fraksiyonlar elde edilmiştir. Ju ve Chen, hodan yağı yağ asitlerini asetonitrilde -40 ^{o}C'da 48 saat ve takiben asetonitril ve aseton içerisinde -80 ^{o}C'da 24 saat bekletmişler ve neticesinde ele geçen filtratta GLA'nın % 28,35 den % 92,09'a yükseldiğini tespit etmişlerdir [132]. Lopez-Martinez ve arkadaşları ise

hodan yağ asitlerinin hekzanlı çözeltisini +4 ^{o}C'da 20 saat kristallenmeye bırakmışlar ve süre sonunda filtratın GLA konsantrasyonunu % 58,8 olarak belirlemişlerdir [133].

Literatürde enzimatik hidroliz ve esterleşme yöntemleri ile GLA'nın konsantre edilmesi üzerine yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır [134-141].

Rahmatullah ve arkadaşları, *Candida cylindracea* lipazı kullanarak çuha çiçeği ve hodan yağlarının hidrolizinde hidroliz olmamış açilgliserollerde GLA zenginleşmesi olduğunu gözlenmişlerdir. Çuha çiçeği yağında başlangıçta %9,4 oranında mevcut olan GLA nın hidroliz olmadan kalan TAG 'lerde %46,5' e yükseldiğini; hodan yağının aynı koşullarda hidrolizinde ise başlangıçta hodan yağında %20,4 oranında mevcut olan GLA nın reaksiyon sonunda TAG' lerde %47,8 değerine eriştiğini belirlemişlerdir [134]. Araştırıcıların diğer bir çalışmasında ise, Lipozim (*Rhizomucor miehei*) lipazı kullanılarak GLA' in hodan ve çuha çiçeği yağı yağ asitlerinden konsantre edilmesinde esterleşme reaksiyonu denenmiştir. Hodan ve çuha çiçeği yağ asitlerini n-hekzan ortamında n-butanol ile esterleştirilmiştir. Araştırıcılar, GLA' in esterleşmeyen yağ asitleri kısmında konsantre hale geldiğini saptamıştır. Hodan ve çuha çiçeği yağları ile yürüttükleri bu deneyler sonucunda, içerisinde sırasıyla % 93 ve % 75 GLA bulunan esterleşmeyen yağ asitleri fraksiyonları elde etmişlerdir [135].

GLA' ince zengin ürünlerin elde edilmesi üzerinde çalışan diğer bir çalışma grubu ise Shimada ve arkadaşlarıdır. Shimada ve arkadaşları hodan yağından GLA konsantre edilmesinde, immobilize *Rhizopus delemar* enziminin etkinliğini incelemişlerdir. Araştırıcılar önce hodan yağını *Candida rugosa* [136] veya *Pseudomonas* sp.[137] enzimi ile hidroliz ederek içerisinde % 46 GLA bulunan yağ asitlerini elde ettikten sonra, bu asit fraksiyonunu *Rhizopus delemar* enzimi kullanarak lauril alkol ile esterleştirmişlerdir. Esterleştirme reaksiyonunu müteakiben ürüne uyguladıkları distilasyon ve üre fraksiyonlaması gibi saflaştırma işlemleri sonucunda % 98,6 GLA içerikli yağ asitleri ürününü elde edebilmişlerdir [138].

Literatürde üre fraksiyonlama yöntemi ile GLA'nın konsantre edilmesi üzerine iki çalışmaya rastlanmıştır. Traitler ve arkadaşları frenk üzümü yağ asitlerini metanollü ortamda üre ile fraksiyonlama çalışmaları yürütmüşlerdir. Yağ asitleri:üre oranı (ağ/ağ) 1:5, üre:metanol oranı (ağ/ağ) 1:2 ve +4 ºC da çalışıldığında 24 saat sonunda

elde edilen üründe GLA konsantrasyonunun % 18,2'den % 79,6'ya ulaştığını belirlemişlerdir [142]. Spurvey ve Shahidi ise içerisinde % 21,6 GLA bulunan hodan yağı yağ asitlerinin üre ile fraksiyonlanmasında reaksiyon koşullarını 3 değişkenli 3 seviye değerli yüzey merkezli küp tasarımı kullanarak optimize etmişlerdir. Üre:yağ asitleri oranını 2:1-4:1 arasında, reaksiyon sıcaklığını -12 ºC ile +6 ºC arasında ve reaksiyon zamanının 12-24 saat arasında değiştirmişlerdir. Optimum üre:yağ asitleri oranının, sıcaklık ve zamanı sırasiyle 3,7, -7 ºC ve 16 saat olarak tespit etmişlerdir. Bu optimum koşullarda elde edilen üründe GLA içeriği % 91,5 olmuştur [143].

2.7.3 ALA içeren yağlardan ALA'in zenginleştirilmesi üzerinde yapılmış çalışmalar

Literatürde ALA izolasyonu, saflaştırılması ve zenginleştirilmesi üzerinde az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Guil-Guerrero ve arkadaşları gümüş iyonu ile emprenye edilmiş silika gel kolonu kullanarak keten yağı yağ asitlerinin metil esterlerininden hekzan-aseton çözücü karışımı ile % 58,4 verimle % 100 saflıkta ALA elde etmeye muvaffak olmuşlardır [144]. Uksila ve Lehtinen keten yağı yağ asitlerinden ALA kazanımında düşük sıcaklık kristalizasyon yöntemini kullanmışlardır. Asetonitril-su çözücü sisteminde -40 ºC da 24 saat sonunda % 15 verimle içerisinde % 85 ALA bulunan ürün elde etmişlerdir [145]. Chen ve Ju'nun çalışmasında ise keten yağı yağ asitlerinin fraksiyonlu kristalizasyonunda % 30 asetonitril-% 70 aseton karışımı çözücü olarak denenmiştir. Bu sistemde -80 ºC da 24 saat sonunda % 24,9 verimle % 85,7 ALA içerikli konsantre ürün elde edilebilmiştir [146].

Literatürde üre fraksiyonlama yöntemine göre ALA'ca zenginleşmiş ürünler eldesi ile ilgili 3 çalışma bilgisi mevcuttur. Newey ve arkadaşlarının 1950 yılında özet halinde yayınlanmış çalışmasında üre ile keten yağından ALA izole edilebileceği beyan edilmiştir. Ancak bu çalışmanın tüm metnine literatür kaynaklarından erişilememiştir [147].

Swern ve Winfred'in 1953 yılında yayınlanan çalışmasında, perilla ve keten yağı yağ asitleri metanollü ortamda üre ile fraksiyonlanmıştır. Yağ asitleri:üre oranı 1:0,88 (ağ/ağ), üre:metanol oranı 1:2,41 (ağ/hacim) ve 0 ºC de uygulanan proses sonucunda, perilla ve keten yağ asitlerinden sırasiyle % 55-61 verimle % 87-89 ALA içeren ve % 87-90 verimle % 66-70 ALA içeren konsantre ürünler elde edilmiştir [148].

Bu konuda 2000 yılında Hayes ve arkadaşları tarafından yapılan yapılmış son çalışmada, üre fraksiyonlama tekniğine göre keten yağı yağ asitlerinden ALA'in elde edilmesi üzerinde çalışılmıştır. Çalışmada iki farklı yağ asidi:üre oranında (1:0,5 ve 1:1,5), etanollü ortamda ve oda sıcaklığında fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Yağ asitleri:üre oranı 1:1,5 olduğu çalışma koşullarında, % 49,4 ALA içerikli keten yağından içerisinde % 62,3 ALA bulunan ekstrat elde edilebilmiştir [104].

2.8 Tepki Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology)

Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM) istatiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir. Prosesler bağımlı ve bağımsız değişkenlerden oluşmaktadır ve Tepki Yüzey Metodolojisi bağımsız değişkenleri parametre veya faktör, bağımlı değişkenleri ise tepki veya çıktı olarak değerlendirmektedir. TYM bağımlı değişkenin çok sayıda bağımsız değişkenden etkilendiği proseslerin analizinde, modellemesinde ve tepkinin optimizasyonunda uygulanan bir seri deney prosedürüdür. TYM ile bir çok endüstriyel problemin çözümünde pek çok yarar sağlamaktadır. TYM ile bir seferde, seçilen bağımsız değişkenlerin tepki üzerindeki etkileri görülebilmekte ve özel deney tasarımları kullanılarak optimizasyon için gerekli deney sayısı azaltılabilmektedir [149, 150].

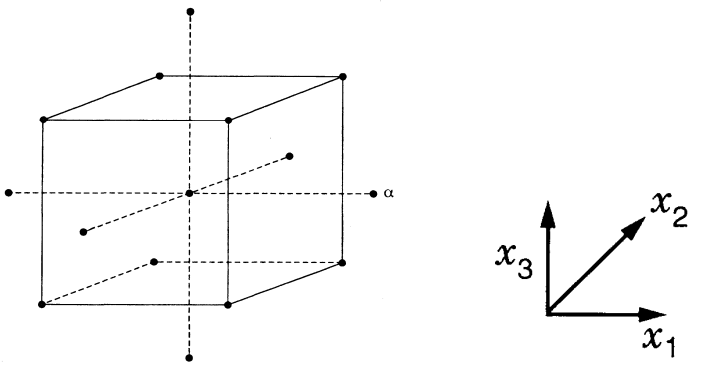
TYM teknikleri üzerinde yapılan ilk çalışmalar 1951 yılında Box ve Wilson tarafından yürütülmüştür. Daha sonra, 1957 yılında Box ve Hunter'in, 1958 yılında Bradley'in, 1960 yılında Davies'in, 1987 yılında Khuri ve Cornell'in ve 1995 yılında Myers ve Montgomery'in TYM üzerindeki çalışmaları kullanılan teknikleri geliştirmiştir. Bu tekniklerin tümünde deneylerin tasarımı ve elde edilen deneysel sonuçların analizi yer almaktadır [151,152].

TYM kullanılırken tepki üzerine en fazla etki ettiği düşünülen değişkenlerin seçilmesi en doğru sonuçların alınması açısından son derece önemlidir. Değişkenlerin seçiminden sonra ön denemeler ve literatür araştırması ile bu değişkenlerin ölçülebilecekleri değer aralıkları belirlenir. Daha sonra proses için en uygun model denkleminin seçilmesi gerekir. Model denklem, ölçülen tepkiyi proses değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak ifade eder. TYM'de kullanılan model denklemler birinci veya ikinci dereceden olabilir. TYM ile yapılan çalışmalarda daha çok ikinci dereceden model denklemler tercih edilmektedir [149,150,153].

Model denklemin belirlenmesinin ardından optimum noktaya ulaşmak için kullanılan deneysel tasarım yönteminin seçilmesi gerekmektedir. TYM'de en çok kullanılan deneysel tasarımlara Merkezi Bileşik veya Box Behnken Deney Tasarımları örnek olarak gösterilebilir. Bu tasarımlar ikinci dereceden terimler içeren modellerdir, yani bağımsız değişkenler ile çıktı değeri arasında doğrusal yaklaşımın ötesinde bir bağlantı ifade etmektedirler. Bu modeller ile elde edilen sonuçlar tepki yüzey ve izdüşüm (contour) grafikleri ile gösterilerek yorumlanabilir. Tüm bu tasarımlar ile optimizasyon için gerçekleştirilmesi gereken deneylerin koşulları ve deney sayıları belirlenmiş olur [149]. Tepki yüzey ve izdüşüm grafiklerinde iki bağımsız değişkenin çeşitli seviyelerinde elde edilen tepki değerleri *y* ekseninde gösterilmektedir. Bu şekilde optimizasyon için önemli bir veri olan iki faktörün çıktı üzerindeki etkileri bir cevap yüzeyi şeklinde gösterilmiş olur [149,150].

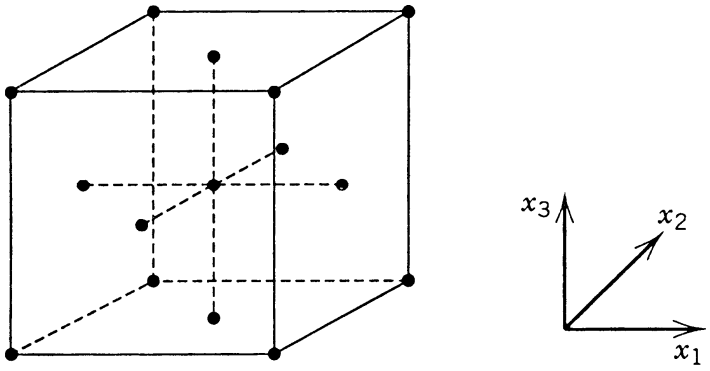
2.8.1 Merkezi bileşik deney tasarımları

Merkezi bileşik deney tasarımları uygulanırken çeşitli deneysel noktalar kullanılmaktadır. Bu deneysel noktalar, küp noktalar (cube points), yıldız noktalar (star points) ve merkez noktaları (center points) olmak üzere üç çeşittir. Küp noktaları için kodlanan bağımsız değişken değerleri ±1'dir. Merkezi bileşik deney tasarımında ikinci nokta grubunu oluşturan yıldız noktalarının (±α, 0, 0,…0), (0, ±α, 0, …0), (0, 0, …0, ±α,) olmak üzere değişik koordinatları bulunmaktadır. Diğer nokta grubu ise koordinatları her zaman (0, …0) olan ve tasarım merkezinde yerleşen merkez noktalarıdır [149,152,154]. Merkezi Bileşik Deney Tasarımında üç faktörlü bir sistem için deney noktaları Şekil 2.3'de görülmektedir. Faktörler x_1, x_2 ve x_3 şeklinde ifade edilmektedir.



Şekil 2.3: Merkezi bileşik deney tasarımında üç değişkenli bir sistem için deney noktaları örneği [149]

Merkezi bileşik deney tasarımları içinde sınırlandırılmış, dışından çemberlenmiş ve yüzey merkezli olmak üzere kendi içlerinde farklı türlere ayrılırlar. Bu tasarım türlerinin birbirlerinden ayrılmasında deneyler için kullanılan faktörlerin seviye değerleri etkili olmaktadır. Üç faktörlü bir tasarımda eksensel noktalar küpün yan yüzeylerinin merkezlerinde ise bu tasarım yüzey merkezli tasarım olarak adlandırılır [154,155]. Şekil 2.4'de üç değişkenli bir sistem için Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarım noktaları görülmektedir. Faktörler x_1, x_2 ve x_3 şeklinde ifade edilmektedir.



Şekil 2.4: Yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarımında üç değişkenli bir sistem için deney noktaları örneği [149]

Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarımında en az iki merkez noktanın olması gereklidir. Yüzey merkezli küp deney tasarımında (Face Centered Design) $\alpha = 1$'dir. Tasarım merkezi ise (0, 0, 0) koordinatlarına sahip merkez noktadır. Bu deney tasarımında, yıldız noktaları küpün yüzlerinin tam ortasında bulunmaktadır. Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarımları bağımsız değişkenlerin alt ve üst seviye değerlerinin kesin olarak belirlendiği sistemlerde en doğru sonuçları vermektedirler [150,154,155]. Çizelge 2.7'de üç faktörlü üç seviyeli sistem için Yüzey Merkezli Merkezi Bileşik Deney Tasarımı görülmektedir.

Çizelge 2.7: Yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarımı [149]

Deney No	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1
5	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1
7	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1
9	-1	0	0
10	+1	0	0
11	0	-1	0
12	0	+1	0
13	0	0	-1
14	0	0	+1
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

2.8.2 Varyans analizi (ANOVA)

Varyans analizi özellikle bir çok değişkenin bulunduğu, çok seviyeli modellerde deneysel sonuçların tamamının toplu olarak yorumlanmasını sağlar. Kısaca ANOVA olarak da bilinen varyans analizi, istatiksel tekniklerin genel toplamıdır. ANOVA nicel ölçümleri kapsayan deneysel verilerin analizi ve elde edilen model hakkında karar verebilmek için geliştirilmiş bir tekniktir [149,150,155].

Varyans analizlerinden elde edilen önem seviyesi, deneyler sonucunda verilen kararın doğruluğunun ne kadar olasılıkla güvenli olduğunu belirler. Önem seviyesi anlamlılık düzeyi olarak da bilinmektedir. Genellikle α ile gösterilen bu ihtimal, çoğu zaman deneysel sonuçların elde edilmesinde önce tayin edilir. Böylece, elde edilen sonuçların yapılan seçimden etkilenmemiş olması sağlanır. Varyans analizi sırasında daha çok 0,05 ve 0,01 anlamlılık düzeyleri kullanılır. Örneğin, 0,05 anlamlılık düzeyi esas alınırsa, analizin kabul edilebileceği halde reddedilme olasılığı %5 civarındadır. Bu durumda analiz sonucunda verilen kararın doğruluğu %95 güvenli bulunabilir. Bunun anlamı hata yapma olasılığının %5 olduğudur [154].

Varyans analizinde kurulan modele ait keyfi bir anlamlılık düzeyi seçilir ve anlamlılık düzeylerine göre hazırlanmış F tablolarında serbestlik derecelerinin kesişim noktasında bulunan F oranı değerleri ile kıyaslanır. F oranı, ANOVA

tablosunda model varyansının hata varyansına oranını ifade eder. Modelin geçerliliği $F_{hesaplanan}$ ve F_{tablo} değerleri kıyaslanarak anlaşılır. Modelin geçerli olabilmesi için $F_{hesaplanan} > F_{tablo}$ olmalıdır [150,155].

2.8.3 Regresyon analizi

Regresyon analizinde bağımlı ve bağımsız değişkenler arasında en uygun bağlantı tespit edilmektedir. Bunu gerçekleştirmek için en uygun deneysel tasarım seçilir. Yapılan deneylerle elde edilen veriler, regresyon analizi sonucunda matematiksel bir formül şeklinde ifade edilir [149,150].

2.8.4 Kalanların toplamı

Deneylerde gözlenen tepki değerleri ile deneysel tasarımdan elde edilen tepki değerlerinin birbirine yakınlıkları, oluşturulan modelin doğruluğunu göstermektedir. Deneylerde gözlenen çıktı değerleri y, deneysel tasarımdan elde edilen çıktı değerleri ise $\hat{y}$ şeklinde gösterilmektedir. Kalanların toplamı, bu değerlerin arasındaki farkların toplamıdır ve seçilen modelin doğru bir model olduğunun göstergesi olarak bu toplamın sıfır ya da sıfıra yakın bir değer olması gerekir [149,150,153]. Matematiksel ifadesi aşağıdaki gibidir:

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

2.8.5 Korelasyon katsayısı

Tasarımda kullanılan değişkenler arasında etkileşimin olup olmadığı, varsa etkileşimin kuvvetli ya da zayıf olduğu korelasyon katsayısı ile belirlenebilir. Korelasyon katsayısı (R), tasarımdan elde edilen değerler ($\hat{y}$) ile deneysel değerlerin (y), deneysel sonuçların ortalama değerinden ($\overline{y}$) uzaklaşma derecesini vermektedir ve aşağıdaki ifadeden bulunur [156,159].

$$R^2 = \frac{\sum (\hat{y} - \overline{y})^2}{\sum (y - \hat{y})^2} \qquad \textbf{(2.2)}$$

R^2 değeri -1 ile +1 arasında değişim göstermektedir. R^2'nin -1 olması değişkenler arasında negatif tam doğrusal ilişkinin varlığını ortaya koyar, R^2'nin +1 olması durumunda ise değişkenler arasında pozitif tam doğrusal ilişki söz konusudur [150].

Bu çalışmalarımızda alabalık, çuha çiçeği ve keten yağı yağ asitlerinden konsantre çoklu duymamış yağ asitlerinin üretiminin optimizasyonunda,alabalık ve çuha çiçeği yağı yağ asitleri için 3 değişkenli ve 3 seviyeli; keten yağı yağ asitleri için ise 2 değişkenli ve 3 seviyeli küp deneysel tasarım modelleri seçilmiş bu tasarımlara uygun sayıda reaksiyonlar yürütülmüş ve sonuçların istatiksel değerlendirilmesi yapılmıştır.

Konsantre çoklu doymamış yağ asitlerinin üretiminde yağ asidi/üre ve üre/alkol oranı ile zaman en önemli değişkenlerdir. Optimizasyon için parametrelerin ve parametre aralıklarının seçimi önemli olup, sadece reaksiyon sistemine göre değil aynı zamanda ekonomiklik ve uygulanabilirlik faktörleri de dikkate alınarak seçilmelidir. Optimizasyon için parametrelerin etki aralıklarının seçiminde çok yönlü düşünülmelidir. Bu yüzden TYM ile deneylerin tasarımında parametreler için seçilecek seviye değerleri keyfi olarak belirlenmemeli, aynı reaksiyon sisteminde yapılacak ön denemeler yapılarak parametrelerin seviye değerleri belirlenmelidir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Hammaddeler

Bu çalışmada kullanılan alabalık yağı Kardelen Tarım Ürünleri Ltd. Şirketi'nden, çuha çiçeği (Evening Primrose) yağı DSM Nutritional Products Ltd (Basel, İsviçre) firmasından ve keten yağı Karakaş Boya Baharat Kimyevi Maddeler San. Ve Tic. Ltd. Şirketi'nden temin edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan tüm çözücüler ve kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiş saf ürünlerdir.

3.2 Çalışma Yöntemi

3.2.1 Kullanılan hammaddelerin karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan yağların ve reaksiyon ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri kapiler gaz kromatografisi (GC) ile saptanmıştır. Bu amaçla önce yağların metil esterleri hazırlanmış ve Hewlett-Packard 5890 Seri II (Hewlett-Packard, Waldron, Almanya) gaz kromatografi 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 asitlerinden ibaret standart yağ asitlerinin metil esterleri karışımı (Sigma-Aldrich) ile Menhaden yağı yağ asitleri metil esterlerinin (Sigma, Poole, İngiltere) aynı cihaz ve koşullarda yapılan analizlerinden elde edilmiş kromatogramlar kullanılmıştır. Uygulanan kromatografik analiz koşulları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 : Gaz kromatografik analiz koşulları

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

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

3.2.2 Alabalık, çuha çiçeği ve keten yağlarından serbest yağ asitlerinin eldesi

Alabalık, çuha çiçeği ve keten yağlarından serbest yağ asitlerinin eldesinde Senanayake ve Shahidi'nin kullandığı yöntem kullanılmıştır [126]. 250 mL'lik cam balona 20 g yağ ve 100 mL 1N etanollü NaOH çözeltisi konulmuş ve karışım geri soğutucu altınca 2 saat sabunlaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda reaksiyon karışımına 100 mL su ilave edilmiştir. Reaksiyon ortamından sabunlaşmayan maddelerin uzaklaştırılması için, karışım ayırma hunisinde 2 kez 100 mL hekzan ile çalkalanmıştır. Sabunlaşmayan maddeler hekzan fazında çözünmüş ve yağ asitleri sodyum sabunları ise sulu fazda kalmıştır. Sabunlaşan maddeleri içeren sulu faza 3N HCl pH 1,0 olana kadar damla damla ilave edilmiş ve yağ asitlerinin serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu yağ asitleri 100 mL hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Hekzan fazı 2 kez 50 mL su ile yıkanmış, sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra döner buharlaştırıcıda hekzanın uçurulması sağlanmıştır. Bu şekilde elde edilen yağ asitleri kapalı kaplara alınmış ve kullanılana kadar derin soğutucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık, çuha çiçeği ve keten yağı yağ asitlerinden çoklu doymamış yağ asitlerince zengin ürünlerin eldesi

Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağından EPA ve DHA'in, çuha çiçeği yağından GLA'in ve keten yağından ALA'in konsantre edilmesinde Wanasundura ve Shahidi'nin çalışma prosedürü uygulanmıştır [128]. Bu yönteme göre, 400 mL'lik behere 4 gram yağ asitleri ve %96'lık etanolde çözülmüş üre çözeltisi konulduktan sonra, karışım 60 ºC da tamamen berrak çözelti elde edilene kadar karıştırılmıştır. Deneylerde, yağ asidi:üre (ağırlık/ağırlık) oranı 1:1,5-5,0 ve üre:etanol (ağırlık/hacim) oranı ise 1:5-10 arasında değiştirilmiştir. Berrak çözelti elde edildikten sonra, karışımın oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve buzdolabında +4 ºC da 1-24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde, beher muhteviyatı nuçe erlenine aktarılmış ve vakum uygulanarak derhal süzülmüştür. Filtrata hacmi kadar sıcak su (60 ºC) eklendikten sonra 6N HCl ile pH 2 olana kadar asitlendirilmiştir. Filtrata daha sonra eşit hacimde hekzan ve 10 mL doymuş tuz çözeltisi ilave edilmiş, 1 saat karıştırıldıktan sonra karışım bir ayırma hunisine aktarılmıştır. Üre ile kompleks oluşturmayan yağ asitlerini içeren hekzan fazı, üreli sulu fazdan ayrılmıştır. Hekzan fazı üre kalmayana kadar birkaç kez su ile yıkanmış ve susuz sodyum sülfat ile kurutulmuştur. Hekzan fazı daha sonra darası belli balona alınmış ve döner buharlaştırıcıda hekzanın tamamen uçurulması sağlanmıştır. Balonda kalan bakiye daha sonra tartılmıştır. Üre ile kompleks yapmayan yağ asitlerini içeren bu fraksiyon çalışmada "Ekstrat" olarak adlandırılmıştır.

Nüçe başlığında kalan kristaller ise içerisinde 100 mL sıcak su (60 ºC) bulunan behere aktarıldıktan sonra, çözelti 6N HCl ile pH 2 olana kadar asitlendirilmiştir. Sıcak asitli ortamda üre-yağ asitleri kompleksinin tamamiyle bozundurulması ve yağ asitlerinin açığa çıkması için karışım yarım saat karıştırılmıştır. Açığa çıkan bu yağ asitleri çözeltiden ekstrat yağ asitlerinin eldesinde açıklanan işlemler uygulanarak geri kazanılmıştır. Üre ile kompleks yapan yağ asitlerini içeren bu fraksiyon çalışmada "Rafinat" olarak adlandırılmıştır.

Ekstrat ve rafinat fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimleri gaz kromatografisi ile Bölüm 3.2.1' de açıklanan yönteme göre belirlenmiştir.

Ekstrat verimi ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (ÇDYA: EPA, DHA, GLA veya ALA) kazanımı aşağıda verilen eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır:

Ekstrat verimi (%) = (E / YA) x 100 **(3.1)**

Burada, E = Ekstrat miktarı, gram; YA = Başlangıç yağ asitleri miktarı, gram' dır.

ÇDYA kazanımı (%) = (C_e / C_b) x 100 **(3.2)**

Burada, C_e = Ekstrattaki çoklu doymamış yağ asitleri miktarı, gram; C_b = Başlangıç yağ asitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitleri miktarı, gram' dır.

3.2.4 Deneysel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi

Bu çalışmada, substratlardan çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleşmiş ürünlerin eldesinde, reaksiyon parametrelerinin (değişkenlerin) ürün bileşimi üzerine olan etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi için deneysel tasarımdan yararlanılmıştır. Bu amaçla Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılmıştır. 3 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak üre fraksiyonlama deneylerinin tasarımı yapılmıştır.

Literatür verilerine göre, yağ asitlerinin üre fraksiyonlama yöntemi ile fraksiyonlanmasında yağ asitleri:üre oranı, çözücü cinsi (etanol, metanol), üre:çözücü oranı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı en önemli değişkenler arasındadır. Optimizasyonun en verimli ve doğru şekilde uygulanabilmesi için değişkenlerin ve değişken etki aralıklarının seçimi son derece önemlidir. Bu seçim yapılırken reaksiyon sistemi dışında, ekonomiklik ve uygulanabilirlik faktörleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Literatürde yapılan çalışmalarda uzun reaksiyon sürelerinde, yüksek üre miktarlarında ve özellikle -18 °C gibi düşük sıcaklıklarda yüksek ürün verimi elde edildiği görülmüştür. Ancak ekonomiklik ve uygulanabilirlik açısından sıcaklık ayarı olan özel bir soğutma sistemine gerek olmadan normal bir soğutucuda (buzdolabında) kısa reaksiyon süresinde çalışmak büyük avantaj sağlayacakdır ve bu yüzden tercih sebebi olmalıdır.

Bu çalışmada yağ asitleri:üre (ağırlık/ağırlık) oranı, üre:çözücü (ağırlık/hacim) oranı ve reaksiyon süresi değişken olarak seçilmiştir. Çözücü olarak etanol (%96'lık) ve çalışma sıcaklığı +4 ºC olarak seçilmiş ve sıcaklık parametre olarak incelenmemiştir.

Seçilen değişkenlerin seviye değerlerinin belirlenmesi için herbir yağ için ayrı ayrı üç seri ön üre fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Herbir seride, 2 parametre sabit tutularak 3. parametrenin farklı değerlerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Deneyler Bölüm 3.2.3 de verilen yönteme göre gerçekleştirilmiş, ekstrat ve rafinat fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimleri Bölüm 3.2.1 de açıklanan gaz kromatografik yönteme göre belirlenmiştir. Yürütülen 3 seri ön üre fraksiyonlama deneyi sonucunda, yağ asidi:üre oranının/üre:etanol oranının/ kristalizasyon süresinin değişimine göre ekstrat ürünlerinin verim ve çoklu doymamış yağ asitleri içeriklerinin değişimi incelenmiştir. Değişim eğrilerinden, herbir parametre için etkin çalışma aralığı yani yüksek verimli ve yüksek polidoymamış yağ asidi içerikli ekstratların elde edilebileceği aralıklar belirlenmiş ve bu aralıkta herbir parametre için 3 seviye değeri (maksimum, optimum ve minimum değerleri) saptanmıştır.

3.2.5 Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu

Reaksiyon koşullarının optimizasyonu Tepki Yüzey Metodolojisine (TYM) göre yapılmıştır. Bu amaçla, herbir substrat için 3 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak 17 üre fraksiyonlama deneyi gerçekleştirilmiştir.Bütün deneyler 2 paralel olacak şekilde yapılmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

Deneysel sonuçlara regresyon analizi, istatiksel olarak önem derecesi analizi uygulanmış, tepki yüzey (Response surface) ve izdüşüm (Contour plot) grafiklerinin çizimi Statistica 7.0 (Stat Soft® Inc.) paket programı kullanılarak yapılmıştır.

3 değişken ve 3 seviye değerli yüzey merkezli deneysel tasarımda elde edilen tepkilerin değerlendirilmesinde aşağıda verilen 2.dereceden polinom eşitliğinden yararlanılmıştır.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum_{i<j=1}^{3} \beta_{ij} X_i X_j \qquad \textbf{(3.3)}$$

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

Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerinin tahminleri ve katsayıları programdan elde edilmiştir. Seçilen bu modelin uygunluğu varyans analizi sonuçları ile değerlendirilmiştir.

Optimum reaksiyon koşulları (Kritik değerler), "yağ asitleri:üre oranı", "üre:etanol oranı" ve "reaksiyon süresi" terimleri kullanılarak, tepki yüzey metodolojisinden tahminlenen bu eşitlik ile elde edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızın giriş bölümünde etraflıca açıklandığı üzere, EPA, DHA, GLA ve ALA insan sağlığı açısından önemli polidoymamış yağ asitleridir. Bu çalışmada, EPA ve DHA kaynağı olarak alabalık yağı, GLA kaynağı olarak çuha çiçeği yağı ve ALA kaynağı olarak keten yağı seçilmiştir. Bu yağlardan üre fraksiyonlama yöntemine göre çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmiş ürünlerin eldesi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu Tepki Yüzey Metodolojisi göre yapılmıştır.

Çalışmamızın birinci bölümünde, alabalık, çuha çiçeği ve keten yağlarından serbest yağ asitleri elde edilmiş ve bunların yağ asitleri bileşimleri belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde, alabalık yağ asitlerinden EPA ve DHA'ca zengin ürünler elde etmek amacıyla, alabalık yağ asitleri etanollü ortamda üre ile fraksiyonlama işlemine tabi tutulmuştur. Tepki Yüzey Metodolojisine göre deney noktalarının tasarımını yapılabilmek amacıyla önce bağımsız değişkenlerin seçimi yapılmış ve her bir değişken için 3 seviye değeri belirlenmiştir. Bu amaçla önce 3 seri ön üre fraksiyonlama deneyi gerçekleştirilmiştir. Yağ asitleri:üre, üre:etanol oranı ve kristalizasyon süresinin bağımsız değişkenler olarak seçildiği bu reaksiyonlarda, seçilen bağımsız değişkenlerin yüksek yüzdede çoklu doymamış yağ asitlerini içeren ekstratları yüksek verimle eldesine olanak sağlayan etkin çalışma aralıkları bulunmuş ve bu aralıklarda herbiri için 3 seviye değeri (+1,0,-1 değerleri) tespit edilmiştir. Daha sonra, bağımsız değişkenler için belirlenmiş 9 seviye değeri kullanılarak, 3 değişken ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun 17 üre fraksiyonlama deneyi gerçekleştirilmiştir. Deneylerin sonunda elde edilen veriler Statistica 7.0 programı kullanılarak değerlendirilmiş, alabalık yağından çoklu doymamış yağ asitlerince konsantre ürünler eldesi koşulları optimize edilmiştir.

Çalışmanın üçüncü ve dördüncü bölümünde sırasıyla çuha çiçeği yağından GLA'ca ve keten yağından ALA'ca zenginleştirilmiş ürünlerin eldesi ve optimizasyonu üzerinde yukarda alabalık yağı için açıklanan benzer çalışmalar yürütülmüştür.

Aşağıdaki bu bölümlerde yürütülen çalışmalara ait veriler ve sonuçlar açıklanmıştır.

4.1 Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri

Çalışmada kullanılan alabalık, çuha çiçeği ve keten yağlarının yağ asitleri bileşimleri Bölüm 3.2.1'de verilen koşullara göre Gaz Kromatografisi ile belirlenmiştir. Alabalık yağının yağ asitleri bileşimi Çizelge 4.1'de ve çuha çiçeği ile keten yağlarının yağ asitleri bileşimleri ise Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1: Alabalık yağı yağ asitleri bileşimi

Yağ Asidi	Bileşim (%)
14:0	7,6
16:1	10,5
16:0	21,2
18:3	2,2
18:2	3,8
18:1	17,4
18:0	4,1
20:5 (EPA)	**11,1**
20:4	0,8
20:1	1,7
20:0	0,6
22:6 (DHA)	**15,9**
22:5	1,0
22:1	1,9
22:0	0,2
Doymuş YA	33,7
TDYA ve İDYA	35,3
EPA+DHA	27,0
ÇDYA	31,0

YA: Yağ asitleri; TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri (16:1, 18:1, 20:1 ve 22:1); İDYA: İkili doymamış yağ asitleri (18:2); ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri (18:3, 20:5, 20:4, 22:6 ve 22:4).

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi, alabalık yağı yağ asitlerinde %27 oranında EPA ve DHA bulunmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin toplamı ise %31 'dir.

Çizelge 4.2: Çuha çiçeği ve keten yağlarının yağ asitleri bileşimleri

Yağ asidi	Bileşim (%)	
	Çuha çiçeği yağı	**Keten yağı**
16:0	6,1	5,1
18:3 (ALA)	-	**50,6**
18:3 (GLA)	**10,4**	-
18:2	71,0	15,0
18:1	9,7	25,1
18:0	2,2	3,8
20:1	0,3	0,3
20:0	0,3	0,2

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi, keten yağı yağ asitleri % 50,6 ALA ve çuha çiçeği yağı ise % 10,4 GLA içermektedir.

4.2 Alabalık Yağı Yağ Asitlerinden Çoklu Doymamış Yağ Asitlerince Zengin Ürünler Eldesinin Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Optimizasyonu

4.2.1 Alabalık yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'nde kullanılacak değişken seviye değerlerinin belirlenmesi

Alabalık yağı yağ asitlerinden çoklu doymamış yağ asitlerince (EPA, DHA, 18:3, 20:4 ve 22:5 asitlerince) zengin ürünlerin Tepki Yüzey Metodolojisine göre eldesi ve optimizasyonu için üre fraksiyonlama deneylerinin tasarımında, seçilen bağımsız değişkenlerin (yağ asitleri:üre oranı, üre:etanol oranı ve reaksiyon süresinin) öncelikle seviye değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla önce üre:etanol oranının seviye değerlerinin tespiti için bir seri üre fraksiyonlama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, yağ asitleri:üre (ağırlık/ağırlık) oranı 1:3 olarak sabit tutulmuş ve üre:etanol (ağırlık/hacim) oranları 1:5, 1:7, 1:8 ve 1:10 olacak şekilde değiştirilmiştir. Reaksiyonlar +4 ºC sıcaklıkta 6 saat yurütülmüştür. Süre

sonunda elde edilen ekstrat ve rafinat fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimleri belirlenmiştir. Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de ekstrat ve rafinat fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi gösterilmiştir.

Çizelge 4.3: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ./ağ.) oranı, 1:3; süre 8 saat)

Yağ asidi	**Bileşim (%)**			
	Üre:Etanol 1:5 (g/mL)	**Üre:Etanol 1:7 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:8 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:10 (g/mL)**
14:0	0,8	0,9	1,0	1,1
16:1	2,3	3,0	4,6	6,7
16:0	1,9	1,9	1,8	2,0
18:3	5,5	5,5	5,4	5,7
18:2	1,0	1,4	1,9	2,2
18:1	4,4	4,5	5,4	6,3
18:0	0,4	0,5	0,4	0,5
20:5	27,3	26,8	26,8	26,1
20:4	1,2	1,5	1,6	1,8
20:1	0,8	0,8	0,8	0,9
22:6	51,3	49,7	46,8	42,8
22:5	1,1	1,4	1,5	2,0
22:1	2,0	2,1	2,0	1,9
Doymuş YA	3,1	3,3	3,2	3,6
TDYA+İDYA	10,5	11,8	14,7	18,0
ÇDYA	86,4	84,9	82,1	78,4

YA: Yağ asitleri; TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri; İDYA: İkili doymamış yağ asitleri; ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri

Çizelge 4.4: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3; süre 8 saat)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	Üre:Etanol 1:5 (g/mL)	**Üre:Etanol 1:7 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:8 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:10 (g/mL)**
14:0	10,0	10,1	10,3	10,8
16:1	13,3	13,3	12,8	12,2
16:0	27,9	28,1	28,8	30,6
18:3	1,0	1,0	0,8	0,4
18:2	4,8	4,7	4,6	4,6
18:1	21,9	22,1	22,2	22,7
18:0	5,4	5,5	5,6	5,9
20:5	5,5	5,3	4,9	3,7
20:4	0,7	0,6	0,6	0,3
20:1	2,0	2,0	2,1	2,1
20:0	0,8	0,9	0,9	0,9
22:6	3,6	3,4	3,4	3,1
22:5	1,0	0,9	0,9	0,6
22:1	1,8	1,8	1,8	1,8
22:0	0,3	0,3	0,3	0,3
Doymuş YA	44,4	44,9	45,9	48,5
TDYA+İDYA	43,8	43,9	43,5	43,4
ÇDYA	11,8	11,2	10,6	8,1

YA: Yağ asitleri; TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri; İDYA: İkili doymamış yağ asitleri; ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri

Çizelge 4.3'de görülen üre fraksiyonlama yöntemine göre elde edilmiş ekstratların yağ asitleri bileşimleri Çizelge 4.1 de verilen alabalık yağ asitleri bileşimi ile karşılaştırıldığında, genel olarak ekstratlarda doymuş yağ asitleri ile tek ve iki çift bağ içeren yağ asitlerinin önemli derecede azalmış olduğu gözlenmektedir. Orijinal

yağda % 31 oranında bulunan ÇDYA, fraksiyonlama sonucu etanol miktarına bağlı olarak % 86-78 gibi yüksek değerlere ulaşmıştır. Ancak ortamda bulunan etanol miktarının artışı ile ekstrattaki doymuş yağ asitleri yüzdeleri pratik olarak değişmezken tek ve iki çift bağ içeren yağ asitlerinde artış olmaktadır. Dolayısiyle ekstratların çoklu doymamış yağ asitleri içerikleri düşmektedir.

Çizelge 4.4 'den görüldüğü üzere, beklenildiği gibi rafinat fraksiyonları doymuş, tek ve iki çift bağ içeren yağ asitlerince zengindir. Üre:etanol oranı 1:5 den 1:10 yükseltilmesiyle üre ile kompleks oluşturan çoklu doymamış yağ asitleri % 11,8 den % 8,1 e düşmektedir. Ortamdaki etanol miktarının artması rafinat fraksiyonunda çoklu doymamış yağ asitlerin azalması sağlanmaktadır.

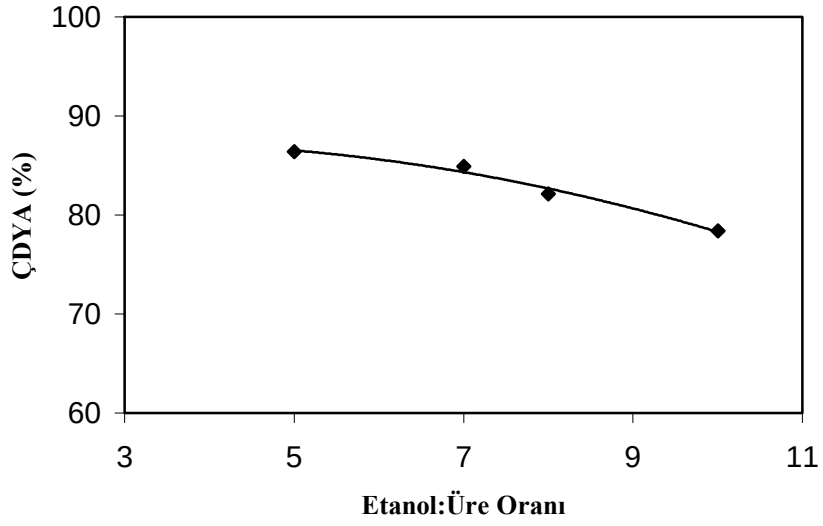
Üre:etanol oranında 3 seviye değerini belirlemek için ekstrat verimleri ve ekstratlardan EPA, DHA ve ÇDYA'nin kazanımları da incelenmeye alınmıştır. Çizelge 4.5'de ekstrat verimleri, ekstratların çoklu doymamış yağ içerikleri ve çoklu doymamış yağ asitlerinin kazanım yüzdeleri görülmektedir.

Çizelge 4.5: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, EPA, DHA ve ÇDYA içerikleri ile kazanımlarının üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3; süre 8 saat)

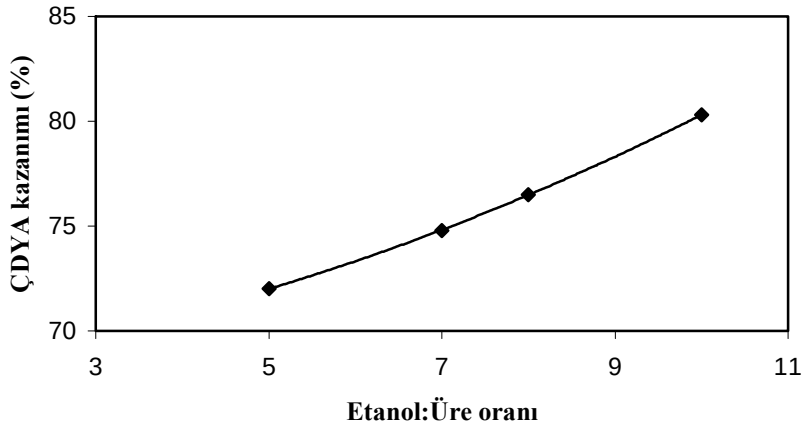
Ekstrat özellikleri	**Üre:Etanol 1:5 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:7 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:8 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:10 (g/mL)**
Miktar (gram)	1,033	1,092	1,155	1,270
Ekstrat verimi (%)	25,8	27,3	28,9	31,8
EPA (%)	27,3	26,8	26,8	26,1
EPA kazanımı (%)	63,5	65,9	69,7	74,7
DHA (%)	51,3	49,7	46,8	42,8
DHA kazanımı (%)	83,3	85,3	85,0	85,5
ÇDYA (%)	86,4	84,9	82,1	78,4
ÇDYA kazanımı (%)	72,0	74,8	76,5	80,3

Hayes ve arkadaşları düşük erusik asitli kanola yağından doymamış yağ asitlerinin eldesi üzerinde yürüttükleri çalışmada [103], etanol miktarının artması ile daha az üre komplekslerinin oluştuğunu gözlemişlerdir. Araştırıcılara göre, çözücü miktarı ürenin çözücü ve katı kompleks fazlar arasındaki partitisyonunu etkilemektedir.

Çözücü miktarının artması katı fazdaki üre miktarını düşürmektedir. Dolayısiyle çözücüde daha fazla üre çözünür hale gelmektedir. Bunun sonucu daha fazla üre ve yağ asitleri ekstratta kalmaktadır. Benzer sonuçlar çalışmamızda da gözlenmiştir. Çizelge 4.5 'de ortamdaki etanol miktarının artmasıyla ekstrat miktarının arttığı görülmektedir. Ekstratlarda EPA ve DHA kazanım yüzdesinin artışı ekstratlarda daha fazla miktarda EPA ve DHA bulunduğunu göstermektedir. Ancak Çizelge 4.3'den açıkça görüldüğü gibi, yüksek üre:etanol oranlarında (1:8 ve 1:10) ekstratların 16:1 ve 18:1 asit içeriklerindeki büyük artışlar ekstratların DHA ve ÇDYA içeriklerinin düşmesine neden olmaktadır. Üre:etanol oranı için seviye değerlerinin seçiminde amaç, mümkün olduğu kadar yüksek ÇDYA içerikli ve aynı zamanda yüksek ÇDYA kazanımlı ekstratlar elde edebilmektir. ÇDYA yüzdesinin ve kazanımının üre:etanol oranına göre değişimini daha açık bir şekilde görebilmek için, Çizelge 4.5'deki değerler kullanılarak Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 oluşturulmuştur.



Şekil 4.1: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ÇDYA içeriklerinin etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3; süre 8 saat)



Şekil 4.2: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ÇDYA kazanımlarının etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3; süre 8 saat)

Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 de görülen değişim eğrilerinden üre:etanol oranına için deneysel tasarımda kullanılacak seviye değerleri (kodları) belirlenmiştir. Deneysel tasarımda, üre:etanol oranları için minimum, optimum ve maksimum değerler 1:5, 1:7 ve 1:9 olarak seçilmiştir. Bu oran değerleri -1, 0 ve +1 değişken seviyelerine karşılık gelmektedir.

Üre:etanol oranı için kodlanan değişken seviyelerinin tespitinden sonra, yağ asitleri:üre (ağırlık/ağırlık) oranının seviye değerlerini belirlemek amacı ile ikinci seri ön fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Bu deneylerde, üre:etanol oranı 1:7 alınmıştır. Sekiz saatlik sürede yağ asitleri:üre oranları 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 olarak değiştirilmiştir. Elde edilen ekstratların ve rafinatların gaz kromatografisi ile yağ asitleri bileşimleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.6: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol oranı, 1:7; süre 8 saat)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	YA:Üre 1:2 (g/g)	**YA:Üre 1:3 (g/g)**	**YA:Üre 1:4 (g/g)**	**YA:Üre 1:5 (g/g)**
14:0	1,4	0,9	0,8	0,7
16:1	10,3	3,0	2,2	2,0
16:0	2,3	1,9	1,8	1,8
18:3	4,9	5,5	5,5	5,2
18:2	3,7	1,4	1,3	1,3
18:1	7,6	4,5	3,9	3,8
18:0	0,3	0,5	0,4	0,4
20:5	24,2	26,8	25,8	25,1
20:4	1,8	1,5	1,4	1,4
20:1	1,0	0,8	0,8	0,7
22:6	38,6	49,7	52,5	54,0
22:5	2,2	1,4	1,4	1,4
22:1	1,7	2,1	2,2	2,2
Doymuş YA	4,0	3,3	3,0	2,9
TDYA+İDYA	24,3	11,8	10,4	10,0
ÇDYA	71,7	84,9	86,5	87,1

YA: Yağ asitleri; TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri; İDYA: İkili doymamış yağ asitleri; ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri

Çizelge 4.6'dan, yağ asitleri:üre oranının 1:2 den 1:3 'e yükseltilmesinin ekstratların yağ asitleri bileşimine olan etkisinin büyük olduğu anlaşılmaktadır. Tek ve iki çift bağ içeren yağ asitlerinin yüzdesi yarı yarıya düşmüş, çoklu doymamış yağ asitlerinin yüzdesi ise 72'den 85'e yükselmiştir. YA:üre oranının 1:4 ve 1:5 'e arttırılması ise ekstratların ÇDYA içeriklerinde sırasıyla %1,5 ve % 2 artış sağlamıştır.

Çizelge 4.7: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol oranı, 1:7; süre 8 saat)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	YA:Üre 1:2 (g/g)	**YA:Üre 1:3 (g/g)**	**YA:Üre 1:4 (g/g)**	**YA:Üre 1:5 (g/g)**
14:0	11,1	10,1	9,8	9,7
16:1	10,6	13,3	13,3	13,2
16:0	31,9	28,1	27,8	27,3
18:3	0,6	1,0	1,1	1,2
18:2	3,9	4,7	4,6	4,6
18:1	23,1	22,1	22,0	21,6
18:0	6,3	5,5	5,3	5,3
20:5	3,6	5,3	6,3	6,7
20:4	0,3	0,6	0,6	0,7
20:1	2,1	2,0	2,0	2,0
20:0	1,0	0,9	0,8	0,8
22:6	3,0	3,4	3,8	3,9
22:5	0,4	0,9	0,9	1,0
22:1	1,8	1,8	1,7	1,7
22:0	0,3	0,3	0,3	0,3
Doymuş YA	50,6	44,9	43,7	43,4
TDYA+İDYA	41,5	43,9	43,6	43,1
ÇDYA	7,9	11,2	12,7	13,5

YA: Yağ asitleri; TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri; İDYA: İkili doymamış yağ asitleri; ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri

Rafinatların yağ asitleri bileşimleri incelendiğinde, ortamda üre miktarının artmasıyla doymuş ve tek ve iki çift bağ içeren yağ asitlerine göre zor kompleks oluşturan EPA ve DHA'nın üre komplekslerindeki yüzdesinin artmaya başladığı gözlenmektedir (Çizelge 4.7). YA:üre oranının 1:5 olduğu koşullarda rafinatta %13,5 ÇDYA bulunmaktadır. Ürenin artışı bu asitlerin kaybını da yükseltmektedir.

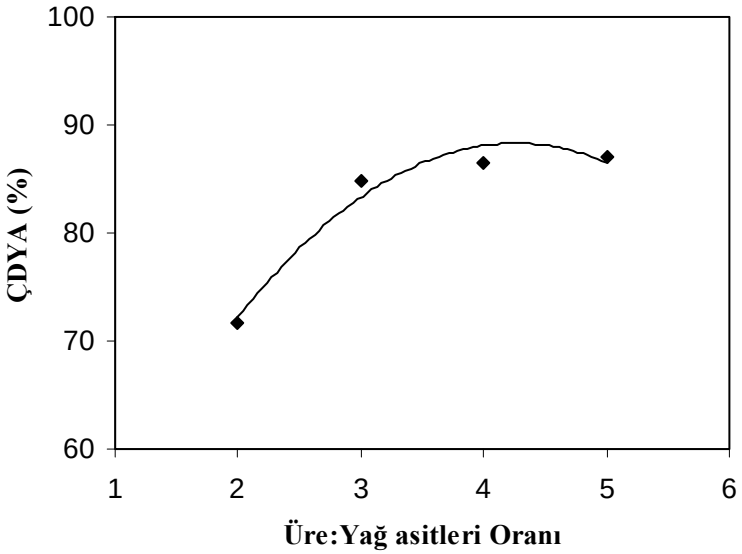
Yağ asitleri:üre oranında 3 seviye değerini belirlemek için yine ekstrat verimleri ve ekstratların EPA, DHA ve ÇDYA içerikleri ile kazanımları incelenmeye alınmıştır. Çizelge 4.8'de ekstrat verimleri, ekstratların EPA, DHA ve ÇDYA içerikleri ve bu yağ asitlerinin kazanım yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.8: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, EPA, DHA ve ÇDYA içerikleri ile kazanımlarının yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol oranı, 1:7; süre 8 saat)

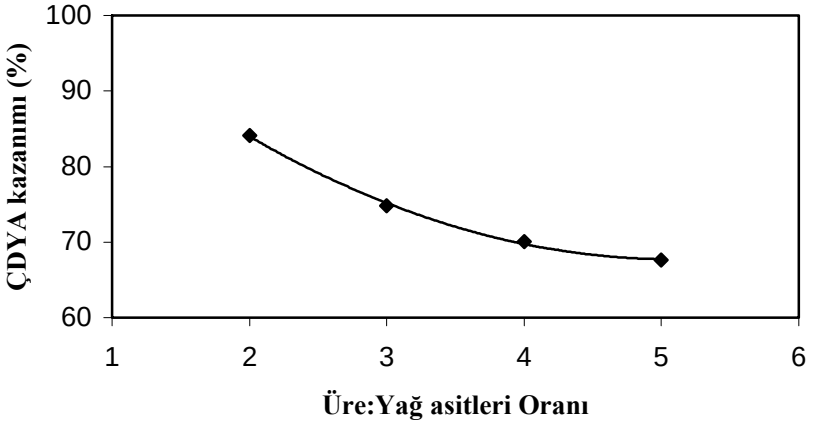
Ekstrat özellikleri	**YA:Üre 1:2 (g/g)**	**YA:Üre 1:3 (g/g)**	**YA:Üre 1:4 (g/g)**	**YA:Üre 1:5 (g/g)**
Miktar (gram)	1,455	1,092	1,005	0,963
Ekstrat verimi (%)	36,4	27,3	25,1	24,1
EPA (%)	24,2	26,8	25,8	25,1
EPA kazanımı	79,3	65,9	58,4	54,4
DHA (%)	38,6	49,7	52,5	54,0
DHA kazanımı (%)	88,3	85,3	83,0	81,8
ÇDYA (%)	71,7	84,9	86,5	87,1
ÇDYA kazanımı (%)	84,1	74,8	70,1	67,6

Üre komplekslerinin oluşumunda yağ asitleri:üre oranının 1:2 'den 1:3'e yükseltilmesi ekstrat miktarında önemli düşmeye neden olmuştur. Kompleks yapabilen yağ asitlerinin ortamdan ayrılması ile ekstraktın EPA içeriği çok az değişmesine karşılık DHA içeriği % 50 'e ulaşmıştır. ÇDYA miktarı %85 değerine yükselmiştir. YA:üre oranının 1:4 ve 1:5 olması hem ekstrat veriminde hemde bu asitlerin zenginleşmesinde çok etkili olmamıştır.

Ekstratların mümkün olduğu kadar yüksek verimli ve yüksek ÇDYA içerikli olması için YA:üre oranı seviye değerlerini doğru seçmek amacıyla, Çizelge 4.8'deki ÇDYA içerik ve kazanım değerlerinin YA:üre oranı ile değişim eğrileri çizilmiş ve Şekil 4.3 ve 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ÇDYA içeriklerinin üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; üre:etanol oranı, 1:7; süre 8 saat)



Şekil 4.4: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ÇDYA kazanımlarının üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; üre:etanol oranı, 1:7; süre 8 saat)

Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'den üre:yağ asitleri oranı 4'den sonra ekstratların ÇDYA içerik ve kazanımında pratik olarak değişim olmadığı görülmektedir. Bu sonuçlara göre, deneysel tasarımdaki -1, 0 ve 1 kodlarına karşılık gelen yağ asitleri:üre oranı seviye değerleri 1:2, 1:3 ve 1:4 olarak belirlenmiştir.

Son olarak bağımsız değişkenlerden reaksiyon süresi için değişken seviye değerlerini belirlemek amacı ile üçüncü seri ön üre fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Bu deneylerde, 4º C sıcaklıkta, alabalık yağ asitleri:üre oranı 1:3 ve üre:etanol oranı 1:7 olacak şekilde hazırlanmış karışımlar kullanılmış ve kristalizasyon zamanı 2, 5, 8 ve 16 saat olarak seçilmiştir. Ekstrat ve rafinat ürünleri elde edildikten sonra, bu ürünlerin fraksiyonlama deneyleri sonucunda gaz kromatografisi ile tespit edilen ekstrat ve rafinatlara ait yağ asidi bileşimleri Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.9: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3; üre:etanol oranı, 1:7)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	2 saat	**5 saat**	**8 saat**	**16 saat**
14:0	1,0	0,9	0,9	0,8
16:1	3,1	3,1	3,0	2,6
16:0	2,1	1,9	1,9	1,8
18:3	5,4	5,5	5,5	5,2
18:2	1,4	1,5	1,4	1,3
18:1	4,5	4,4	4,5	3,8
18:0	0,4	0,5	0,5	0,5
20:5	27,0	26,9	26,8	26,6
20:4	1,4	1,5	1,5	1,5
20:1	0,8	0,8	0,8	0,8
22:6	49,2	49,5	49,7	51,7
22:5	1,6	1,5	1,4	1,3
22:1	2,1	2,1	2,1	2,1
Doymuş YA	3,5	3,3	3,3	3,1
TDYA+İDYA	11,9	11,9	11,8	10,6
ÇDYA	84,6	84,8	84,9	86,3

YA: Yağ asitleri; TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri; İDYA: İkili doymamış yağ asitleri; ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri

Çizelge 4.10: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3; üre:etanol oranı, 1:7)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	2 saat	**5 saat**	**8 saat**	**16 saat**
14:0	10,1	10,0	10,1	9,9
16:1	13,2	13,3	13,3	13,2
16:0	28,7	28,5	28,1	27,9
18:3	0,9	0,9	1,0	1,1
18:2	4,6	4,7	4,7	4,7
18:1	22,4	22,3	22,1	22,0
18:0	5,4	5,5	5,5	5,4
20:5	5,0	5,1	5,3	5,7
20:4	0,5	0,6	0,6	0,6
20:1	2,1	2,0	2,0	2,0
20:0	0,8	0,9	0,9	0,8
22:6	3,2	3,2	3,4	3,7
22:5	0,9	0,9	0,9	1,0
22:1	1,9	1,8	1,8	1,8
22:0	0,2	0,3	0,3	0,3
Doymuş YA	45,2	45,2	44,9	44,3
TDYA+İDYA	44,2	44,1	43,9	43,7
ÇDYA	10,6	10,7	11,2	12,0

YA: Yağ asitleri; TDYA: Tekli doymamış yağ asitleri; İDYA: İkili doymamış yağ asitleri; ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri

Çizelge 4.9 ve 4.10'un incelenmesiyle, zamanın ekstrat ve rafinat yağ asitleri bileşimlerine olan etkisinin az olduğu görülmektedir. Kristalizasyon zamanının 8 saatten 16 saate çıkarılması ekstrat ÇDYA içeriğini ancak %1,4 arttırmıştır. Rafinat bileşimlerinden de üre ile kompleks yapan ÇDYA miktarlarının zamanla çok az arttığı anlaşılmaktadır.

Kristalizasyon zamanı için 3 seviye değerini belirlemek amacı ile yine ekstrat verimleri ve ekstratların EPA, DHA ve ÇDYA içerikleri ile kazanımları incelenmiştir. Çizelge 4.11'de ekstrat verimleri, ekstratların EPA, DHA ve ÇDYA içerikleri ve bu yağ asitlerinin kazanım yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.11: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, EPA, DHA ve ÇDYA içerikleri ile kazanımlarının zaman ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3, üre:etanol oranı, 1:7)

Ekstrat özellikleri	**2 saat**	**5 saat**	**8 saat**	**16 saat**
Miktar (gram)	1,105	1,099	1,092	1,033
Ekstrat verimi (%)	27,6	27,5	27,3	25,8
EPA (%)	27,0	26,9	26,8	26,6
EPA kazanımı	67,2	66,6	65,9	61,9
DHA (%)	49,2	49,5	49,7	51,7
DHA kazanımı (%)	85,5	85,5	85,3	84,0
ÇDYA (%)	84,6	84,8	84,9	86,3
ÇDYA kazanımı (%)	75,4	75,2	74,8	71,9

Çizelge 4.11'den zamanın EPA, DHA ve ÇDYA zenginleşmesi ve kazanım değerlerine etkisinin az olduğu anlaşılmaktadır. 2 saatte ÇDYA yüzdesi 84,6 iken 16 saat sonunda bu asitlerin içeriği % 86,3 yükselmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda, yüzey merkezli küp tasarımında kullanılacak, +1, 0 ve -1 kodlarına karşılık gelecek reaksiyon süresi seviye değerleri 1 , 8 ve 15 saat olarak belirlenmiştir.

4.2.2 Alabalık yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'ne göre uygulanan deneysel tasarım ve reaksiyon parametrelerinin optimizasyonu

Alabalık yağından ÇDYA'ce zenginleşmiş ürünlerin üre fraksiyonlama yöntemine göre eldesinde, yağ asitleri:üre oranı, üre:etanol oranı ve zaman parametrelerinin etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesinde Tepki Yüzey Metodolojisi uygulanmıştır. Bu çalışmada, 3 değişkenli, 3 seviyeli ve 17 özel tasarım noktası içeren Merkezi Bileşik Yüzey Merkezli Küp Tasarımı esasları temel alınarak alınmıştır. Deneylerin tasarımında seçilen bağımsız değişkenler ve bu değişkenlerin

Bölüm 4.2.1'de belirlenen seviye değerleri Çizelge 4.12'de verilmiştir. Yüzey merkezli küp tasarımına göre belirlenen 3 değişkenli ve 3 seviye değerli deney tasarımını noktaları, kodları ve değerleri Çizelge 4.13'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'nin eldesinde, yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviyeler

Bağımsız Değişkenler	**Kodlanan Değişken seviyeleri**		
	-1	0	+1
Yağ asitleri:Üre oranı (ağırlık/ağırlık)	1:2	1:3	1:4
Üre:Etanol oranı (ağırlık/hacim)	1:5	1:7	1:9
Zaman (saat)	1	8	15

Çizelge 4.13: Yüzey merkezli küp deney tasarımında belirlenen deney tasarım noktaları

Deney No	**Üre:YA oranı (ağ./ağ.)**		**Etanol:Üre oranı (h/ağ.)**		**Zaman (saat)**	
	Kod	**Değer**	**Kod**	**Değer**	**Kod**	**Değer**
1	-1	2	-1	5	-1	1
2	-1	2	-1	5	+1	15
3	-1	2	+1	9	-1	1
4	-1	2	+1	9	+1	15
5	+1	4	-1	5	-1	1
6	+1	4	-1	5	+1	15
7	+1	4	+1	9	-1	1
8	+1	4	+1	9	+1	15
9	-1	2	0	7	0	8
10	+1	4	0	7	0	8
11	0	3	-1	5	0	8
12	0	3	+1	9	0	8
13	0	3	0	7	-1	1
14	0	3	0	7	+1	15
15	0	3	0	7	0	8
16	0	3	0	7	0	8
17	0	3	0	7	0	8

Çizelge 4.13'de belirlenen koşullarda yürütülen 17 üre fraksiyonlama deneyi sonucunda alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ürünlerinin gaz kromotografisi ile belirlenen yağ asitleri bileşimleri Çizelge 4.14-4.17 de gruplar halinde verilmiştir.

Çizelge 4.14: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:YA oranı, 2:1) (Deney No: 1-4 sonuçları)

	Yağ asitleri bileşimi (%)							
	Etanol:Üre oranı, 5:1				**Etanol:Üre oranı, 9:1**			
	1 saat		**15 saat**		**1 saat**		**15 saat**	
YA	**E1**	**R1**	**E2**	**R2**	**E3**	**R3**	**E4**	**R4**
14:0	1,0	11,2	0,6	11,1	2,1	12,0	2,0	11,4
16:1	10,1	10,8	8,8	11,3	13,4	8,3	12,2	9,3
16:0	1,9	31,7	1,6	30,9	2,4	35,0	2,3	34,3
18:3	4,9	0,6	4,9	0,8	4,6	0,3	4,6	0,5
18:2	3,8	3,8	3,8	3,8	3,5	4,0	3,5	3,6
18:1	5,5	23,8	5,3	23,3	11,8	21,6	11,4	21,5
18:0	0,4	6,1	0,3	6,0	0,4	6,9	0,3	6,7
20:5	25,6	3,2	26,2	3,7	22,5	2,5	23,1	2,9
20:4	1,9	0,2	1,8	0,3	1,6	0,2	1,6	0,3
20:1	1,0	2,0	1,0	2,0	0,9	2,3	0,9	2,3
20:0	-	1,0	-	0,9	-	1,1	-	1,1
22:6	39,9	2,9	41,8	3,2	33,4	2,9	34,6	3,2
22:5	2,3	0,4	2,2	0,5	1,9	0,4	2,0	0,4
22:1	1,7	1,9	1,7	1,9	1,5	2,1	1,5	2,1
20:0	-	0,4	-	0,3	-	0,4	-	0,4
ÇDYA	74,6	7,3	76,9	8,5	64,0	6,3	65,9	7,3

E**:**Ekstrat, R: Rafinat

Çizelge 4.15: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:YA oranı, 4:1) (Deney No: 5-8 sonuçları)

	Yağ asitleri bileşimi (%)							
	Etanol:Üre oranı, 5:1				**Etanol:Üre oranı, 9:1**			
	1 saat		**15 saat**		**1 saat**		**15 saat**	
YA	**E5**	**R5**	**E6**	**R6**	**E7**	**R7**	**E8**	**R8**
14:0	0,8	9,8	0,8	9,7	0,8	10,4	0,7	10,1
16:1	2,3	13,2	2,2	13,0	5,0	12,8	4,2	12,9
16:0	1,8	27,6	1,7	27,1	1,7	29,0	1,7	28,5
18:3	5,4	1,1	5,5	1,1	5,3	0,9	5,3	1,0
18:2	0,9	4,8	0,9	4,7	1,5	4,8	1,3	4,7
18:1	4,1	21,8	4,0	21,5	5,5	22,1	5,1	22,0
18:0	0,3	5,4	0,3	5,3	0,4	5,6	0,4	5,4
20:5	26,6	5,9	25,3	6,7	27,4	4,4	27,6	4,9
20:4	1,2	0,7	1,2	0,7	1,5	0,6	1,4	0,6
20:1	0,8	2,0	0,8	2,0	0,8	2,0	0,7	2,2
20:0	-	0,8	-	0,8	-	0,9	-	0,9
22:6	52,7	3,7	54,2	4,2	46,5	3,5	48,1	3,9
22:5	1,0	1,1	1,0	1,1	1,6	0,8	1,6	0,9
22:1	2,1	1,9	2,1	1,8	2,0	1,9	1,9	1,8
20:0	-	0,2	-	0,3	-	0,3	-	0,2
ÇDYA	86,9	12,5	87,2	13,8	82,3	10,2	84,0	11,3

E**:**Ekstrat, R: Rafinat

Çizelge 4.16: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Zaman, 8 saat) (Deney No: 9-12 sonuçları)

	Yağ asitleri bileşimi (%)							
	Etanol:Üre, 7:1				**Etanol:Üre, 5:1**		**Etanol:Üre, 9:1**	
	Üre:YA, 2:1		**Üre:YA, 4:1**		**Üre:YA, 3:1**		**Üre:YA, 3:1**	
YA	**E9**	**R9**	**E10**	**R10**	**E11**	**R11**	**E12**	**R12**
14:0	1,4	11,1	0,8	9,8	0,8	10,0	1,0	10,4
16:1	10,3	10,6	2,2	13,3	2,3	13,4	6,0	12,5
16:0	2,3	31,9	1,8	27,7	1,9	27,9	1,8	29,5
18:3	4,9	0,6	5,4	1,1	5,5	1,0	5,6	0,7
18:2	3,7	3,9	1,3	4,6	1,0	4,8	2,0	4,6
18:1	7,6	23,0	3,9	21,9	4,4	21,8	6,1	22,3
18:0	0,3	6,1	0,4	5,3	0,4	5,4	0,5	5,7
20:5	24,2	3,6	25,8	6,2	27,3	5,5	26,4	4,4
20:4	1,8	0,3	1,4	0,6	1,2	0,7	1,6	0,5
20:1	1,0	2,1	0,9	2,0	0,8	2,0	0,8	2,1
20:0	-	1,0	-	0,8	-	0,8	-	0,9
22:6	38,6	3,0	52,5	3,8	51,3	3,6	44,5	3,5
22:5	2,2	0,4	1,4	0,9	1,1	1,0	1,7	0,8
22:1	1,7	2,0	2,2	1,7	2,0	1,8	2,0	1,9
20:0	-	0,4	-	0,3	-	0,3	-	0,2
ÇDYA	71,7	7,9	86,5	12,6	86,4	11,8	79,8	9,9

E**:**Ekstrat, R: Rafinat

Çizelge 4.17: Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:YA oranı, 3:1; Etanol:Üre oranı, 7:1) (Deney No: 13-17 sonuçları)

	Yağ asitleri Bileşimi (%)					
	1 saat		**8 saat**		**15 saat**	
YA	**E13**	**R13**	**E15/16/17**	**R15/16/17**	**E14**	**R14**
14:0	0,9	10,1	0,9	10,1	0,8	10,0
16:1	3,1	13,4	3,0	13,3	2,7	13,2
16:0	1,9	28,5	1,9	28,2	1,7	28,0
18:3	5,4	0,9	5,5	1,0	5,4	1,0
18:2	1,4	4,6	1,4	4,7	1,3	4,7
18:1	4,4	22,5	4,5	22,2	3,9	22,1
18:0	0,5	5,5	0,5	5,5	0,5	5,3
20:5	27,2	4,9	26,8	5,3	26,6	5,6
20:4	1,5	0,6	1,5	0,6	1,4	0,6
20:1	0,8	2,0	0,8	2,0	0,8	2,1
20:0	-	0,9	-	0,9	-	0,8
22:6	49,4	3,1	49,7	3,4	51,5	3,5
22:5	1,4	0,9	1,4	0,9	1,3	1,0
22:1	2,1	1,8	2,1	1,8	2,1	1,9
20:0	-	0,3	-	0,3	-	0,2
ÇDYA	84,9	10,4	84,9	11,2	86,2	12,2

E: Ekstrat, R: Rafinat

Tepki Yüzey Metodolojisi esaslarına göre yürütülmüş deneylerde elde edilen ekstratlara ait %EPA, %DHA ve %ÇDYA değerleri tepki değerleri olarak Çizelge 4.18'de gösterilmiştir. Aynı koşullarda elde edilen rafinatlara ait tepki değerleri (%EPA, %DHA ve %ÇDYA) ise Çizelge 4.19 da verilmiştir.

Çizelge 4.18: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda ekstratlardan elde edilen tepki değerleri

Deney No	Değişken seviyeleri			Tepki değerleri		
	Üre:YA[a] (X_1)	Etanol:Üre[b] (X_2)	Zaman[c] (X_3)	ÇDYA (Y_1, %)	DHA (Y_2, %)	EPA (Y_3, %)
1	2	5	1	74,6	39,9	25,6
2	2	5	15	76,9	41,8	26,2
3	2	9	1	64,0	33,4	22,5
4	2	9	15	65,9	34,6	23,1
5	4	5	1	86,9	52,7	26,6
6	4	5	15	87,2	54,2	25,3
7	4	9	1	82,3	46,5	27,4
8	4	9	15	84,0	48,1	27,6
9	2	7	8	71,7	38,6	24,2
10	4	7	8	86,5	52,5	25,8
11	3	5	8	86,4	51,3	27,3
12	3	9	8	79,8	44,5	26,4
13	3	7	1	84,9	49,4	27,2
14	3	7	15	86,2	51,5	26,6
15	3	7	8	85,1	49,9	26,8
16	3	7	8	84,7	49,6	26,6
17	3	7	8	84,9	49,7	26,9

[a] Üre:Yağ asitleri oranı, ağırlık/ağırlık; [b] Etanol:üre oranı, hacim/ağırlık;
[c] Zaman, saat

Çizelge 4.19: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda rafinatlardan elde edilen tepki değerleri

Deney No	Değişken seviyeleri			Tepki değerleri		
	Üre:YA[a] (X_1)	Etanol:Üre[b] (X_2)	Zaman[c] (X_3)	ÇDYA (Y_4, %)	DHA (Y_5, %)	EPA (Y_6, %)
1	2	5	1	7,3	2,9	3,2
2	2	5	15	8,5	3,2	3,7
3	2	9	1	6,3	2,9	2,5
4	2	9	15	7,3	3,2	2,9
5	4	5	1	12,5	3,7	5,9
6	4	5	15	13,8	4,2	6,7
7	4	9	1	10,2	3,5	4,4
8	4	9	15	11,3	3,9	4,9
9	2	7	8	7,9	3,0	3,6
10	4	7	8	12,6	3,8	6,2
11	3	5	8	11,8	3,6	5,5
12	3	9	8	9,9	3,5	4,4
13	3	7	1	10,4	3,1	4,9
14	3	7	15	12,2	3,5	5,6
15	3	7	8	11,5	3,2	5,6
16	3	7	8	11,1	3,3	5,4
17	3	7	8	11,2	3,4	5,3

[a] Üre:Yağ asitleri oranı, ağırlık/ağırlık; [b] Etanol:üre oranı, hacim/ağırlık;
[c] Zaman, saat

4.2.3 Farklı reaksiyon koşullarının alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'ince zengin ürün eldesi üzerindeki etkilerinin istatiksel açıdan değerlendirilmesi

Çizelge 4.19' da verilen yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda ekstratlardan elde edilen tepki değerlerinin (% ÇDYA) istatiksel analizi için Statistica 7.0 (Stat Soft® Inc.) paket programı

kullanılmıştır. 3 değişken ve 3 seviye değerli yüzey merkezli deneysel tasarımda elde edilen tepkilerin değerlendirilmesinde Bölüm 3.2.5'de verilen 3.3 no.lu 2.dereceden polinom eşitliğinden yararlanılmıştır.

İlk olarak alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'ince zengin ürün eldesinde, bağımsız değişkenler (üre:yağ asitleri oranı, etanol:üre oranı ve zaman) ile %ÇDYA tepki değeri arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahmini ve katsayıları programdan elde edilmiştir. Bu değerler Çizelge 4.20'de ve varyans analizi sonuçları ise Çizelge 4.21' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.20: Alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'ce zengin ürün eldesinde, bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları

	Etki	Standart hata	t değeri	p değeri	Katsayı
Ortalama/Kesişim	84,9507	0,140354	605,2622	0,000000[a]	84,95070
Lineer					
X_1	14,7600	0,207449	71,1501	0,000000[a]	7,38000
X_2	-7,2000	0,207449	-34,7074	0,000000[a]	-3,60000
X_3	1,5000	0,207449	7,2307	0,000173[a]	0,75000
Kuadratik					
X_{11}	-11,7775	0,400779	-29,3864	0,000000[a]	-5,88873
X_{22}	-3,7775	0,400779	-9,4253	0,000032[a]	-1,88873
X_{33}	1,1225	0,400779	2,8009	0,026491[b]	0,56127
Etkileşim					
X_{12}	3,4500	0,231935	14,8749	0,000000[a]	1,72500
X_{13}	-0,5500	0,231935	-2,3714	0,049507[b]	-0,27500
X_{23}	0,2500	0,231935	1,0779	0,316820	0,12500
R^2	0,99				

X_1= Üre:YA oranı (ağ/ağ)
X_2= Etanol:Üre oranı (hacim/ağ)
X_3= Zaman (saat)
X_{11} = Üre:YA oranı* Üre:YA oranı
X_{22}= Etanol:Üre oranı* Etanol:Üre oranı
X_{33}= Zaman*Zaman
X_{12}= Üre:YA oranı*Etanol:Üre oranı
X_{13}= Üre:YA oranı*Zaman
X_{23}= Etanol:Üre oranı*Zaman

[a] $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı
[b] $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

Çizelge 4.21: Varyans analizi (ANOVA) sonuçları

	Kareler toplamı	**Serbestlik derecesi**	**Kareler ortalaması**	**F değeri**	**p değeri**
Lineer					
X_1	544,6440	1	544,6440	5062,334	0,000000[a]
X_2	129,6000	1	129,6000	1204,601	0,000000[a]
X_3	5,6250	1	5,6250	52,263	0,000173[a]
Kuadratik					
X_{11}	92,9086	1	92,9086	863,563	0,000000[a]
X_{22}	9,5577	1	9,5577	88,836	0,000032[a]
X_{33}	5,6250	1	5,6250	7,845	0,026491[b]
Etkileşim					
X_{12}	23,8050	1	23,8050	221,262	0,000000[a]
X_{13}	0,6050	1	0,6050	5,623	0,049507[b]
X_{23}	0,1250	1	0,1250	1,162	0,316820
Hata	0,7531	7	0,1076		
Kareler toplamı	892,5494	16			

X_1= Üre:YA oranı (ağ/ağ)
X_2= Etanol:Üre oranı (hacim/ağ)
X_3= Zaman (saat)
X_{11} = Üre:YA oranı* Üre:YA oranı
X_{22}= Etanol:Üre oranı* Etanol:Üre oranı
X_{33}= Zaman*Zaman
X_{12}= Üre:YA oranı*Etanol:Üre oranı
X_{13}= Üre:YA oranı*Zaman
X_{23}= Etanol:Üre oranı*Zaman

[a] $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı
[b] $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

Çizelge 4.20 incelendiğinde, ekstratların ÇDYA içeriğine 1. derece terimler arasında etanol:üre oranının etkisinin negatif olduğu görülmektedir. % ÇDYA değerine 1. derece terimlerden üre:yağ asitleri oranının etkisinin en yüksek olduğu, zamanın ise en az etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Benzer şekilde 2. derece terimler için üre:yağ asitleri oranı en yüksek etki göstermektedir.

Alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'ca zengin ürün eldesinde, ürünün ÇDYA yüzdesinin hesaplanması için oluşturulan ve 2. dereceden bir polinom olan model denklem aşağıda (4.1) eşitliğinde verilmiştir:

$$\% \text{ ÇDYA} = 84{,}950 + 7{,}380*X_1 - 5{,}889*X_1^2 - 3{,}600*X_2 - 1{,}889*X_2^2 + 0{,}750*X_3 + 0{,}561*X_3^2 + 1{,}725\,X_1*X_2 - 0{,}275\,X_1*X_3 + 0{,}125\,X_2*X_3 \quad \textbf{(4.1)}$$

Varyans analiz sonuçları incelendiğinde etanol:üre oranı*zaman lineer etkileşimi haricinde diğer tüm değerler %99 ve %95 güven aralığında anlamlıdır. Bu durum oluşturulan model denklemin katsayılarının istatistiki olarak %95 ve %99 doğru olduğunu gösterir. Çizelgelerde gösterilen *p* değeri anlamlılık testi için gerekli bir değerdir. Bu değer Statictica 7.0 programı aracılığı ile F_{tablo} değerinin $F_{hesaplanan}$ değeri ile kıyaslanması sonucunda bulunmuştur. Çizelgelerde gösterilen *p* değerlerinin 0,01'den ve 0.05'den düşük olması katsayıların %99 ve %95 güven aralığında doğru (anlamlı) olduğunu göstermektedir.

Alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'in eldesi için oluşturulan model denklemin korelasyon katsayısı (R^2) 0,99 olarak bulunmuştur. Ayrıca deneysel değerler ve tahmin edilen değer arasındaki kalanlar toplamı 0,1076 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olması ve kalanlar toplamının neredeyse 0 olması oluşturulan model denklemin uygunluğunu desteklemektedir.

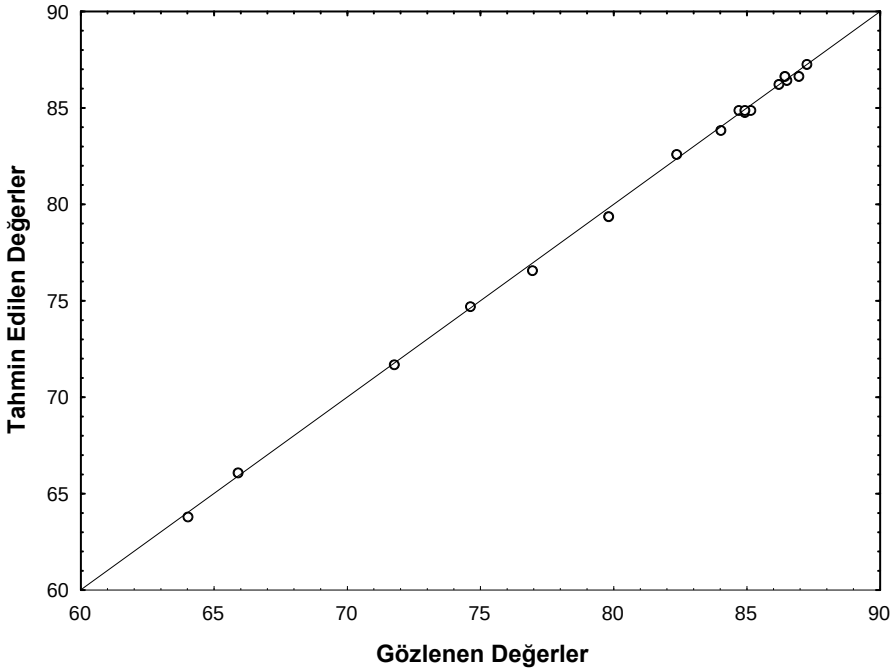
Oluşturulan Tepki-Yüzey modelinde üre:yağ asitleri oranı, etanol:üre oranı ve zaman olmak üzere 3 farklı bağımsız değişken için gözlenen minimum ve maksimum değerler ile kritik değerler Çizelge 4.22'de verilmiştir.

Çizelge 4.22: Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri

	Gözlenen minimum değer	**Kritik değer**	**Gözlenen maksimum değer**
Üre:YA oranı (ağ/ağ)	2	**3,5**	4
Etanol:Üre oranı (hac/ağ)	5	**5,6**	9
Zaman (saat)	1	**4,8**	15

Tepki yüzey metodolojisine göre kritik koşullarda elde edilecek maksimum tepki değeri (ÇDYA) % 88,05 olarak bulunmuştur.

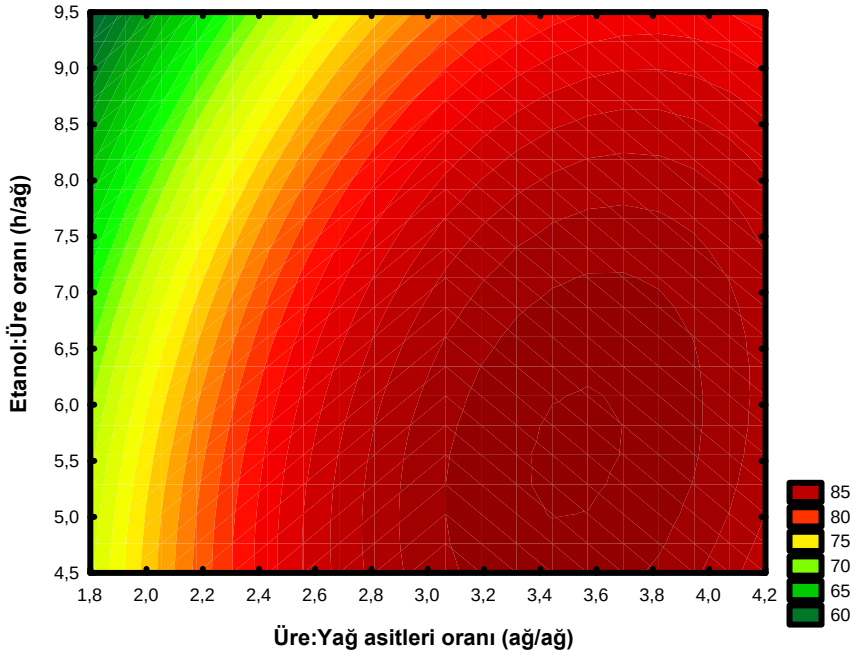
Model denklemden tahmin edilen değerler ile deneyler sonucu gözlenen değerler arasındaki ilişki ise Şekil 4.5'de verilmiştir.



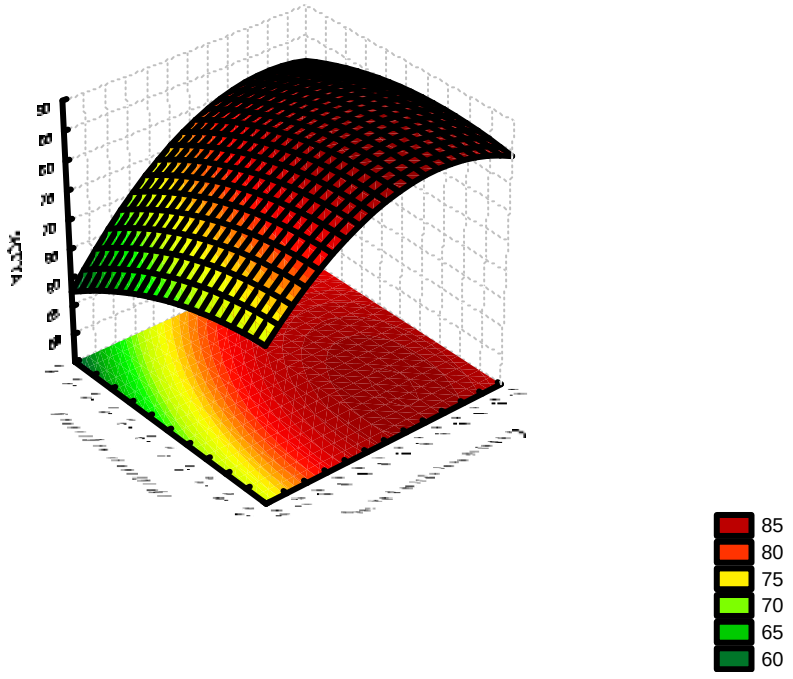
Şekil 4.5: Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki

4.2.4 Alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'ince zengin ürün eldesi için oluşturulan Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması

Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ÇDYA içeriğinin, üre:yağ asitleri oranı, etanol:üre oranı ve zamana göre değişimini gösteren izdüşüm (Contour Plot) ve tepki-yüzey grafikleri (Response Surface) grafikleri Şekil 4.6, Şekil 4.7 Şekil 4.8'de görülmektedir. İzdüşüm grafiklerinde görüldüğü gibi elde edilen tepki değerlerine ait eğriler bir düzlem üzerinde gösterilir. Bu düzleme ait koordinatlar bağımsız değişkenlerin seviyelerini göstermektedir. Her bir izdüşüm eğrisi, bağımsız değişkenlere ait seviyelerin bir birleşimi olarak ifade edilen bir düzlemle yüzey arasındaki yüksekliği temsil eden özel bir değere sahiptir.



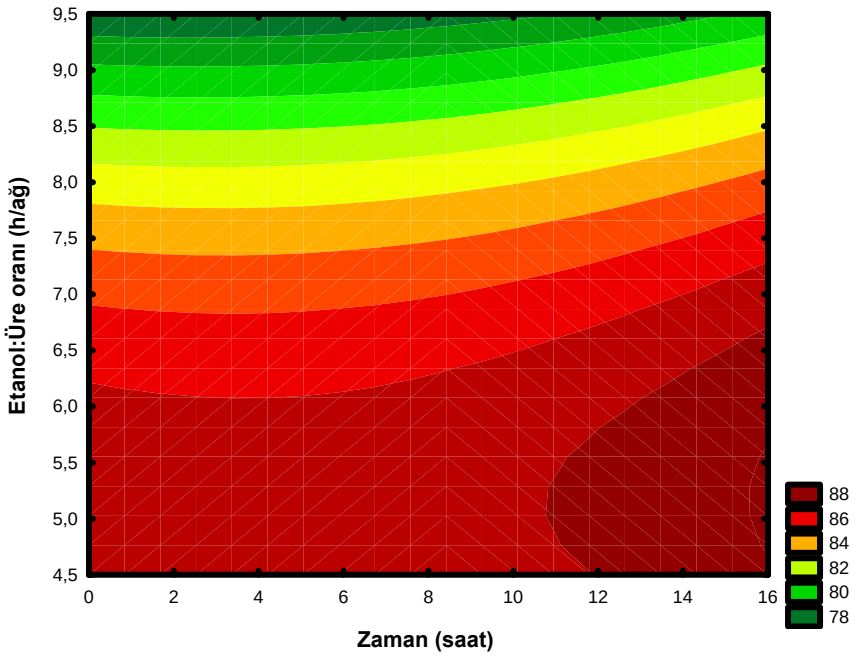
Şekil 4.6.a: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Üre:YA oranı ve Etanol:Üre oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



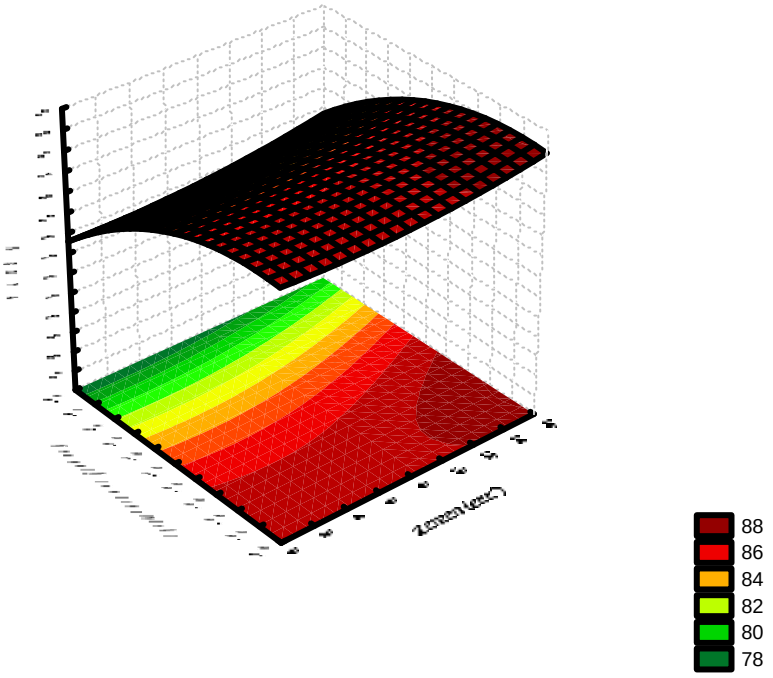
Şekil 4.6.b: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Üre:YA oranı ve Etanol:Üre oranı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği

Şekil 4.6.a ve 4.6.b alabalık ekstratlarının ÇDYA içeriklerinin, üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren izdüşüm ve tepki yüzey grafikleridir. Üre:yağ asitleri ve etanol:üre oranlarının %ÇDYA üzerine etkileşiminden literatürde "Maksimum tepki" olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir. Bu izdüşüm grafiğinden alabalık yağ asitlerinden % 85 ve üstünde ÇDYA içeren ekstratların eldesi için, üre:yağ asitleri oranının 3,0-4,0 arasında ve etanol:üre oranının ise 4,5-7,0 arasında olması gerektiği anlaşılmaktadır. Üre:yağ asitleri ve etanol:üre oranları için belirlenen kritik değerler (sırasıyla 3,5 ve 5,5 değerleri) hemen hemen merkez noktaya denk düşmektedir.

Ekstratların ÇDYA içeriklerine etanol:üre oranı ile zamanın etkisini gösteren izdüşüm ve tepki yüzey grafikleri Şekil 4.7 a ve 4.7 b'de verilmiştir.



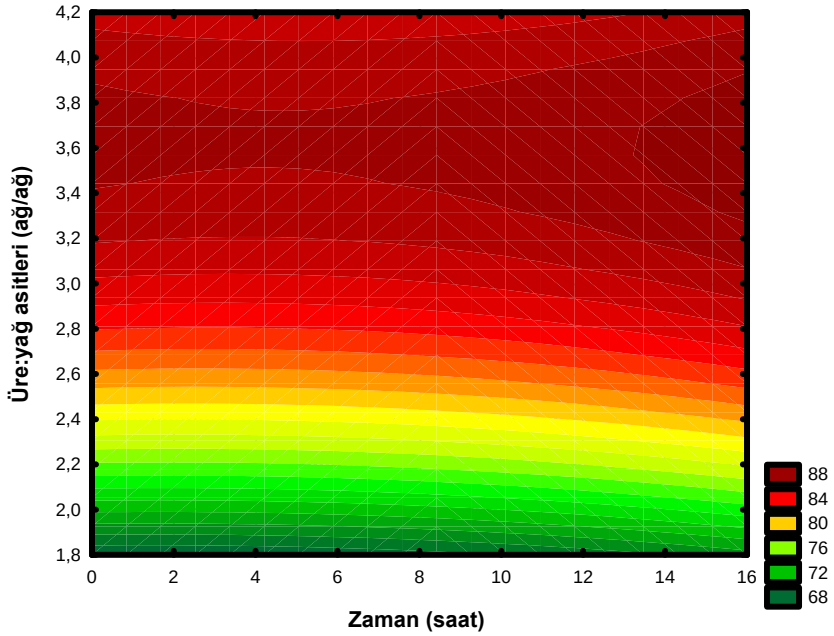
Şekil 4.7.a: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Etanol:Üre oranı ve zaman ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



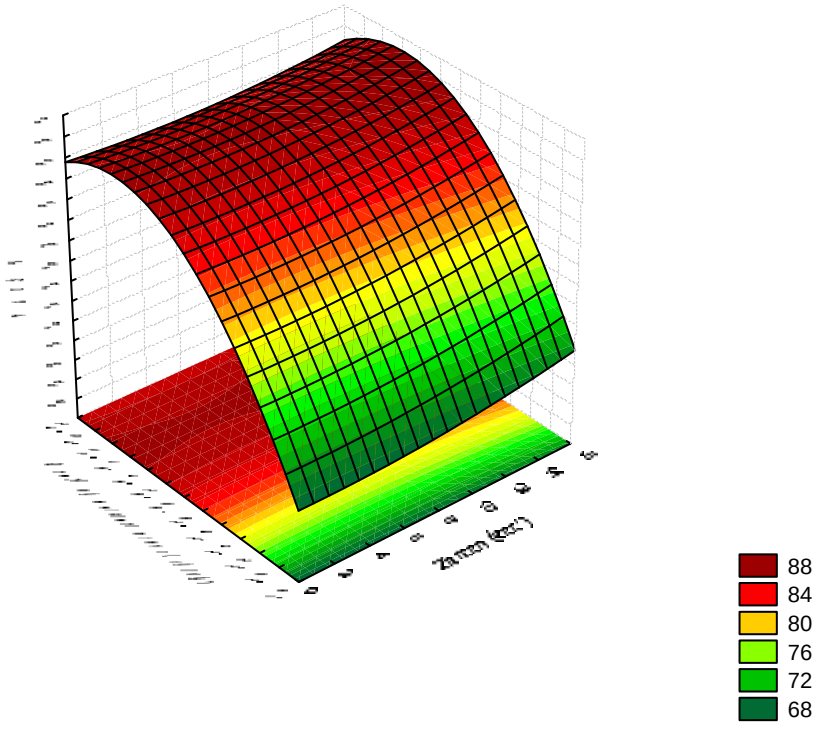
Şekil 4.7.b: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Etanol:Üre oranı ve zaman ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği

Etanol:üre oranının ve zamanın ekstratların ÇDYA içeriği üzerine etkileşimleri sonucunda literatürde "Sırt Noktası" (Saddle Point Responce) olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.7.a). Etanol:üre oranı 4,5-6,0 arasında zamandan bağımsız olarak ÇDYA içeriği %86 olan ekstratlar elde edilebilmektedir. % 88 ÇDYA içeren ekstratlar ise 10 saatten daha fazla kristalizasyon uygulandığında elde edilebilmektedir.

Ekstratların ÇDYA içeriğinin kristalizasyon süresi ve üre:YA oranına göre değişimini gösteren izdüşüm ve tepki yüzey grafikleri Şekil 4.8.a ve 4.8.b'de görülmektedir. Üre:YA oranı ve zamanın ekstratların ÇDYA içeriğine etkileri sonucunda yine sırt noktası olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir. Üre:YA oranının 3,4-3,8 olması durumunda yine 14 saatlik zaman periyodunda (0-14 saatte) zamandan bağımsız olarak yüksek ÇDYA içerikli ekstratlar ele geçmektedir.



Şekil 4.8.a: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Üre:YA oranı ve zaman ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.8.b: Alabalık ekstratları ÇDYA içeriğinin Üre:YA oranı ve zaman ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği

Sonuçlar genel olarak yorumlandığında, uyguladığımız çalışma koşullarımızda, üre:YA oranı 3,0-4,0 ve etanol:üre oranı 5,0-6,0 arasında seçildiğinde hemen hemen zamandan bağımsız olarak yüksek ÇDYA içerikli ekstrat ürünleri elde edilebilmektedir. Zaten Üre:YA ve Etanol:Üre oranları için kritik değerler sırasıyla 3,5 ve 5,5 olarak saptanmış idi. Saptanan bu kritik değerler yukarıda belirlenen değer aralıklarında yer almaktadır.

4.3 Çuha Çiçeği Yağı Yağ Asitlerinden GLA'ca Zengin Ürünler Eldesinin Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Optimizasyonu

4.3.1 Çuha çiçeği yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'nde kullanılacak değişken seviye değerlerinin belirlenmesi

Çuha çiçeği yağı yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürünlerin Tepki Yüzey Metodolojisine göre eldesi ve optimizasyonu için üre fraksiyonlama deneylerinin tasarımında, seçilen bağımsız değişkenlerin (yağ asitleri:üre oranı, üre:etanol oranı ve reaksiyon süresinin) öncelikle seviye değerlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla önce yağ asitleri:üre oranının seviye değerlerinin tespiti için bir seri üre fraksiyonlama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, üre:etanol (ağırlık/hacim) oranı 1:5 olarak sabit tutulmuş ve yağ asitleri:üre (ağırlık/ağırlık) oranları 1:2, 1:3, 1:4 ve 1:5 olacak şekilde değiştirilmiştir. Reaksiyonlar +4 ºC sıcaklıkta 8 saat yurütülmüştür. Süre sonunda elde edilen ekstrat ve rafinat fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimleri belirlenmiştir. Çizelge 4.23 ve Çizelge 4.24'de ekstrat ve rafinat fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi gösterilmiştir.

Çizelge 4.23: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ./h) oranı, 1:5; süre 8 saat)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	YA:Üre 1:2 (g/g)	YA:Üre 1:3 (g/g)	YA:Üre 1:4 (g/g)	YA:Üre 1:5 (g/g)
16:0	1,8	1,6	1,1	0,9
18:3 (GLA)	27,3	39,4	42,7	44,8
18:2+18:1	69,9	57,9	55,4	53,6
18:0	1,0	1,1	0,8	0,7

YA: Yağ asitleri

Çizelge 4.24: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ./h) oranı, 1:5; süre 8 saat)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	YA:Üre 1:2 (g/g)	YA:Üre 1:3 (g/g)	YA:Üre 1:4 (g/g)	YA:Üre 1:5 (g/g)
16:0	8,2	7,4	7,4	7,4
18:3 (GLA)	2,1	2,1	2,4	2,2
18:2+18:1	86,0	87,2	87,0	87,2
18:0	2,7	2,4	2,5	2,5
20:1	0,3	0,3	0,3	0,3
20:0	0,5	0,4	0,4	0,4
22:1	0,2	0,1	0,1	0,1

YA: Yağ asitleri

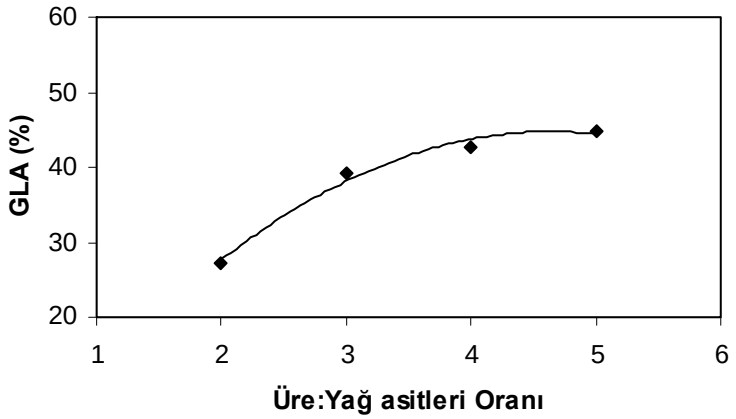
Çizelge 4.23'de görülen üre fraksiyonlama yöntemine göre elde edilmiş ekstratların yağ asitleri bileşimleri Çizelge 4.2 de verilen çuha çiçeği yağı yağ asitleri bileşimi ile karşılaştırıldığında, orijinal yağda % 10,4 oranında bulunan GLA, fraksiyonlama sonucu ortamdaki üre miktarına bağlı olarak % 27-45 gibi yüksek değerlere ulaşmıştır. Rafinat fraksiyonlarında ise %2 GLA bulunduğu belirlenmiştir (Bak. Çizelge 4.24)

Yağ asitleri:üre oranında 3 seviye değerini belirlemek için ekstrat verimleri ve ekstratlardan GLA'nın kazanımları da incelenmeye alınmıştır. Değerlendirmeler Çizelge 4.25'de görülmektedir.

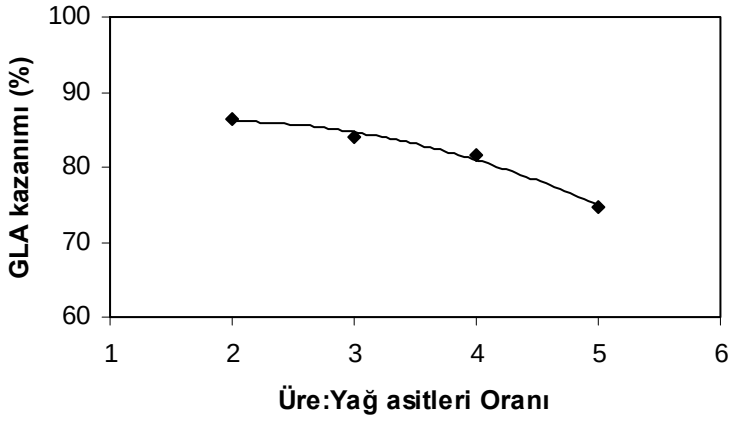
Çizelge 4.25: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, GLA içerikleri ile kazanımlarının yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:5; süre 8 saat)

Ekstrat özellikleri	**YA:Üre 1:2 (g/g)**	**YA:Üre 1:3 (g/g)**	**YA:Üre 1:4 (g/g)**	**YA:Üre 1:5 (g/g)**
Miktar (gram)	1,317	0,888	0,794	0,772
Ekstrat verimi (%)	32,9	22,2	19,9	19,3
GLA (%)	27,3	39,2	42,7	44,8
GLA kazanımı (%)	86,3	84,1	81,5	74,7

Çizelge 4.25 'de ortamdaki üre miktarının artmasıyla ekstrat miktarının azaldığı görülmektedir. Ekstratlarda üre artışı ile GLA zenginleşmesi olmaktadır. Ancak GLA kazanım yüzdesinin düşüşü, ekstratlarda miktar olarak GLA'nın gittikçe azaldığını dolayısiyle rafinata geçen GLA miktarının arttığını göstermektedir. Mümkün olduğu kadar yüksek GLA içerikli ve aynı zamanda yüksek GLA kazanımlı ekstratlar elde edebilmek için, GLA yüzdesinin ve kazanımının yağ asitleri:üre oranına göre değişimini içeren Çizelge 4.25'deki değerler kullanılarak Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 oluşturulmuştur.



Şekil 4.9: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların GLA içeriklerinin üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; üre:etanol oranı, 1:5; süre 8 saat)



Şekil 4.10: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların GLA kazanımlarının üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; üre:etanol oranı, 1:5; süre 8 saat)

Şekil 4.9 ve Şekil 4.10 de görülen değişim eğrilerinden yağ asitleri:üre oranına için deneysel tasarımda kullanılacak seviye değerleri (kodları) belirlenmiştir. Deneysel tasarımda, yağ asitleri:üre oranları için minimum, optimum ve maksimum değerler 1:2,5, 1:3,25 ve 1:4 olarak seçilmiştir.

Yağ asitleri:üre oranı için kodlanan değişken seviyelerinin tespitinden sonra, üre:etanol (ağırlık/hacim) oranının seviye değerlerini belirlemek amacı ile ikinci seri ön fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Bu deneylerde, yağ asitleri:üre oranı 1:3,25 alınmıştır. Sekiz saatlik sürede üre:etanol oranları 1:4, 1:6, 1:8 ve 1:9 olarak değiştirilmiştir. Elde edilen ekstratların ve rafinatların gaz kromatografisi ile yağ asitleri bileşimleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.26 ve 4.27'de verilmiştir.

Çizelge 4.26: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3,25; süre 8 saat)

Yağ asidi	**Bileşim (%)**			
	Üre:Etanol 1:4 (g/mL)	**Üre:Etanol 1:6 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:8 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:9 (g/mL)**
16:0	1,9	1,9	1,8	1,9
18:3 (GLA)	40,9	39,9	35,4	33,1
18:2+18:1	55,9	57,0	61,5	63,5
18:0	1,3	1,3	1,3	1,5

Çizelge 4.26'dan, üre:etanol oranının 1:4 den 1:9 'e yükseltilmesinin ekstratların yağ asitleri bileşimine olan etkisinin büyük olduğu anlaşılmaktadır. Tek ve iki çift bağ içeren yağ asitlerinin yüzdesi 56'dan 64'e yükselmiş, GLA ise %41'den %33'e düşmüştür. Reaksiyon ortamında etanolün artışı, alabalık yağ asitlerinin fraksiyonlanmasında anlatıldığı üzere, üre yağ asitleri komplekslerinin oluşumunu azaltmaktadır. Katılım ürünü yapamayan linoleik ve oleik asitler ekstratta artmaktadır. Dolayisiyle ekstratlardaki GLA yüzdesini düşürmektedir.

Çizelge 4.27: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3,25; süre 8 saat)

Yağ asidi	**Bileşim (%)**			
	Üre:Etanol 1:4 (g/mL)	**Üre:Etanol 1:6 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:8 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:9 (g/mL)**
16:0	7,2	7,3	7,6	7,7
18:3 (GLA)	2,3	2,4	2,1	2,0
18:2+18:1	87,3	87,2	87,1	87,0
18:0	2,4	2,4	2,4	2,4
20:1	0,3	0,3	0,3	0,3
20:0	0,4	0,4	0,4	0,4
22:1	0,1	0,1	0,1	0,1

Rafinatların yağ asitleri bileşimleri incelendiğinde, ortamda etanol miktarının artmasıyla yağ asitleri bileşimlerinde önemli bir değişim olmadığı, GLA yüzdelerinde bir miktar azalma olduğu gözlenmektedir.

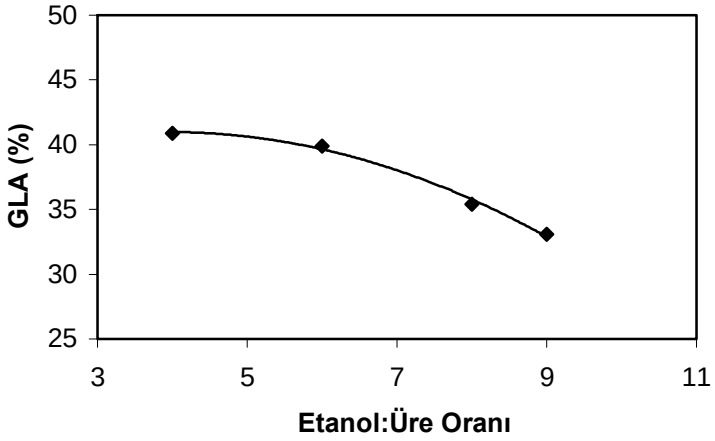
Üre:etanol oranında 3 seviye değerini belirlemek için yine ekstrat verimleri ve ekstratların GLA içerikleri ile kazanımları incelenmeye alınmıştır. Çizelge 4.28'de ekstrat verimleri, ekstratların GLA içerikleri ve bu yağ asidinin kazanım yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.28: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, GLA içerikleri ile kazanımlarının üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3,25; süre 8 saat)

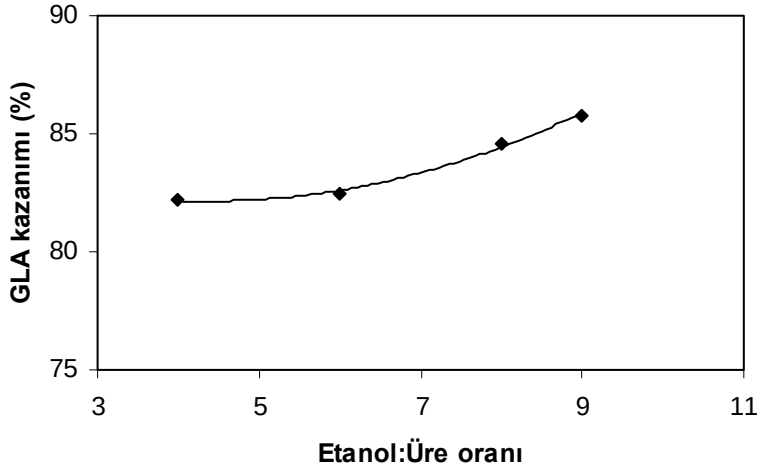
Ekstrat özellikleri	**Üre:Etanol 1:4 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:6 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:8 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:9 (g/mL)**
Miktar (gram)	0,838	0,858	0,994	1,078
Ekstrat verimi (%)	21,0	21,5	24,9	27,0
GLA (%)	40,9	39,9	35,4	33,1
GLA kazanımı (%)	82,2	82,5	84,6	85,8

Üre komplekslerinin oluşumunda üre:etanol oranının 1:4'den 1:6'e yükseltilmesi ekstrat miktarını, GLA zenginleşmesini ve GLA kazanımını pratik olarak etkilememektedir. Üre:etanol oranının 1:6'dan daha yüksek değerlere yükseltilmesi ise ekstrat verimini ve GLA kazanımını arttırmaktadır.

Ekstratların mümkün olduğu kadar yüksek verimli ve yüksek GLA içerikli olması için üre:etanol oranı seviye değerlerini doğru seçmek amacıyla, Çizelge 4.28'deki GLA içerik ve kazanım değerlerinin üre:etanol oranı ile değişim eğrileri çizilmiş ve Şekil 4.11 ve 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların GLA içeriklerinin etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3,25; süre 8 saat)



Şekil 4.12: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların GLA içeriklerinin etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3,25; süre 8 saat)

Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'den etanol:üre oranı için deneysel tasarımda -1, 0 ve 1 kodlarına karşılık gelen seviye değerleri 1:5, 1:6,5 ve 1:8 olarak belirlenmiştir.

Son olarak reaksiyon süresi değişken seviye değerlerini belirlemek amacı ile çuha çiçeği yağ asitleri ile üçüncü seri ön üre fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Bu deneylerde, 4º C sıcaklıkta, çuha çiçeği yağ asitleri:üre oranı 1:3,35 ve üre:etanol oranı 1:6,5 olacak şekilde hazırlanmış karışımlar kullanılmış ve kristalizasyon

zamanı 3, 8, 15 ve 24 saat olarak seçilmiştir. Bu koşullarda reaksiyonlar yürütülmüş, ekstrat ve rafinat ürünleri elde edilmiş ve bu ürünlerin gaz kromatografisi ile belirlenen yağ asitleri bileşimleri Çizelge 4.29 ve Çizelge 4.30'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.29: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3,25; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:6,5)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	3 saat	8 saat	15 saat	24 saat
16:0	2,1	2,1	1,8	1,7
18:3 (GLA)	38,1	40,0	40,7	43,3
18:2+18:1	58,5	56,6	56,3	54,0
18:0	1,4	1,4	1,2	1,0

Çizelge 4.30: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:3,25; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:6,5)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	3 saat	8 saat	15 saat	24 saat
16:0	7,3	7,3	7,3	7,2
18:3 (GLA)	2,1	2,2	2,4	2,5
18:2+18:1	87,4	87,4	87,1	87,2
18:0	2,4	2,4	2,4	2,4
20:1	0,3	0,3	0,3	0,3
20:0	0,4	0,4	0,4	0,4
22:1	0,1	0,1	0,1	0,1

Çizelge 4.29 ve 4.30'un incelenmesiyle, zamanın ekstrat ve rafinat yağ asitleri bileşimlerine olan etkisinin az olduğu görülmektedir. Kristalizasyon zamanının 8 saatten 24 saate çıkarılması ekstrat GLA içeriğini ancak %3 arttırmıştır. Rafinat bileşimlerinden de üre ile kompleks yapan GLA miktarlarının zamanla çok az arttığı anlaşılmaktadır.

Kristalizasyon zamanı için 3 seviye değerini belirlemek amacı ile yine ekstrat verimleri ve ekstratların GLA içerikleri ile kazanımları incelenmiştir. Çizelge 4.31'de ekstrat verimleri, ekstratların GLA içerikleri ve bu yağ asitlerinin kazanım yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.31: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, GLA içerikleri ile kazanımlarının zaman ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre oranı, 1:3,35, üre:etanol oranı, 1:6,5)

Ekstrat özellikleri	**3 saat**	**8 saat**	**15 saat**	**24 saat**
Miktar (gram)	0,922	0,870	0,836	0,778
Ekstrat verimi (%)	23,1	21,8	20,9	19,5
GLA (%)	38,1	40,0	40,7	43,3
GLA kazanımı (%)	84,4	83,7	81,7	81,0

Çizelge 4.31'den zamanın GLA zenginleşmesi ve kazanım değerlerine olan etkisinin az olduğu anlaşılmaktadır. 3 saatte GLA yüzdesi 38,1 iken 24 saat sonunda bu asit içeriği % 43,3 yükselmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda, yüzey merkezli küp tasarımında kullanılacak, +1, 0 ve -1 kodlarına karşılık gelecek reaksiyon süresi seviye değerleri 8 , 16 ve 24 saat olarak belirlenmiştir.

4.3.2 Çuha çiçeği yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'ne göre uygulanan deneysel tasarım ve reaksiyon parametrelerinin optimizasyonu

Çuha çiçeği yağından GLA'ca zenginleşmiş ürünlerin üre fraksiyonlama yöntemine göre eldesinde, reaksiyon parametrelerinin (yağ asitleri:üre oranı, üre:etanol oranı ve zamanın) ürün GLA içeriğine olan etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesinde yine 3 değişkenli, 3 seviyeli ve 17 özel tasarım noktası içeren Merkezi Bileşik Yüzey Merkezli Küp Tasarımı esaslarına göre çalışılmıştır. Deneylerin tasarımı için seçilmiş bağımsız değişkenlerin ve bu değişkenlerin Bölüm 4.3.1'de belirlenmiş seviye değerleri Çizelge 4.32'de topluca verilmiştir. Yüzey merkezli küp tasarımına göre belirlenen 3 değişkenli ve 3 seviye değerli deney tasarımını noktaları, kodları ve değerleri ise Çizelge 4.33'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.32: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'nin eldesinde, yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviye değerleri

Bağımsız Değişkenler	Kodlanan Değişken seviyeleri		
	-1	0	+1
Yağ asitleri:Üre oranı (ağırlık/ağırlık)	1:2,5	1:3,25	1:4
Üre:Etanol oranı (ağırlık/hacim)	1:5	1:6,5	1:8
Zaman (saat)	8	16	24

Çizelge 4.33: Yüzey merkezli küp deseni deney tasarım noktaları

Deney No	Üre:YA oranı (ağ./ağ.)		Etanol:Üre oranı (h/ağ.)		Zaman (saat)	
	Kod	Değer	Kod	Değer	Kod	Değer
1	-1	2,5	-1	5	-1	8
2	-1	2,5	-1	5	+1	24
3	-1	2,5	+1	8	-1	8
4	-1	2,5	+1	8	+1	24
5	+1	4	-1	5	-1	8
6	+1	4	-1	5	+1	24
7	+1	4	+1	8	-1	8
8	+1	4	+1	8	+1	24
9	-1	2,5	0	6,5	0	16
10	+1	4	0	6,5	0	16
11	0	3,25	-1	5	0	16
12	0	3,25	+1	8	0	16
13	0	3,25	0	6,5	-1	8
14	0	3,25	0	6,5	+1	24
15	0	3,25	0	6,5	0	16
16	0	3,25	0	6,5	0	16
17	0	3,25	0	6,5	0	16

Çizelge 4.33'de belirlenen koşullarda yürütülen 17 üre fraksiyonlama deneyi sonucunda çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ürünlerinin gaz kromotografisi ile belirlenen yağ asitleri bileşimleri Çizelge 4.34-4.37 de gruplar halinde verilmiştir.

Çizelge 4.34: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:yağ asitleri oranı, 2,5:1) (Deney No: 1-4 sonuçları)

	Yağ asitleri bileşimi (%)							
	Etanol:Üre oranı, 5:1				**Etanol:Üre oranı, 8:1**			
	8 saat		**24 saat**		**8 saat**		**24 saat**	
YA	**E1**	**R1**	**E2**	**R2**	**E3**	**R3**	**E4**	**R4**
16:0	2,3	7,4	2,1	7,3	2,4	7,6	2,3	7,5
18:3 (GLA)	35,0	2,1	38,2	2,4	31,9	1,6	33,4	2,3
18:2+18:1	61,5	87,2	58,7	87,0	64,4	87,4	63,2	86,7
18:0	1,2	2,5	1,0	2,5	1,3	2,5	1,2	2,5
20:1	-	0,3	-	0,3	-	0,3	-	0,3
20:0	-	0,4	-	0,4	-	0,4	-	0,4
22:1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1

YA: Yağ asitleri; E: Ekstrat; R: Rafinat

Çizelge 4.35: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:yağ asitleri oranı, 4:1) (Deney No: 5-8 sonuçları)

	Yağ asitleri bileşimi (%)							
	Etanol:Üre oranı, 5:1				**Etanol:Üre oranı, 8:1**			
	8 saat		**24 saat**		**8 saat**		**24 saat**	
YA	**E5**	**R5**	**E6**	**R6**	**E7**	**R7**	**E8**	**R8**
16:0	1,1	7,4	1,0	7,3	1,5	7,5	1,4	7,4
18:3 (GLA)	42,7	2,4	45,0	2,7	37,5	2,3	38,5	2,7
18:2+18:1	55,4	87,0	53,3	86,8	60,0	86,9	59,2	86,6
18:0	0,8	2,5	0,7	2,5	1,0	2,5	0,9	2,5
20:1	-	0,3	-	0,3	-	0,3	-	0,3
20:0	-	0,4	-	0,4	-	0,4	-	0,4
22:1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1

YA: Yağ asitleri; E: Ekstrat; R: Rafinat

Çizelge 4.36: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Zaman, 16 saat) (Deney No: 9-12 sonuçları)

	Yağ asitleri bileşimi (%)							
	Etanol:Üre (6,5:1)				**Etanol:Üre (5:1)**		**Etanol:Üre (8:1)**	
	Üre:YA (2,5:1)		**Üre:YA (4:1)**		**Üre:YA (3,25:1)**		**Üre:YA (3,25:1)**	
YA	**E9**	**R9**	**E10**	**R10**	**E11**	**R11**	**E12**	**R12**
16:0	2,3	7,4	1,2	7,4	1,5	7,3	1,7	7,5
18:3 (GLA)	35,0	2,2	41,6	2,5	42,0	2,5	35,8	2,4
18:2+18:1	61,6	87,1	56,3	86,9	55,5	87,0	61,4	86,8
18:0	1,1	2,5	0,9	2,5	1,0	2,4	1,2	2,5
20:1	-	0,3	-	0,3	-	0,3	-	0,3
20:0	-	0,4	-	0,4	-	0,4	-	0,4
22:1	-	0,1	-	0,1	-	0,1	-	0,1

YA: Yağ asitleri; E: Ekstrat; R: Rafinat

Çizelge 4.37: Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:YA oranı, 3,25:1; Etanol:Üre oranı, 6,5:1) (Deney No: 13-17 sonuçları)

	Yağ asitleri Bileşimi (%)					
	8 saat		**24 saat**		**16 saat**	
YA	**E13**	**R13**	**E14**	**R14**	**E15-17**	**R15-17**
16:0	2,1	7,3	1,7	7,2	1,8	7,3
18:3 (GLA)	40,0	2,2	43,3	2,5	41,0	2,4
18:2+18:1	56,6	87,4	54,0	87,2	56,0	87,2
18:0	1,4	2,4	1,0	2,4	1,2	2,4
20:1	-	0,3	-	0,3	-	0,3
20:0	-	0,4	-	0,4	-	0,4
22:1	-	0,1	-	0,1	-	0,1

YA: Yağ asitleri; E: Ekstrat; R: Rafinat

Tepki Yüzey Metodolojisi esaslarına göre yürütülmüş deneylerde elde edilen ekstratlara ait %GLA değerleri tepki değerleri olarak Çizelge 4.38'de gösterilmiştir. Aynı koşullarda elde edilen rafinatlara ait tepki değerleri (%GLA) ise Çizelge 4.39 da verilmiştir.

Çizelge 4.38: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda ekstratlardan elde edilen tepki değerleri

Deney No	**Değişken seviyeleri**			**Tepki değerleri**
	Üre:YA[a] (X_1)	Etanol:Üre[b] (X_2)	Zaman[c] (X_3)	GLA (%)
1	2,5	5	8	35,0
2	2,5	5	24	38,2
3	2,5	8	8	31,9
4	2,5	8	24	33,4
5	4	5	8	42,7
6	4	5	24	45,0
7	4	8	8	37,5
8	4	8	24	38,5
9	2,5	6,5	16	35,0
10	4	6,5	16	41,6
11	3,25	5	16	42,0
12	3,25	8	16	35,8
13	3,25	6,5	8	40,0
14	3,25	6,5	24	43,3
15	3,25	6,5	16	40,9
16	3,25	6,5	16	41,3
17	3,25	6,5	16	41,0

[a] Üre:Yağ asitleri oranı, ağırlık/ağırlık; [b] Etanol:üre oranı, hacim/ağırlık;
[c] Zaman, saat

Çizelge 4.39: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun yürütülmüş üre fraksiyonlama sonucunda rafinatlardan elde edilen tepki değerleri

Deney No	Değişken seviyeleri			Tepki değerleri
	Üre:YA[a] (X_1)	Etanol:Üre[b] (X_2)	Zaman[c] (X_3)	GLA (%)
1	2,5	5	8	2,1
2	2,5	5	24	2,4
3	2,5	8	8	1,6
4	2,5	8	24	2,3
5	4	5	8	2,4
6	4	5	24	2,7
7	4	8	8	2,3
8	4	8	24	2,7
9	2,5	6,5	16	2,2
10	4	6,5	16	2,5
11	3,25	5	16	2,5
12	3,25	8	16	2,4
13	3,25	6,5	8	2,2
14	3,25	6,5	24	2,5
15	3,25	6,5	16	2,4
16	3,25	6,5	16	2,3
17	3,25	6,5	16	2,7

[a] Üre:Yağ asitleri oranı, ağırlık/ağırlık; [b] Etanol:üre oranı, hacim/ağırlık;
[c] Zaman, saat

4.3.3 Farklı reaksiyon koşullarının çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesi üzerindeki etkilerinin istatiksel açıdan değerlendirilmesi

Çizelge 4.38'de verilen yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda ekstratlardan elde edilen tepki değerlerinin (% GLA) istatiksel analizi için Statistica 7.0 (Stat Soft® Inc.) paket programı kullanılmıştır. 3 değişken ve 3 seviye değerli yüzey merkezli deneysel tasarımda elde

edilen tepkilerin değerlendirilmesinde Bölüm 3.2.5'de verilen 3.3 no.lu 2.dereceden polinom eşitliğinden yararlanılmıştır.

İlk olarak çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesinde, bağımsız değişkenler (üre:yağ asitleri oranı, etanol:üre oranı ve zaman) ile %GLA tepki değeri arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahmini ve katsayıları programdan elde edilmiştir. Bu değerler Çizelge 4.40'de ve varyans analizi sonuçları ise Çizelge 4.41' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.40: Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesinde, bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları

	Etki	Standart hata	t değeri	p değeri	Katsayı
Ortalama/Kesişim	40,8282	0,221358	184,4441	0,000000[a]	40,82817
Lineer					
X_1	6,3600	0,327177	19,4390	0,000000[a]	3,18000
X_2	-5,1600	0,327177	-15,7713	0,000001[a]	-2,58000
X_3	2,2600	0,327177	6,9076	0,000230[a]	1,13000
Kuadratik					
X_{11}	-4,6986	0,632086	-7,4335	0,000145[a]	-2,34930
X_{22}	-3,4986	0,632086	-5,5350	0,000874[a]	-1,74930
X_{33}	2,0014	0,632086	3,1664	0,015788[b]	1,00070
Etkileşim					
X_{12}	-0,9500	0,365795	-2,5971	0,035576[b]	-0,47500
X_{13}	-0,3500	0,365795	-0,9568	0,370528	-0,17500
X_{23}	-0,7500	0,365795	-2,0503	0,079492	-0,37500
R^2	0,99				

X_1= Üre:YA oranı (ağ/ağ)
X_2= Etanol:Üre oranı (hacim/ağ)
X_3= Zaman (saat)
X_{11} = Üre:YA oranı* Üre:YA oranı
X_{22}= Etanol:Üre oranı* Etanol:Üre oranı
X_{33}= Zaman*Zaman
X_{12}= Üre:YA oranı*Etanol:Üre oranı
X_{13}= Üre:YA oranı*Zaman
X_{23}= Etanol:Üre oranı*Zaman

[a] $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı
[b] $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

Çizelge 4.41: Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesinde varyans analizi (ANOVA) sonuçları

	Kareler toplamı	**Serbestlik derecesi**	**Kareler ortalaması**	**F değeri**	**p değeri**
Lineer					
X_1	101,1240	1	101,1240	377,8759	0,000000[a]
X_2	66,5640	1	66,5640	248,7335	0,000001[a]
X_3	12,7690	1	12,7690	47,7147	0,000230[a]
Kuadratik					
X_{11}	14,7873	1	14,7873	55,2564	0,000145[a]
X_{22}	8,1986	1	8,1986	30,6361	0,000874[a]
X_{33}	2,6830	1	2,6830	10,0258	0,015788[b]
Etkileşim					
X_{12}	1,8050	1	1,8050	6,7448	0,035576[b]
X_{13}	0,2450	1	0,2450	0,9155	0,370528
X_{23}	0,1250	1	0,1250	4,2039	0,079492
Hata	1,8733	7	0,2676		
Kareler toplamı	224,9894	16			

X_1= Üre:YA oranı (ağ/ağ)
X_2= Etanol:Üre oranı (hacim/ağ)
X_3= Zaman (saat)
X_{11} = Üre:YA oranı* Üre:YA oranı
X_{22}= Etanol:Üre oranı* Etanol:Üre oranı
X_{33}= Zaman*Zaman
X_{12}= Üre:YA oranı*Etanol:Üre oranı
X_{13}= Üre:YA oranı*Zaman
X_{23}= Etanol:Üre oranı*Zaman

[a] $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı
[b] $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

Çizelge 4.40 incelendiğinde, ekstratların GLA içeriğine 1. derece terimler arasında etanol:üre oranının etkisinin negatif olduğu görülmektedir. % GLA değerine 1. derece terimlerden üre:yağ asitleri oranının etkisinin en yüksek olduğu, zamanın ise en az etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Benzer şekilde 2. derece terimler için üre:yağ asitleri oranı en yüksek etki göstermektedir.

Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesinde, ürünün GLA yüzdesinin hesaplanması için oluşturulan ve 2. dereceden bir polinom olan model denklem aşağıda (4.2) eşitliğinde verilmiştir:

$$\% \text{ GLA} = 40{,}828 + 3{,}180*X_1 - 2{,}349*X_1^2 - 2{,}580*X_2 - 1{,}749*X_2^2 + 1{,}130*X_3 + 1{,}001*X_3^2 - 0{,}475\,X_1*X_2 \quad \textbf{(4.2)}$$

Varyans analiz sonuçları incelendiğinde X_{13} (üre:yağ asitleri oranı*zaman) ve X_{23} (etanol:üre oranı*zaman) lineer etkileşimleri haricinde diğer tüm değerler %99 ve %95 güven aralığında anlamlıdır. Bu durum oluşturulan model denklemin katsayılarının istatistiki olarak %95 ve %99 doğru olduğunu gösterir. Bu yüzden model denkleme X_{13} ve X_{23} terimleri dahil edilmemiştir. Çizelgelerde gösterilen *p* değeri anlamlılık testi için gerekli bir değerdir. Bu değer Statictica 7.0 programı aracılığı ile F_{tablo} değerinin $F_{hesaplanan}$ değeri ile kıyaslanması sonucunda bulunmuştur. Çizelgelerde gösterilen *p* değerlerinin 0,01'den ve 0.05'den düşük olması katsayıların %99 ve %95 güven aralığında doğru (anlamlı) olduğunu göstermektedir.

Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'in eldesi için oluşturulan model denklemin korelasyon katsayısı (R^2) 0,99 olarak bulunmuştur. Ayrıca deneysel değerler ve tahmin edilen değer arasındaki kalanlar toplamı 0,2076 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olması ve kalanlar toplamının neredeyse 0 olması oluşturulan model denklemin uygunluğunu desteklemektedir.

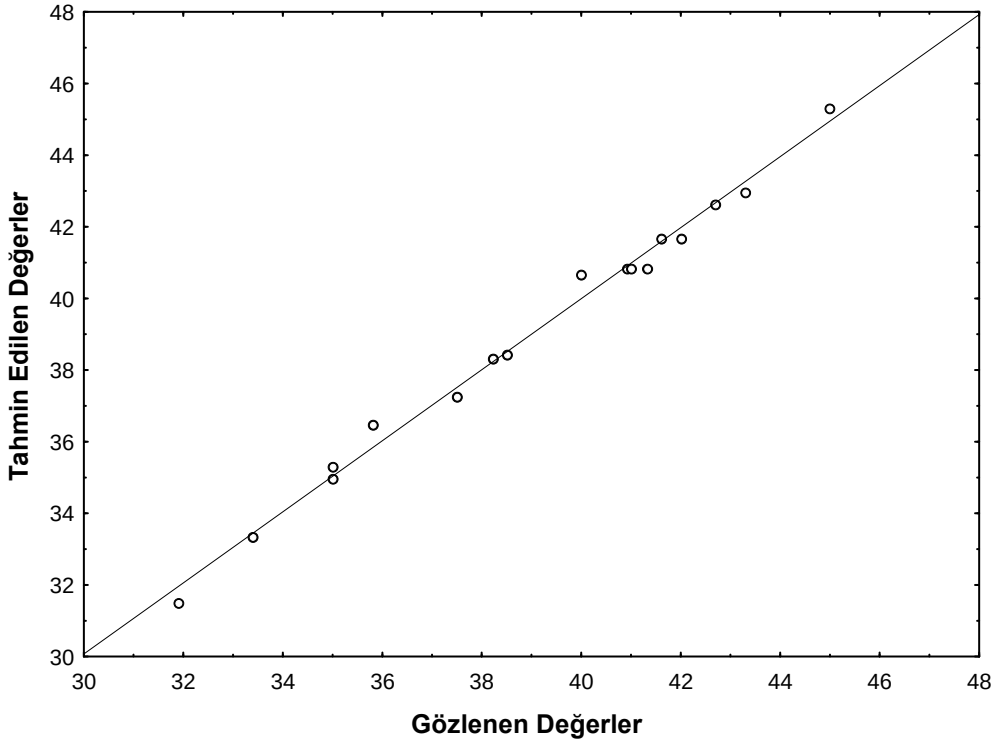
Oluşturulan Tepki Yüzey modelinde üre:yağ asitleri oranı, etanol:üre oranı ve zaman olmak üzere 3 farklı bağımsız değişken için gözlenen minimum ve maksimum değerler ile kritik değerler Çizelge 4.42'de verilmiştir.

Çizelge 4.42: Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesinde Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri

	Gözlenen minimum değer	**Kritik değer**	**Gözlenen maksimum değer**
Üre:YA oranı (ağ/ağ)	2,5	**3,8**	4,0
Etanol:Üre oranı (h/ağ)	5,0	**5,3**	8,0
Zaman (saat)	8,0	**10,9**	24,0

Tepki yüzey metodolojisine göre kritik koşullarda elde edilecek maksimum tepki değeri (GLA) % 42,70 olarak bulunmuştur.

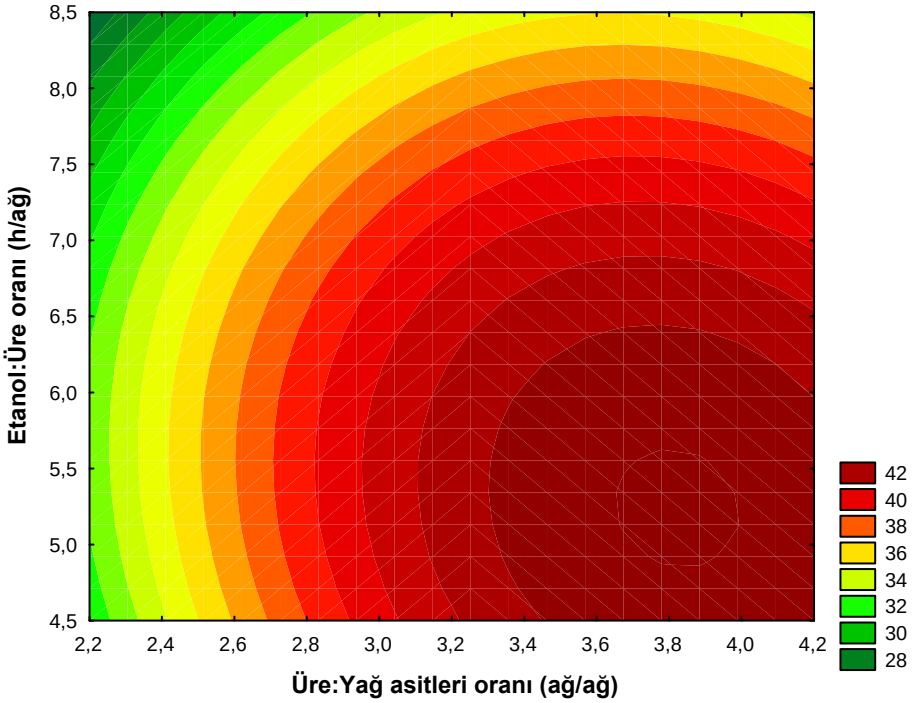
Model denklemden tahmin edilen değerler ile deneyler sonucu gözlenen değerler arasındaki ilişki ise Şekil 4.13'de verilmiştir.



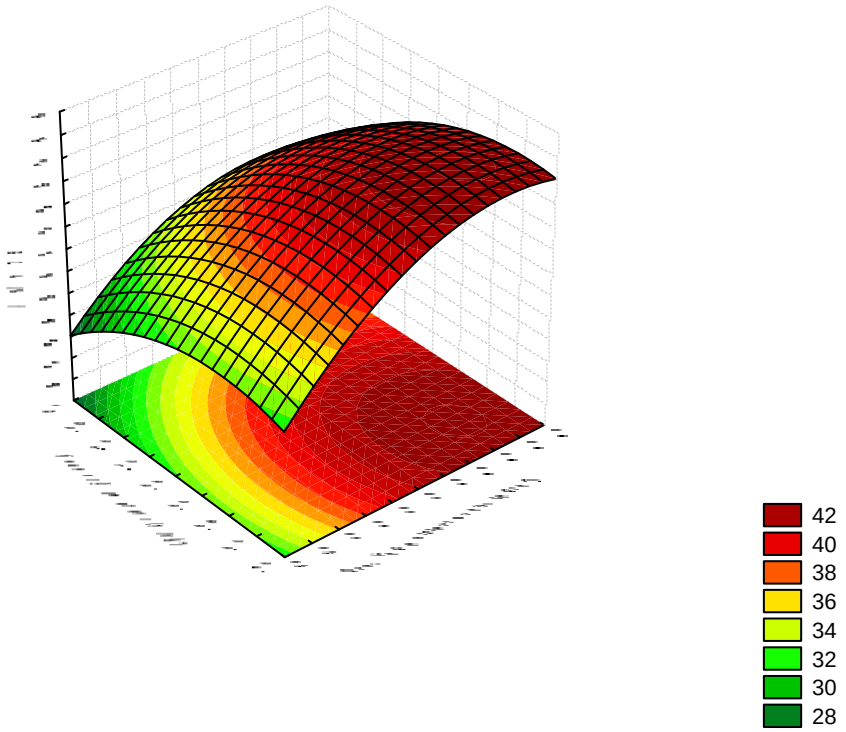
Şekil 4.13: Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesinde gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki

4.3.4 Çuha çiçeği yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürün eldesi için oluşturulan Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması

Üre fraksiyonlama yöntemine göre çuha çiçeği yağ asitlerinden elde edilen ekstratların GLA içeriğinin, üre:yağ asitleri oranı, etanol:üre oranı ve zamana göre değişimini gösteren izdüşüm (Contour Plot) ve tepki-yüzey grafikleri (Response Surface) grafikleri Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'de görülmektedir.



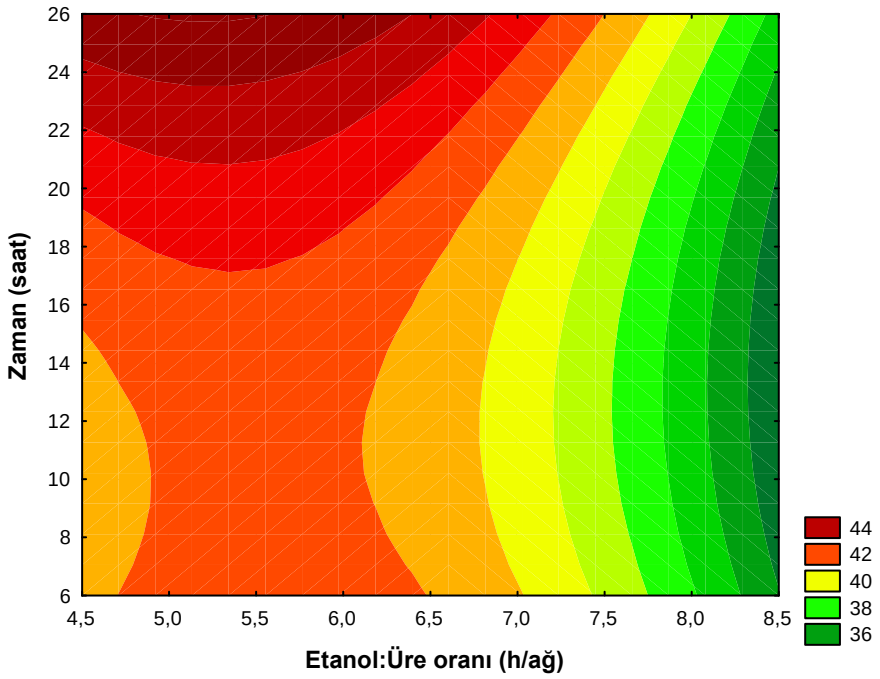
Şekil 4.14.a: Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin Üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



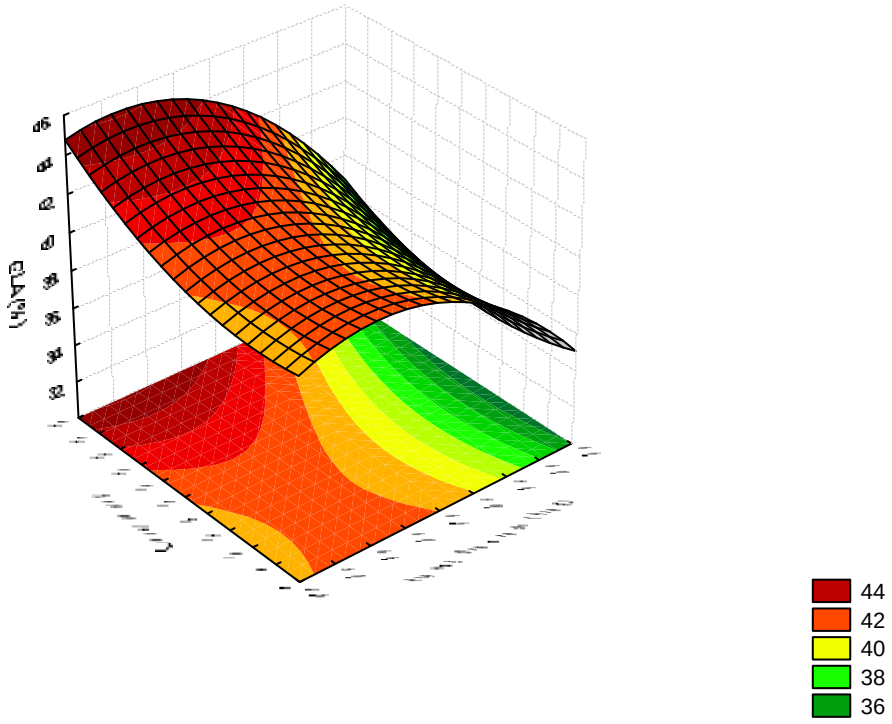
Şekil 4.14.b: Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği

Şekil 4.14.a ve 4.14.b çuha çiçeği ekstratlarının GLA içeriklerinin, üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren izdüşüm ve tepki yüzey grafikleridir. Üre:yağ asitleri ve etanol:üre oranlarının %GLA üzerine etkileşiminden literatürde "Maksimum tepki" olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir. Bu izdüşüm grafiğinden çuha çiçeği yağ asitlerinden % 42 ve üstünde GLA içeren ekstratların eldesi için, üre:yağ asitleri oranının 3,3-4,0 arasında ve etanol:üre oranının ise 4,5-6,5 arasında olması gerektiği anlaşılmaktadır. Üre:yağ asitleri ve etanol:üre oranları için belirlenen kritik değerler (sırasıyla 3,8 ve 5,3 değerleri) hemen hemen merkez noktaya denk düşmektedir.

Ekstratların GLA içeriklerine etanol:üre oranı ile zamanın etkisini gösteren izdüşüm ve tepki yüzey grafikleri Şekil 4.15 a ve 4.15 b'de verilmiştir.



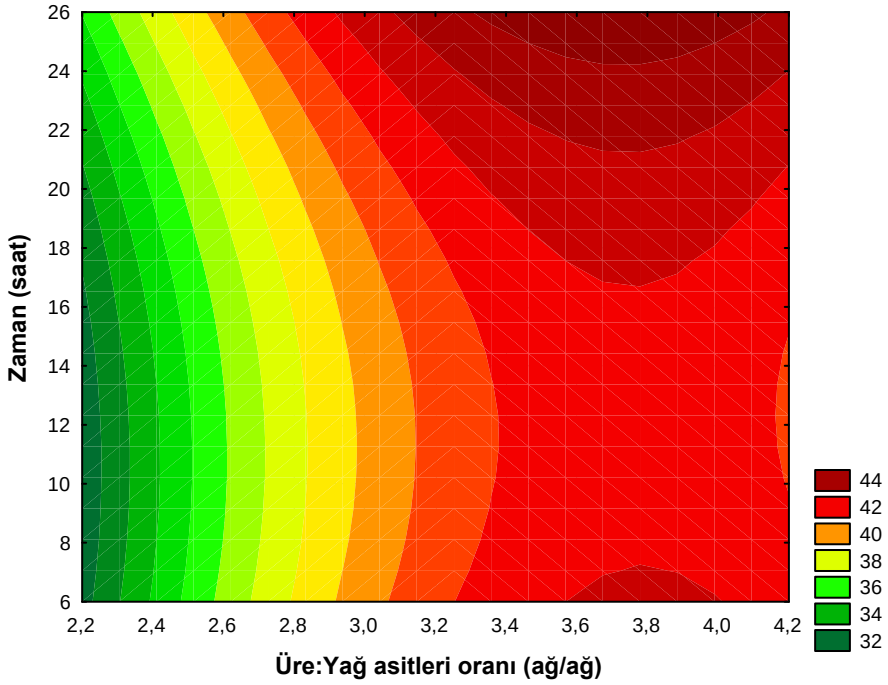
Şekil 4.15.a: Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin etanol:üre oranı ve zaman ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



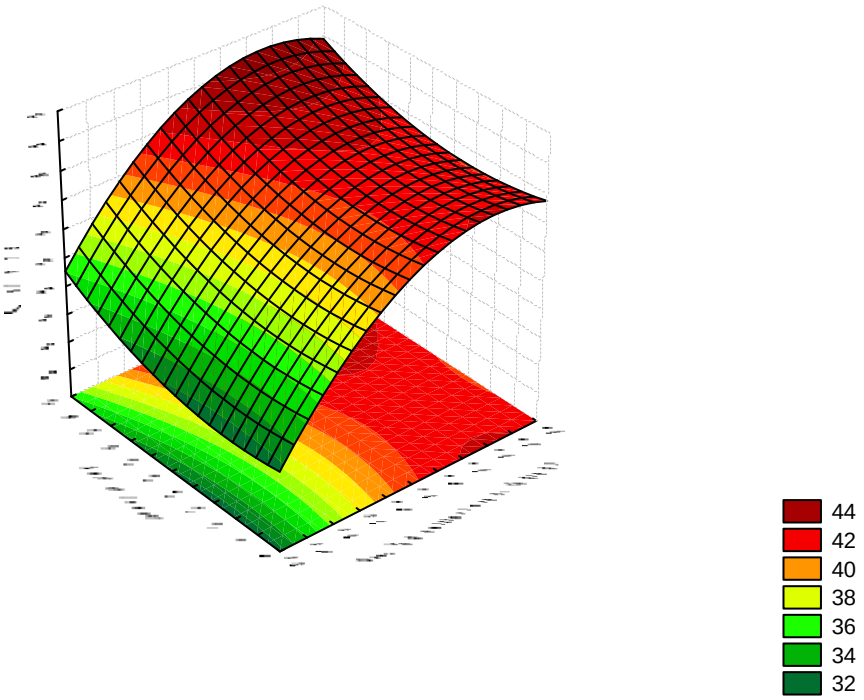
Şekil 4.15.b: Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin etanol:üre oranı ve zaman ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği

Etanol:üre oranının ve zamanın ekstratların GLA içeriği üzerine etkileşimleri sonucunda literatürde "Sırt Noktası" (Saddle Point Responce) olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir (Şekil 4.15.a). Etanol:üre oranı 5,0-6,0 arasında 6-17 saat zaman aralığında zamandan bağımsız olarak GLA içeriği %42 olan ekstratlar elde edilebilmektedir. % 42 den daha yüksek GLA içeren ekstratlar ise 17 saatten daha fazla kristalizasyon işlemi uygulandığında elde edilebilmektedir.

Ekstratların GLA içeriğinin kristalizasyon süresi ve üre:yağ asitleri oranına göre değişimini gösteren izdüşüm ve tepki yüzey grafikleri Şekil 4.16.a ve 4.16.b'de görülmektedir. Üre:yağ asitleri oranı ve zamanın ekstratların GLA içeriğine etkileri sonucunda yine sırt noktası olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir. Üre:yağ asitleri oranının 3,3-4,2 olması durumunda yine 10 saatlik zaman periyodunda (7-17 saatte) zamandan bağımsız olarak %42 GLA içerikli ekstratlar ele geçmektedir. 17 saatten daha uzun sürede aynı üre:yağ asitleri oranları aralığında %42 den daha yüksek GLA içeren ekstraktlar elde edilebilmektedir.



Şekil 4.16.a: Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin üre:yağ asitleri oranı ve zaman ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.16.b: Çuha çiçeği ekstratları GLA içeriğinin üre:yağ asitleri oranı ve zaman ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği

4.4 Keten Yağı Yağ Asitlerinden ALA'ca Zengin Ürünler Eldesinin Tepki Yüzey Metodolojisine Göre Optimizasyonu

4.4.1 Keten yağı yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'nde kullanılacak değişken seviye değerlerinin belirlenmesi

Çalışmamızın bu son bölümünde, keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürünlerin Tepki Yüzey Metodolojisine göre eldesi ve optimizasyonu için üre fraksiyonlama deneylerinin tasarımında, seçilen bağımsız değişkenlerin (yağ asitleri:üre oranı, üre:etanol oranı ve reaksiyon süresinin) seviye değerleri belirlenmiştir. İlk olarak yağ asitleri:üre oranının seviye değerlerinin tespiti için bir seri üre fraksiyonlama deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, üre:etanol (ağırlık/hacim) oranı 1:5 olarak sabit tutulmuş ve yağ asitleri:üre (ağırlık/ağırlık) oranları 1:1, 1:1,5, 1:2, 1:3 ve 1:4 olacak şekilde değiştirilmiştir. Reaksiyonlar +4 ºC sıcaklıkta 8 saat yurütülmüştür. Süre sonunda elde edilen ekstrat ve rafinat fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimleri belirlenmiştir. Çizelge 4.43 ve Çizelge 4.44'de ekstrat ve rafinat fraksiyonlarının yağ asitleri bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi gösterilmiştir.

Çizelge 4.43: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ./h) oranı, 1:5; süre 8 saat)

Yağ asidi	Bileşim (%)				
	YA:Üre 1:1 (g/g)	YA:Üre 1:1,5 (g/g)	YA:Üre 1:2 (g/g)	YA:Üre 1:3 (g/g)	YA:Üre 1:4 (g/g)
16:0	1,2	0,9	0,9	0,8	0,6
18:3 (ALA)	58,0	66,4	74,4	86,8	89,0
18:2	22,9	19,1	16,6	8,0	7,0
18:1	16,9	13,0	7,5	3,8	3,0
18:0	1,0	0,6	0,6	0,7	0,5

YA: Yağ asitleri

Çizelge 4.44: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ./h) oranı, 1:5; süre 8 saat)

Yağ asidi	Bileşim (%)				
	YA:Üre 1:1 (g/g)	**YA:Üre 1:1,5 (g/g)**	**YA:Üre 1:2 (g/g)**	**YA:Üre 1:3 (g/g)**	**YA:Üre 1:4 (g/g)**
16:0	7,4	7,1	6,7	6,4	6,4
18:3 (ALA)	46,2	43,2	41,5	39,8	39,7
18:2	10,3	13,1	14,4	17,1	17,3
18:1	30,0	30,8	31,9	31,5	31,4
18:0	5,5	5,3	5,0	4,7	4,8
20:1	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3
20:0	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2

YA: Yağ asitleri

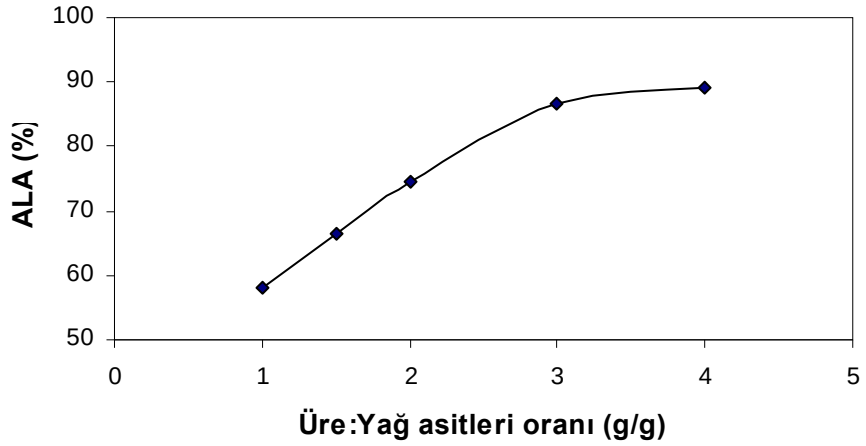
Çizelge 4.43'de görülen üre fraksiyonlama yöntemine göre elde edilmiş ekstratların yağ asitleri bileşimleri Çizelge 4.2 de verilen keten yağı yağı yağ asitleri bileşimi ile karşılaştırıldığında, orijinal yağda % 50,6 oranında bulunan ALA, fraksiyonlama sonucu ortamdaki üre miktarına bağlı olarak ekstraktlarda % 58-89 arasında değişmektedir. Rafinat fraksiyonlarında ise üre ile kompleks yapan ALA miktarının %40-46 arasında oldukça yüksek miktarlarda bulunduğu belirlenmiştir.

Yağ asitleri:üre oranında 3 seviye değerini belirlemek için ekstrat verimleri ve ekstratlardan ALA'nın kazanımları da incelenmeye alınmıştır. Değerlendirmeler Çizelge 4.45'de görülmektedir.

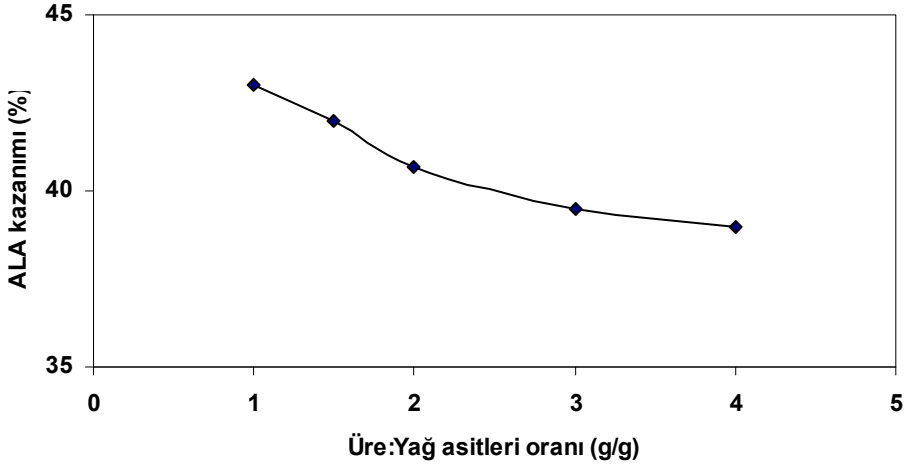
Çizelge 4.45: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, ALA içerikleri ile kazanımlarının yağ asitleri:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:5; süre 8 saat)

Ekstrat özellikleri	**YA:Üre 1:1 (g/g)**	**YA:Üre 1:1,5 (g/g)**	**YA:Üre 1:2 (g/g)**	**YA:Üre 1:3 (g/g)**	**YA:Üre 1:4 (g/g)**
Miktar (gram)	1,501	1,280	1,108	0,922	0,888
Ekstrat verimi (%)	37,5	32,0	27,7	23,1	22,2
ALA (%)	58,0	66,4	74,4	86,8	89,0
ALA kazanımı (%)	43,0	42,0	40,7	39,5	39,0

Çizelge 4.45 ‘de ortamdaki üre miktarının artmasıyla ekstrat miktarının önemli derecede azaldığı görülmektedir. Ekstratlarda üre artışı ile ALA zenginleşmesi olmaktadır. Ancak ekstratlarda ALA kazanım yüzdesinin düşüşü, ekstratlarda miktar olarak ALA’nın gittikçe azaldığını dolayısiyle rafinata geçen ALA miktarının önemli miktarda arttığını göstermektedir. Yağ asitleri:üre oranı için seviye değerlerinin seçiminde amaç, mümkün olduğu kadar yüksek ALA içerikli ve aynı zamanda yüksek ALA kazanımlı ekstratlar elde edebilmektir. Bu nedenle, ALA yüzdesinin ve kazanımının yağ asitleri:üre oranına göre değişimini daha açık bir şekilde görebilmek için, Çizelge 4.45’deki değerlerden Şekil 4.17 ve Şekil 4.18 oluşturulmuştur.



Şekil 4.17: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ALA içeriklerinin üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; üre:etanol oranı, 1:5; süre 8 saat)



Şekil 4.18: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ALA kazanımlarının üre:yağ asitleri oranı ile değişimi (T= 4 ^{o}C; üre:etanol oranı, 1:5; süre 8 saat)

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18 de görülen değişim eğrilerinden yağ asitleri:üre oranına için deneysel tasarımda kullanılacak seviye değerleri (kodları) belirlenmiştir. Deneysel tasarımda, yağ asitleri:üre oranları için minimum, optimum ve maksimum değerler 1:1,5, 1:2,5 ve 1:3,5 olarak seçilmiştir. Bu oran değerleri -1, 0 ve +1 değişken seviyelerine karşılık gelmektedir.

Yağ asitleri:üre oranı için kodlanan değişken seviyelerinin tespitinden sonra, üre:etanol (ağırlık/hacim) oranının seviye değerlerini belirlemek amacı ile ikinci seri ön fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Bu deneylerde, yağ asitleri:üre oranı 1:2,5 alınmıştır. Sekiz saatlik sürede üre:etanol oranları 1:5, 1:7, 1:8 ve 1:10 olarak değiştirilmiştir. Elde edilen ekstratların ve rafinatların gaz kromatografisi ile yağ asitleri bileşimleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.46 ve 4.47'de verilmiştir.

Çizelge 4.46: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:2,5; süre 8 saat)

Yağ asidi	**Bileşim (%)**			
	Üre:Etanol 1:5 (g/mL)	**Üre:Etanol 1:7 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:8 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:10 (g/mL)**
16:0	0,7	0,8	0,9	1,2
18:3 (ALA)	84,8	83,5	80,8	72,9
18:2	10,1	10,7	12,3	17,0
18:1	3,9	4,4	5,5	8,1
18:0	0,5	0,6	0,7	0,8

Çizelge 4.46'dan, üre:etanol oranının 1:5 den 1:10 'e yükseltilmesinin ekstratların yağ asitleri bileşimine olan etkisinin büyük olduğu anlaşılmaktadır. Ekstratlarda tek ve iki çift bağ içeren yağ asitlerinin yüzdesi 14'den 25'e yükselmiş, ALA ise %85'den %73'e düşmüştür. Reaksiyon ortamında etanolün artışı, alabalık ve çuha çiçeği yağ asitlerinin fraksiyonlanmasında anlatıldığı üzere, üre yağ asitleri komplekslerinin oluşumunu azaltmaktadır. Yeteri kadar üre ile katılım ürünü yapamayan doymuş yağ asitleri ile linoleik ve oleik asitler ekstratta artmaktadır. Dolayisiyle ekstratlardaki ALA yüzdesini düşürmektedir.

Çizelge 4.47: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:2,5; süre 8 saat)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	Üre:Etanol 1:5 (g/mL)	**Üre:Etanol 1:7 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:8 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:10 (g/mL)**
16:0	6,4	6,5	6,6	6,8
18:3 (ALA)	39,9	39,5	39,7	40,9
18:2	16,6	16,5	16,0	14,2
18:1	31,7	32,1	32,2	32,5
18:0	4,8	4,9	4,9	5,1
20:1	0,3	0,3	0,3	0,4
20:0	0,2	0,2	0,2	0,2

Rafinatların yağ asitleri bileşimleri incelendiğinde, ortamda etanol miktarının artmasıyla yağ asitleri bileşimlerinde önemli bir değişim olmadığı, ALA yüzdelerinde bir miktar artma olduğu gözlenmektedir.

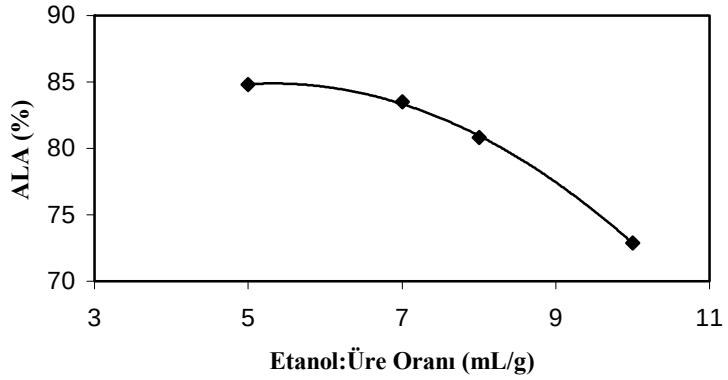
Üre:etanol oranında 3 seviye değerini belirlemek için yine ekstrat verimleri ve ekstratların ALA içerikleri ile kazanımları incelenmeye alınmıştır. Çizelge 4.48'de ekstrat verimleri, ekstratların ALA içerikleri ve bu yağ asidinin kazanım yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.48: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, ALA içerikleri ile kazanımlarının üre:etanol oranı ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:2,5; süre 8 saat)

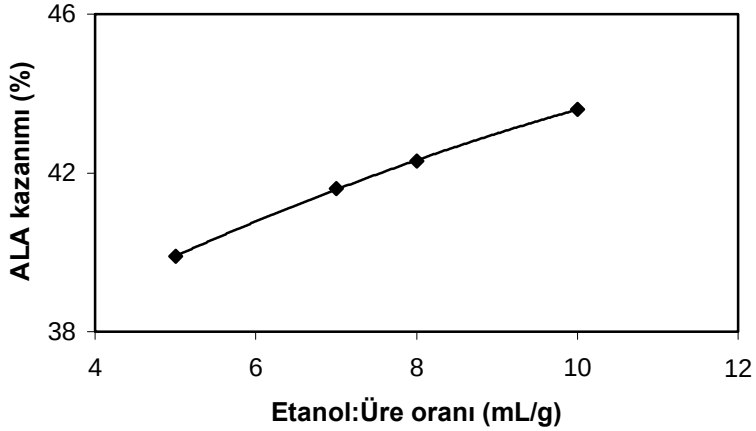
Ekstrat özellikleri	**Üre:Etanol 1:5 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:7 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:8 (g/mL)**	**Üre:Etanol 1:10 (g/mL)**
Miktar (gram)	0,952	1,007	1,060	1,210
Ekstrat verimi (%)	23,8	25,2	26,5	30,3
ALA (%)	84,8	83,5	80,8	72,9
ALA kazanımı (%)	39,9	41,6	42,3	43,6

Üre komplekslerinin oluşumunda üre:etanol oranının 1:5'den 1:7'e yükseltilmesi ekstrat miktarını, ALA zenginleşmesini ve ALA kazanımını çok az etkilemektedir. Üre:etanol oranının 1:7'dan daha yüksek değerlere yükseltilmesi ise ekstrat verimini ve ALA kazanımını arttırmaktadır.

Ekstratların mümkün olduğu kadar yüksek verimli ve yüksek ALA içerikli olması için üre:etanol oranı seviye değerlerini doğru seçmek amacıyla, Çizelge 4.48'deki ALA içerik ve kazanım değerlerinin üre:etanol oranı ile değişim eğrileri çizilmiş ve Şekil 4.19 ve 4.20'de gösterilmiştir.



Şekil 4.19: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ALA içeriklerinin etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:2,5; süre 8 saat)



Şekil 4.20: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ALA içeriklerinin etanol:üre oranı ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre oranı, 1:2,5; süre 8 saat)

Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'den etanol:üre oranı için deneysel tasarımda -1, 0 ve 1 kodlarına karşılık gelen seviye değerleri 1:5, 1:7 ve 1:9 olarak belirlenmiştir.

Son olarak bağımsız değişkenlerden reaksiyon süresi için değişken seviye değerlerini belirlemek amacı ile keten yağı yağ asitleri ile üçüncü seri ön üre fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Bu deneylerde, 4º C sıcaklıkta, keten yağı yağ asitleri:üre oranı 1:2,5 ve üre:etanol oranı 1:7 olacak şekilde hazırlanmış karışımlar kullanılmış ve kristalizasyon zamanı 2, 5, 8 ve 16 saat olarak seçilmiştir. Bu koşullarda reaksiyonlar yürütülmüş, ekstrat ve rafinat ürünleri elde edilmiş ve bu ürünlerin gaz kromatografisi ile belirlenen yağ asitleri bileşimleri Çizelge 4.49 ve Çizelge 4.50'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.49: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1:2,5; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:7)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	2 saat	5 saat	8 saat	16 saat
16:0	0,8	0,8	0,8	0,7
18:3 (ALA)	82,6	82,7	83,5	83,4
18:2	10,7	10,9	10,7	11,1
18:1	5,3	4,9	4,4	4,3
18:0	0,7	0,6	0,6	0,5

Çizelge 4.50: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen rafinatların yağ asidi bileşimlerinin zaman ile değişimi (T= 4^{o}C; yağ asitleri:üre (ağ/ağ) oranı, 1: 2,5; üre:etanol (ağ/h) oranı, 1:7)

Yağ asidi	Bileşim (%)			
	2 saat	5 saat	8 saat	16 saat
16:0	6,7	6,6	6,5	6,5
18:3 (ALA)	39,0	39,5	39,5	40,0
18:2	16,6	16,5	16,5	16,3
18:1	32,3	32,1	32,1	31,8
18:0	4,9	4,9	4,9	4,9
20:1	0,3	0,3	0,3	0,3
20:0	0,2	0,2	0,2	0,2

Çizelge 4.49 ve 4.50'un incelenmesiyle, zamanın ekstrat ve rafinat yağ asitleri bileşimlerine olan etkisinin az olduğu görülmektedir. Kristalizasyon zamanının 2 saatten 16 saate çıkarılması ekstrat ALA içeriğini ancak %1 arttırmıştır. Rafinat bileşimlerinden de üre ile kompleks yapan ALA miktarlarının zamanla çok az arttığı anlaşılmaktadır.

Kristalizasyon zamanı için 3 seviye değerini belirlemek amacı ile yine ekstrat verimleri ve ekstratların ALA içerikleri ile kazanımları incelenmiştir. Çizelge 4.51'de ekstrat verimleri ve ALA içerikleri ve ALA kazanım yüzdeleri verilmiştir.

Çizelge 4.51: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların verim, ALA içerikleri ile kazanımlarının zaman ile değişimi (T= 4^{o} C; yağ asitleri:üre oranı, 1:2,5, üre:etanol oranı, 1:7)

Ekstrat özellikleri	**2 saat**	**5 saat**	**8 saat**	**16 saat**
Miktar (gram)	1,067	1,027	1,007	0,9768
Ekstrat verimi (%)	26,7	25,7	25,2	24,4
ALA (%)	82,6	82,9	83,5	83,4
ALA kazanımı (%)	43,5	42,1	41,6	40,2

Çizelge 4.51'den zamanın ALA zenginleşmesine olan etkisinin çok az olduğu anlaşılmaktadır. 2 saatte ALA yüzdesi 82,6 iken 16 saat sonunda bu asit içeriği % 83,4 yükselmiştir. Buna karşılık zaman arttıkça hem ekstrat verimleri hem de ALA kazanım değerleri düşmektedir. Bu düşüşler zaman arttıkça üre ile kompleks yapan ALA miktarının arttığını da göstermektedir. Bu değerlendirmeler sonucunda, yüzey merkezli küp tasarımında zamanın parametre olarak incelenmesinden vaz geçilmiştir. Keten yağından ALA'ca zenginleşmiş ürünlerin eldesinde 2 değişkenli ve 3 seviye değerli tepki yüzey metodolojisine göre deneysel tasarım uygulanmasına karar verilmiştir. Kristalizasyon süresi olarak 2 saat seçilmiştir.

4.4.2 Keten yağı yağ asitlerinin fraksiyonlanması için Tepki Yüzey Metodolojisi'ne göre uygulanan deneysel tasarım ve reaksiyon parametrelerinin optimizasyonu

Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zenginleşmiş ürünlerin üre fraksiyonlama yöntemine göre eldesinde, reaksiyon parametrelerinin (yağ asitleri:üre oranı ve üre:etanol oranının) ürün ALA içeriğine olan etkilerinin incelenmesi ve optimum

koşulların belirlenmesinde bu kez 2 değişkenli, 3 seviyeli ve 11 özel tasarım noktası içeren Merkezi Bileşik Yüzey Merkezli Küp Tasarımı esaslarına göre çalışılmıştır. Deneylerin tasarımı için seçilmiş bağımsız değişkenlerin ve bu değişkenlerin Bölüm 4.4.1'de belirlenmiş seviye değerleri Çizelge 4.52'de topluca verilmiştir. Yüzey merkezli küp tasarımına göre belirlenen 2 değişkenli ve 3 seviye değerli deney tasarımını noktaları, kodları ve değerleri ise Çizelge 4.53'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.52: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden ALA'nin eldesinde, yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve kodlanan seviye değerleri

Bağımsız Değişkenler	**Kodlanan Değişken seviyeleri**		
	-1	0	+1
Yağ asitleri:Üre oranı (ağırlık/ağırlık)	1:1,5	1: 2,5	1:3,5
Üre:Etanol oranı (ağırlık/hacim)	1:5	1:7	1:9

Çizelge 4.53: Yüzey merkezli küp tasarımı deney tasarım noktaları

Deney No	**Üre:YA oranı (ağ./ağ.)**		**Etanol:Üre oranı (h/ağ.)**	
	Kod	**Değer**	**Kod**	**Değer**
1	-1	1,5	-1	5
2	-1	1,5	+1	9
3	+1	3,5	-1	5
4	+1	3,5	+1	9
5	-1	1,5	0	7
6	+1	3,5	0	7
7	0	2,5	-1	5
8	0	2,5	+1	9
9	0	2,5	0	7
10	0	2,5	0	7
11	0	2,5	0	7

Çizelge 4.53'de belirlenen koşullarda yürütülen 11 üre fraksiyonlama deneyi sonucunda keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ürünlerinin gaz kromatografisi ile belirlenen yağ asitleri bileşimleri Çizelge 4.54-4.56 de gruplar halinde verilmiştir.

Çizelge 4.54: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:Yağ asitleri oranı:1,5:1; Zaman:2 saat) (Deney No: 1, 2 ve 5 sonuçları)

YA	Etanol:Üre, 5:1		Etanol:Üre, 9:1		Etanol:Üre, 7:1	
	E1	**R1**	**E2**	**R2**	**E5**	**R5**
16:0	0,9	7,2	1,1	7,9	0,9	7,4
18:3 (ALA)	65,7	42,9	58,5	45,0	64,3	43,1
18:2	19,6	12,7	16,4	9,2	20,2	12,2
18:1	13,2	31,2	16,2	31,4	14,0	31,2
18:0	0,7	5,4	0,9	5,9	0,6	5,5
20:1	-	0,4	-	0,4	-	0,4
20:0	-	0,2	-	0,3	-	0,2

YA: Yağ asitleri; E: Ekstrat; R: Rafinat

Çizelge 4.55: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:Yağ asitleri oranı:3,5:1; Zaman:2 saat) (Deney No: 3, 4 ve 6 sonuçları)

YA	Etanol:Üre, 5:1		Etanol:Üre, 9:1		Etanol:Üre, 7:1	
	E3	**R3**	**E4**	**R4**	**E6**	**R6**
16:0	0,6	6,5	1,1	6,6	0,7	6,5
18:3 (ALA)	87,8	38,8	82,0	38,4	86,7	38,5
18:2	9,0	16,9	12,0	16,2	9,6	16,9
18:1	2,1	32,4	4,1	33,3	2,4	32,7
18:0	0,5	4,9	0,9	4,9	0,6	4,9
20:1	-	0,3	-	0,4	-	0,3
20:0	-	0,2	-	0,2	-	0,2

YA: Yağ asitleri; E: Ekstrat; R: Rafinat

Çizelge 4.56: Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstrat ve rafinatların yağ asitleri bileşimleri (Üre:Yağ asitleri oranı:2,5:1; Zaman:2 saat) (Deney No: 7-9 sonuçları)

YA	Etanol:Üre, 5:1		Etanol:Üre, 9:1		Etanol:Üre, 7:1	
	E7	R7	E8	R8	E9	R9
16:0	0,8	6,6	1,1	6,8	0,8	6,6
18:3 (ALA)	83,7	39,2	77,6	39,0	82,6	39,0
18:2	10,0	16,8	13,3	15,8	10,7	16,6
18:1	5,0	32,0	7,2	32,8	5,3	32,3
18:0	0,6	4,9	0,8	5,1	0,7	4,9
20:1	-	0,3	-	0,4	-	0,3
20:0	-	0,2	-	0,2	-	0,2

YA: Yağ asitleri; E: Ekstrat; R: Rafinat

Ekstratlara ve rafinatlara ait %ALA tepki değerleri Çizelge 4.57 ve Çizelge 4.58'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.57: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda ekstratlardan elde edilen tepki değerleri

Deney No	Değişken seviyeleri		Tepki değerleri
	Üre:YA[a] (X_1)	Etanol:Üre[b] (X_2)	ALA (%)
1	1,5	5	65,7
2	1,5	9	58,5
3	3,5	5	87,8
4	3,5	9	82,0
5	1,5	7	64,3
6	3,5	7	86,7
7	2,5	5	83,7
8	2,5	9	77,6
9	2,5	7	82,8
10	2,5	7	82,6
11	2,5	7	82,4

[a] Üre:Yağ asitleri oranı, ağırlık/ağırlık; [b] Etanol:üre oranı, hacim/ağırlık

Çizelge 4.58: Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda rafinatlardan elde edilen tepki değerleri

Deney No	Değişken seviyeleri		Tepki değerleri
	Üre:YA[a] (X_1)	Etanol:Üre[b] (X_2)	ALA (%)
1	1,5	5	42,9
2	1,5	9	45,0
3	3,5	5	38,8
4	3,5	9	38,4
5	1,5	7	43,1
6	3,5	7	38,5
7	2,5	5	39,2
8	2,5	9	39,0
9	2,5	7	39,0
10	2,5	7	39,3
11	2,5	7	38,8

[a] Üre:Yağ asitleri oranı, ağırlık/ağırlık; [b] Etanol:üre oranı, hacim/ağırlık

4.4.3 Farklı reaksiyon koşullarının keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesi üzerindeki etkilerinin istatiksel açıdan değerlendirilmesi

Çizelge 4.53'de verilen yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş üre fraksiyonlama deneyleri sonucunda ekstratlardan elde edilen tepki değerlerinin (% ALA) istatiksel analizi için Statistica 7.0 (Stat Soft® Inc.) paket programı kullanılmıştır. 2 değişken ve 3 seviye değerli yüzey merkezli deneysel tasarımda elde edilen tepkilerin değerlendirilmesinde Bölüm 3.2.5'de verilen 3.3 no.lu 2.dereceden polinom eşitliğinden yararlanılmıştır.

İlk olarak keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesinde, bağımsız değişkenler (üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı) ile %ALA tepki değeri arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahmini ve katsayıları programdan elde edilmiştir. Bu değerler Çizelge 4.59'da ve varyans analizi sonuçları ise Çizelge 4.60' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.59: Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesinde, bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları

	Etki	Standart hata	t değeri	p değeri	Katsayı
Ortalama/Kesişim	82,6105	0,099537	829,9458	0,000000[a]	82,61053
Lineer					
X_1	22,6667	0,158428	143,0724	0,000000[a]	11,33333
X_2	-6,3667	0,158428	-40,1865	0,000000[a]	-3,18333
Kuadratik					
X_{11}	-14,2526	0,243815	-58,4566	0,000000[a]	-7,12632
X_{22}	-3,9526	0,243815	-16,2116	0,000016[a]	-1,97632
Etkileşim					
X_{12}	0,7000	0,194034	3,6076	0,015419[b]	0,35000
R^2	0,999				

X_1= Üre:YA oranı (ağ/ağ) X_{12}= Üre:YA oranı*Etanol:Üre oranı
X_2= Etanol:Üre oranı (hacim/ağ)
X_{11} = Üre:YA oranı* Üre:YA oranı
X_{22}= Etanol:Üre oranı* Etanol:Üre oranı

[a] $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı
[b] $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

Çizelge 4.60: Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesinde varyans analizi (ANOVA) sonuçları

	Kareler toplamı	**Serbestlik derecesi**	**Kareler ortalaması**	**F değeri**	**p değeri**
Lineer					
X_1	770,667	1	770,6667	20469,71	0,000000[a]
X_2	60,802	1	60,8017	1614,96	0,000000[a]
Kuadratik					
X_{11}	128,654	1	128,6538	3417,18	0,000000[a]
X_{22}	9,895	1	9,8948	262,82	0,000016[a]
Etkileşim					
X_{12}	0,490	1	0,4900	13,01	0,015419[b]
Hata	1,888	5	0,0376		
Kareler toplamı	1001,787	10			

X_1= Üre:YA oranı (ağ/ağ) X_{12}= Üre:YA oranı*Etanol:Üre oranı
X_2= Etanol:Üre oranı (hacim/ağ)
X_{11} = Üre:YA oranı* Üre:YA oranı
X_{22}= Etanol:Üre oranı* Etanol:Üre oranı

[a] $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı
[b] $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı

Çizelge 4.59 incelendiğinde, ekstratların ALA içeriğine 1. derece terimler arasında etanol:üre oranının etkisinin negatif olduğu görülmektedir. % ALA değerine 1. derece terimlerden üre:yağ asitleri oranının etkisinin en yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Benzer şekilde 2. derece terimler için üre:yağ asitleri oranı en yüksek etki göstermektedir.

Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesinde, ürünün ALA yüzdesinin hesaplanması için oluşturulan ve 2. dereceden bir polinom olan model denklem aşağıda (4.3) eşitliğinde verilmiştir:

$$\% \text{ ALA} = 82{,}611 + 11{,}333*X_1 - 7{,}126*X_1^2 - 3{,}183*X_2 - 1{,}976*X_2^2 + 0{,}350\ X_1*X_2 \quad \textbf{(4.3)}$$

Varyans analiz sonuçları incelendiğinde X_{12} (üre:yağ asitleri oranı*etanol:üre oranı) lineer etkileşimi %95 ve diğer tüm terimler %99 güven aralığında anlamlıdır. Bu durum oluşturulan model denklemin katsayılarının istatistiki olarak %95 ve %99 doğru olduğunu gösterir. Çizelgelerde gösterilen *p* değeri anlamlılık testi için gerekli bir değerdir. Bu değer Statictica 7.0 programı aracılığı ile F_{tablo} değerinin $F_{hesaplanan}$ değeri ile kıyaslanması sonucunda bulunmuştur. Çizelgelerde gösterilen *p* değerlerinin 0,01'den ve 0.05'den düşük olması katsayıların %99 ve %95 güven aralığında doğru (anlamlı) olduğunu göstermektedir.

Keten yağı yağ asitlerinden ALA'in eldesi için oluşturulan model denklemin korelasyon katsayısı (R^2) 0,99 olarak bulunmuştur. Ayrıca deneysel değerler ve tahmin edilen değer arasındaki kalanlar toplamı 0,0376 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olması ve kalanlar toplamının neredeyse 0 olması oluşturulan model denklemin uygunluğunu desteklemektedir.

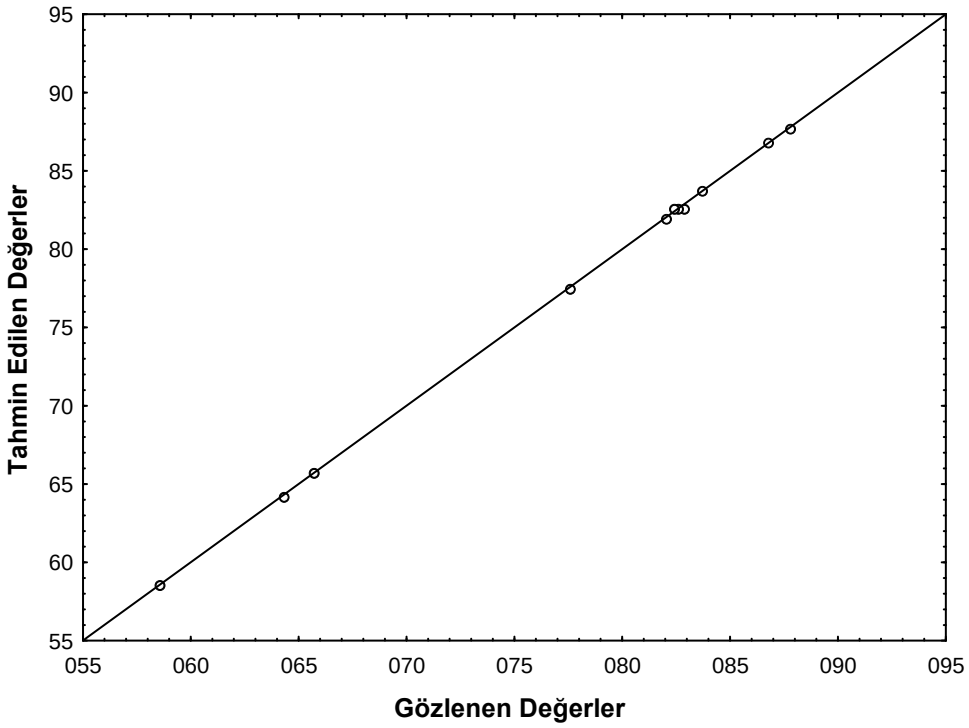
Oluşturulan Tepki Yüzey modelinde üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı olmak üzere 2 farklı bağımsız değişken için gözlenen minimum ve maksimum değerler ile kritik değerler Çizelge 4.61'de verilmiştir.

Çizelge 4.61: Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesinde bağımsız değişkenlerin kritik değerleri

	Gözlenen minimum değer	**Kritik değer**	**Gözlenen maksimum değer**
Üre:YA oranı (ağ/ağ)	1,5	**3,3**	3,5
Etanol:Üre oranı (h/ağ)	5,0	**5,5**	9,0

Tepki yüzey metodolojisine göre kritik koşullarda elde edilecek maksimum tepki değeri (ALA) % 88,19 olarak bulunmuştur.

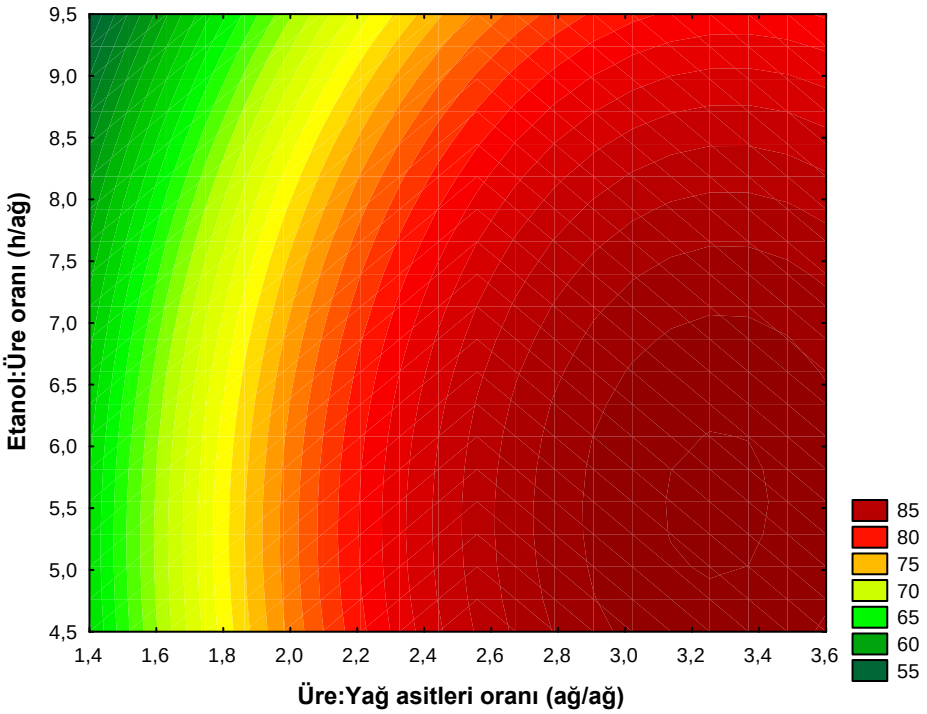
Model denklemden tahmin edilen değerler ile deneyler sonucu gözlenen değerler arasındaki ilişki ise Şekil 4.21'de verilmiştir.



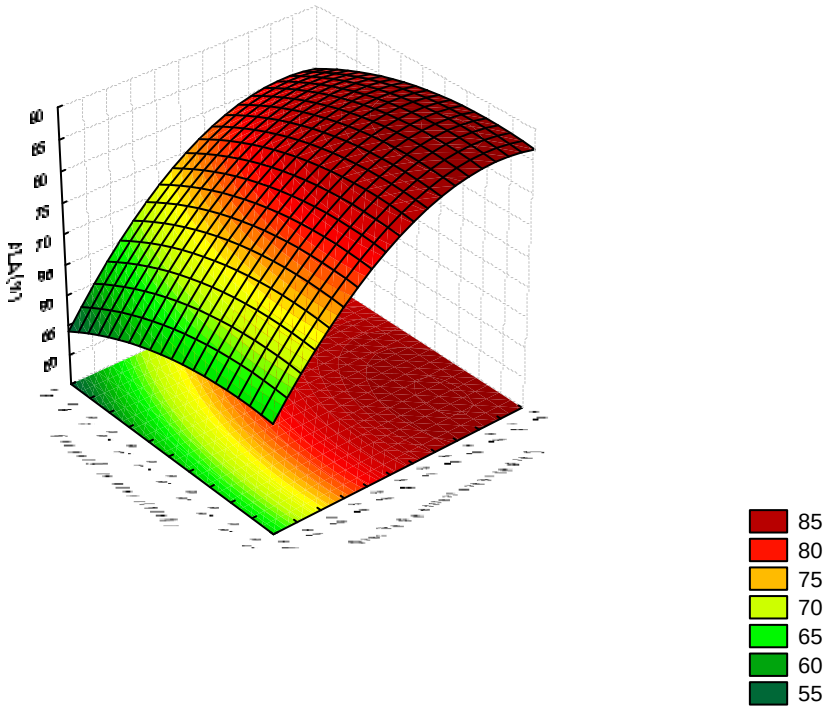
Şekil 4.21: Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesinde gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki

4.4.4 Keten yağı yağ asitlerinden ALA'ca zengin ürün eldesi için oluşturulan Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması

Üre fraksiyonlama yöntemine göre keten yağı yağ asitlerinden elde edilen ekstratların ALA içeriğinin, üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranına göre değişimini gösteren izdüşüm (Contour Plot) ve tepki-yüzey grafikleri (Response Surface) grafikleri Şekil 4.22 .a ve Şekil 4.22.b'de görülmektedir.



Şekil 4.22.a: Keten yağı ekstratları ALA içeriğinin Üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren izdüşüm grafiği



Şekil 4.22.b: Keten yağı ekstratları ALA içeriğinin üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren tepki yüzey grafiği

Şekil 4.22.a ve 4.22.b keten yağı ekstratlarının ALA içeriklerinin, üre:yağ asitleri oranı ve etanol:üre oranı ile değişimini gösteren izdüşüm ve tepki yüzey grafikleridir. Üre:yağ asitleri ve etanol:üre oranlarının %ALA üzerine etkileşiminden literatürde "Maksimum tepki" olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir. Bu izdüşüm grafiğinden keten yağı yağ asitlerinden % 85 ve üstünde ALA içeren ekstratların eldesi için, üre:yağ asitleri oranının 2,9 den büyük ve etanol:üre oranının ise 4,5-7,0 arasında olması gerektiği anlaşılmaktadır. Üre:yağ asitleri ve etanol:üre oranları için belirlenen kritik değerler (sırasıyla 3,3 ve 5,5 değerleri) hemen hemen merkez noktaya denk düşmektedir.

5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) yağından EPA ve DHA omega-3 yağ asitlerinin, çuha çiçeği (*Oenothera bienis*) yağından GLA omega-6 asitinin ve keten (*Linum usitatissimum*) yağından ALA esansiyel omega-3 asitinin üre fraksiyonlama yöntemi ile zenginleştirilmesi üzerinde çalışılmıştır. Çalışmalarda reaksiyon sıcaklığı +4 ºC olarak belirlenmiş ve normal bir soğutucuda bu sabit sıcaklıkta çalışmalar sürdürülmüştür. Bu süreçte tepki yüzey yöntemi ile yağ asitleri:üre oranı, üre:etanol oranı ve kristalizasyon zamanı gibi faktörlerin de reaksiyonlar üzerindeki etkileri incelenmiş ve reaksiyon parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ilk kısmında, alabalık, çuha çiçeği ve keten yağlarından serbest yağ asitleri elde edilmiş ve bunların yağ asitleri bileşimleri belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, alabalık yağının % 2,2 18:3, % 11,1 20:5 (EPA), % 0,8 20:4, % 15,9 22:6 (DHA) ve %1,0 22:5 asitleri olmak üzere toplam % 31,0 ÇDYA içerdiği saptanmıştır. Çuha çiçeği yağında % 10,4 GLA ve keten yağında ise % 50,6 ALA bulunduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızın ikinci bölümünde, alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'ce zengin ürünler elde etmek amacıyla, alabalık yağ asitleri etanollü ortamda üre ile fraksiyonlama işlemine tabi tutulmuştur. Tepki yüzey metodolojisine göre deney noktalarının tasarımını yapabilmek amacıyla, önce 3 bağımsız değişken (yağ asitleri:üre, üre:etanol oranları ve kristalizasyon süresi) için 3'er seviye değerleri ön üre fraksiyonlama deneyleri ile belirlenmiştir. Yağ asitleri:üre oranı için 1:2, 1:3, 1:4; üre:etanol oranı için 1:5, 1:7, 1:9 ve zaman için 1, 8, 15 saat değerleri -1, 0 ve +1 seviye değerleri olarak seçilmiştir. Seçilen bu 9 seviye değeri kullanılarak 3 değişken ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun 17 üre fraksiyonlama deneyi gerçekleştirilmiştir. Deneylerin sonunda elde edilen ürünlerin (ekstratların) % ÇDYA değerleri (tepki değerleri) Statistica 7.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. İstatiksel analiz sonucunda, tepki değerinin değişkenlere göre değişimini veren 2. dereceden bir polinom olan bir model denklem oluşturulmuştur. Gözlenen

değerlerle model denklemin verdiği tahmin değerler arasındaki lineer ilişkinin korelasyon katsayısı 0,99 olarak saptanmıştır.

Sonuçların istatiksel değerlendirilmesi ile ayrıca alabalık yağının üre fraksiyonlama yöntemi ile ÇDYA'ce zenginleştirilmesi için kritik (optimum) değerler, üre:yağ asitleri oranı 3,5, etanol:üre oranı 5,6 ve zaman 4,8 saat olarak belirlenmiştir. Tepki yüzey metodolojisine göre bu kritik koşullarda elde edilecek tepki değeri (ÇDYA) % 88,05 olarak bulunmuştur. Literatürde, Liu ve arkadaşlarının [127] ton balığı yağından DHA ve EPA zenginleştirilmesinde, üre:yağ asitleri oranı, kristalizasyon zamanı ve sıcaklığının bağımsız parametreler olarak seçilmiş ve tepki yüzey metodolojisine göre kritik değerler üre:yağ asitleri oranı 3,0, sıcaklık -5 ºC ve zaman 20 saat olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda % 85,0 EPA ve DHA içeren ürün elde edilmiştir. Wanasundara ve Shahidi'nin yaptığı bir çalışmada ise ayı balığı yağının tepki yüzey metodolojisine göre üre ile fraksiyonlanmasında, kritik koşullar olarak üre:yağ asitleri oranı 4,5, kristalizasyon sıcaklığı -10 ºC ve kristalizasyon zamanı 24 saat olarak tespit edilmiştir. Elde edilen ürünün EPA ve DHA içeriği % 88 bulunmuştur [128]. Bu literatür verileri ile bizim sonuçlarımız karşılaştırıldığında, alabalık yağından benzer zenginleşme derecesinde ÇDYA içeren ürünün çok daha kısa zamanda ve + 4 ºC da elde edilebileceği görülmektedir.

Çalışmamızın üçüncü bölümünde, çuha çiçeği yağı yağ asitlerinden GLA'ca zengin ürünler eldesi için çuha çiçeği yağ asitleri etanollü ortamda üre ile fraksiyonlama işlemine tabi tutulmuştur. Tepki yüzey metodolojisine göre deney noktalarının tasarımında aynı bağımsız değişkenler (yağ asitleri:üre, üre:etanol oranları ve kristalizasyon süresi) kullanılmıştır. Bu değişkenlerin seviye değerleri ön üre fraksiyonlama deneyleri ile belirlenmiştir. Yağ asitleri:üre oranı için 1:2,5, 1:3,25, 1:4; üre:etanol oranı için 1:5, 1:6,5, 1:8 ve zaman için 8, 16, 24 saat değerleri -1, 0 ve +1 seviye değerleri olarak seçilmiştir. Seçilen bu 9 seviye değeri kullanılarak 3 değişken ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun 17 üre fraksiyonlama deneyi gerçekleştirilmiştir. Deneylerin sonunda elde edilen ürünlerin (ekstratların) % GLA değerleri (tepki değerleri) yine Statistica 7.0 programı kullanılarak analiz edilmiştir. İstatiksel analiz sonucunda, tepki değerinin değişkenlere göre değişimini veren 2. dereceden bir polinom olan bir model denklem oluşturulmuştur. Gözlenen değerlerle model denklemin verdiği tahmin değerler arasındaki lineer ilişkinin korelasyon katsayısı 0,99 olarak saptanmıştır.

Çuha çiçeği yağının üre fraksiyonlama yöntemi ile GLA'ca zenginleştirilmesi için kritik (optimum) değerler, üre:yağ asitleri oranı 3,8, etanol:üre oranı 5,3 ve zaman 10,9 saat olarak belirlenmiştir. Tepki yüzey metodolojisine göre bu kritik koşullarda elde edilecek ürünün GLA içeriği % 42,7 olarak bulunmuştur. Literatürde çuha çiçeği yağının üre fraksiyonlama yöntemi ile GLA içeriğinin arttırılmasına dair bir çalışma olmadığından sonuçlarımızın karşılaştırılması yapılamamıştır.

Çalışmamızın son bölümünde ise keten yağı yağ asitlerinden üre fraksiyonlama yöntemine göre ALA'ca zenginleşmiş ürün eldesi üzerinde çalışılmıştır. Benzer şekilde yağ asitleri:üre, üre:etanol oranları ve kristalizasyon süresi bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Bu değişkenlerin tepki yüzey metodolojisinde kullanılacak 3'er seviye değerlerinin belirlenmesi için ön üre fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Bu deneylerde, yağ asitleri:üre ve üre:etanol oranlarının ürünlerin ALA içeriklerinin değişimde önemli etkisi olduğu, buna karşılık zamanın ALA zenginleşmesine olan etkisinin çok az olduğu belirlenmiştir. Bu değerlendirilmeler sonucunda, zaman değişkeninin deney tasarımında kullanılmasından vaz geçilmiştir. Yağ asitleri:üre oranı için 1:1,5, 1:2,5, 1:3,5 ve üre:etanol oranı için 1:5, 1:7, 1:9 değerleri -1, 0 ve +1 seviye değerleri olarak seçilmiştir. Seçilen bu 6 seviye değeri kullanılarak 2 değişken ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun 11 üre fraksiyonlama deneyi gerçekleştirilmiştir. Deneylerin sonunda elde edilen ürünlerin (ekstratların) % ALA değerlerinin (tepki değerlerinin) Statistica 7.0 programı ile istatiksel analizi sonucunda, tepki değerinin değişkenlere göre değişimini veren 2. dereceden bir polinom olan bir model denklem oluşturulmuştur. Gözlenen değerlerle model denklemin verdiği tahmin değerler arasındaki lineer ilişkinin korelasyon katsayısı 0,99 olarak saptanmıştır.

Keten yağının üre fraksiyonlama yöntemi ile ALA'ca zenginleştirilmesi için kritik (optimum) değerler, üre:yağ asitleri oranı 3,3 ve etanol:üre oranı 5,5 olarak belirlenmiştir. Tepki yüzey metodolojisine göre bu kritik koşullarda elde edilecek ürünün ALA içeriği % 88,19 olarak bulunmuştur. Literatürde keten yağından üre fraksiyonlama yöntemine göre ALA içeriği yüksek ürün eldesinde tepki yüzey metodolojisi kullanımı ile optimizasyonu üzerinde yapılmış bir çalışmaya bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışma sonucunda ele geçen verilerin karşılaştırılması yapılamamıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada ilk kez alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), çuha çiçeği (*Oenothera bienis*) ve keten (*Linum usitatissimum*) yağları yağ asitlerinden üre fraksiyonlama yöntemi ile sırasıyla EPA ve DHA, GLA ve ALA'ca zenginleşmiş ürünler elde edilmiştir. Fraksiyonlama işlemleri tepki yüzey metodolojisi esaslarına göre yapılmış ve reaksiyon koşulları optimize edilmiştir. Optimum koşullarda, balık yağından % 88,1 ÇDYA (EPA, DHA, 18:3, 20:4 ve 22:5 karışımı), çuha çiçeği yağından % 42,7 GLA ve keten yağından % 88,2 ALA içerikli ürünler elde edilebilecektir.

Çalışmalarımızda üre-yağ asitleri katılım ürünlerinin kristalizasyonu +4 ºC'da gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın devamında oda sıcaklığında katılım ürünlerinin oluşumunun incelenmesi önerilmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçların bilimsel literatüre katkısı yüksek olacaktır. Bu ürünler omega-3 ve omega-6 çoklu doymamış yağ asitlerince zengin olduklarından gıda formülasyonlarında kullanılabilir ve sağlık desteği olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

[1] **Anonim,** 2006. Obesity and overweight, World Health Organization, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/print.html.

[2] **Anonim,** 2007. Cardiovasculer diseases, World Health Organization, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/print.html.

[3] **Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J. and Parmentier, M.,** 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils regard to their nutritional potential, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **109**, 710-732.

[4] **Waruda, D., Joshi, K. and Harsulkar, A.,** 2006. Polyunsaturated fatty acids: Biotechnology , *Critical Reviews in Biotechnology*, **26**, 83-93.

[5] **Aydın, A.,** 2004. Sağlığımız ve omega-3 yağ asitleri, *İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sağlıkta ve Hastalıkta Beslenme Sempozyum Dizisi,* No:**41**, 181-189.

[6] **İşleroğlu, H. and Yıldırım, Z.,** 2005. Fonksiyonel bir gıda olarak keten tohumu, *Gaziosmanpaşa Üniverstesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **22**, 23-30.

[7] **Brown, A.,** 2000. Understanding food, fish and shellfish. pp. 299-318. Wadsworth/Thomson Learning, USA.

[8] **Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H. and Michaelsen K.F.,** 2001. The essentiality of brain and retina, *Progress of Lipid Research,* **40**, 1-94.

[9] **Calabrase, J.P.,** 1999. Fish oil and bipolar disorder, *Archives of General Psychicatry,* **56,** 413-414.

[10] **Stoll, A.L.,** 1999. Omega-3 fatty acids in bipolar disorder, *Archives of General Psychicatry,* **56,** 407-412.

[11] **Sinclair, H.M.,** 1982. The relative importance of essential fatty acids of the linoleic and linolenic families: studies with an eskimo diet, *Progress of Lipid Research,* **20,** 897-899.

[12] **Lee, K.W. and Lip, G.Y.H.,** 2003. The role of omega-3 fatty acids in the secondary prevention of cardiovascular disease, *Journal of Medicine,* **96**, 465-480.

[13] **Dyerberg, J. and Bang, H.O.,** 1979. Hemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos, *Lancet*, 433-435.

[14] **Calder, P.C.,** 2004. n-3 Fatty acids and cardiovascular disease: Evidence explained and mechanisms explored, *Clinical Science,* **107**, 1-11.

[15] **Norday, A.,** 2001. Fish consumption and cardiovascular disease, *European Heart Journal, Supplements,* **3,** D4-D7.

[16] **Undeland, I., Ellegard, L. and Sandberg, A.S.,** 2004. Fish and cardiovascular health, *Scandinavian Journal of Nutrition,* **48**, 119-130.

[17] **Zhang, J., Sasaki, S., Amano, K. and Kesteloot, H.,** 1999. Fish consumption and mortality from all causes, ischemic heart disease, and stroke: An ecological study, *American Journal of Preventive Medicine,* **28**, 520-529.

[18] **Sankers, G.W., Kromhout, D., Aravanis, C., Bloeberg, B.P., Mensink R.P., Karalias N. and Katan, M.B.,** 1993. Serum cholesteryl ester fatty acids and their relation with serum lipids in elderly men in crete and the Netherlands, *European Journal of Clinical Nutrition,* **47**, 201-8.

[19] **Daviglus, M.L., Stamler, J., Orencia, A.J., Dyer, A. R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M.K., Morris, D. and Shekelle, R.B.,** 1997. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction, *The New England Journal of Medicine,* **336**, 1046-53.

[20] **Burr, M.L., Fehily, A.M., Gilbert, J.F., Rogers, S., Holiday, R.M., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C. and Deadmen, N.M.,** 1989. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: Diet and reinfarction trial (DART), *Lancet,* **2**, 757-761.

[21] **Mozaffarian, D., Lemaitre, R. N. and Kuller, L. H.,** 2003. Cardiac benefits of fish consumption may depend on the type of fish meal consumed, *Circulation,* **107**, 1372-1377.

[22] **Christensen, J. H.,** 2001. Marine n-3 fatty acids, wine intake, and heart rate variability in patients referred for coronary angiography, *Circulation*, **103,** 651.

[23] **Rondeau, E.B., Gascon, A., Bergeron, J. and Jacques, H.,** 2003. Plasma lipids and lipoproteins in hypercholesterolemic men fed a lipid-lowering diet containing lean beef, lean fish, or poultry, *American Journal of Clinical Nutrition,* **77,** 587-593.

[24] **Dewailly, E., Blanchet, C., Gingras, S., Lemieus, S. and Holub, B.J.,** 2003. Fish consumption and blood lipids in three ethnic groups of Quebec (Canada), *Lipids,* **38**, 359-365.

[25] **Lauritzen, L., Hansen, H. S., Jorgensen, M. H. and Michaelsen, K. F.,** 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina, *Progress in Lipid Research,* **40**, 1-94.

[26] **Tanskanen, A., Hibbeln, J.R., Hintikka, J., Haatainen, K., Honkalampi, K. And Viinanaki, H.,** 2001. Fish consumption, depression, and suicidatily in a general population, *Archives of General Psychiatry*, **58,** 512-513.

[27] **Arnold, L.E.,** 2001. Alternative treatments for adults with ADHD, *Annals of The New York Academy of Sciences,* **931**, 310-341.

[28] **SanGiovanni, J.P., Parra-Cabrera, S., Colditz, G.A., Berkey, C.S. and Dwyer, J.T.,** 2000. Meta-analysis of dietary essential fatty acids and long chain polyunsaturated fatty acids as they relate visual resolution acuity in healthy preterm infants, *Pediatrics*, **105,** 1292-1298.

[29] **SanGiovanni, J.P., Berkey, C.S., Dwyer, J.T. and Colditz, G.A.,** 2000. Dietary essential fatty acids, long chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: A systematic review, *Early Human Development,* **57**, 165-188.

[30] **Conquer, J.A.,** 2000. Fatty acids analysis of blood plasma of patient with alzheimer's disease, other type of dementia, and cognitive impairment, *Lipids*, **35,** 1305-1312.

[31] **Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Wilson, R.S., Aggarwal, N. and Schneider, M.D.,** 2003. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident alzheimer disease, *Archives of Neurology,* **60**, 940-946.

[32] **Edwards, R.,** 1998. Omega-3 polyunsaturated fatty acid levels in the diet and in red blood cell membranes of depressed patients, *Journal of Affective Disorders,* **48**, 149-155.

[33] **Tiemeier, H. and Tuijl, H.R.,** 2003. Plasma fatty acid composition and depression are associated in the elderly: The Rotterdam study, *American Journal Clinical Nutrition,* **78**, 40-46.

[34] **Peet, M.,** 2003. Eicosapentaenoic acid in the treatment of schizophrenia and depression: rationale and preliminary double-blind clinical trial results, *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **69,** 477-485.

[35] **Small, M.F.,** 2002. The happy fat, *New Scientist*, **24**, 34-37.

[36] **Hibbeln, J.R.,** 1998. Fish consumption and major depression, *Lancet*, **351,** 1213.

[37] **Bruinsma, K.A. and Taren, D.L.,** 2000. Dieting essential fatty acid intake, and depression, *Nutrition Reviews*, **58**, 98-108.

[38] **Cleland, L.G. and James, M.J.,** 2000. Fish oil and rheumatoid arthritis: antiinflamatory and collateral health benefits, *The Journal of Rheumatology*, **27**, 2305-7.

[39] **Cleland, L.G., James, M.J. and Proudman, S.M.,** 2003. The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis, *Drugs,* **63,** 845-853.

[40] **Sies, H. and Stahl, W.,** 2004. Nutritional protection against skin damage from sunlight, *Annual Review of Nutrition,* **24,** 173-200.

[41] **Rhodes, L.E.,** 2004. Preventive oncology, *Lancet,* **363**, 1736-1737.

[42] **Jackson, M.J., Storey, A., Jones, S.A., McArdle, A. and Rhodes, L.E.,** Effects of micronutrient supplements on U.V.-induced skin damage, *Proceedings of the Nutrition Society,* **61,** 187-189.

[43] **Bittiner, S.B., Tucker, W.F.G., Cartwright, I. and Bleehen, S.S.,** 1988. A double-blind, randomised, placebo controlled trial of fish oil in Psoriasis, *Lancet,* **1,** 378-380.

[44] **Dewsbury, C.E., Graham, P. and Darley, C.R.,** 1989. Topical eicosapentaenoic acid S(EPA) in the treatment of psoriasis, *British Journal of Dermatology*, **120**, 580-584.

[45] **Sidhu, K.,** 2003. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil, *Regulatory Toxicology and Pharmacology,* **38**, 336-344.

[46] **Hu, F.B., Cho, E., Rexrode, K.M., Albert, C.M. and Manson, J.E.,** 2003. Fish and long-chain ω-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease and total mortality in diabetic women, *Circulation,* **107**, 1852-1857

[47] **Terry, P.D., Rohan, T.E. and Wolk, A.,** 2003. Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: A review of the epidemiologic evidence, *American Journal Clinical Nutrition,* **77**, 532-543.

[48] **Kune, G.A.,** 1990. Eating fish protects against some cancers: Epidemiological and experimental evidence for a hypothesis, *Journal of Nutritional Medicine*, **1,** 139-145.

[49] **Stripp, C., Overvad, K., Christensen, J., Thomsen, B.L., Olsen, A., Moller, S. and Tjonneland, A.,** 2003. Fish intake is positively associated with breast cancer incidence rate, *Journal of Nutrition*, **133**, 3664-3669.

[50] **Teryy, P., Rohan, T. E., Wolk, A., Maehle-Schmidt, M. and Magnusson, C.,** 2002. Fish consumption and breast cancer risk, *Nutrition and Cancer*, **44,** 1-6.

[51] **Kobayashi, M., Sasaki, S., Hamada, G.S. and Tsugana, S.,** 1999. Serum n-3 fatty acids, fish consumption and cancer mortality in six Japanese populations in Japan and Brazil, *Japanese Journal of Cancer Research*, **90,** 914-921.

[52] **Takemura, Y., Sakurai, Y., Honjo, S., Yokimatsu, A., Gibo, M., Hara, T., Kusakari, A. and Kugai, N.,** 2002. The relationship between fish intake and prevalence of asthma: The Tokorozawa childhood asthma and pollinosis study, *Preventive Medicine,* **34,** 221-225.

[53] **Woods, R.K., Thien, F.C. and Abramson, M.J.,** 2002. Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma, *Cochrane Database Systematic Reviews,* **3**, CD001283.

[54] **Woods, R.K., Thien, F.C. and Abramson, M.J.,** 2002. Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma in adults and children, *Cochrane Database Systematic Reviews,* **3,** CD001283.

[55] **Kutner, N.G., Clow, P.W., Zhang, R. and Aviles, X.,** 2002. Association of fish intake and survival in a cohort of incident dialysis patients, *American Journal of Disease of Children*, **39,** 1018-1024.

[56] **Riber, C., Wojdemann, M., Bisgaard, T., Ingels, H., Rehfeld, J.F. and Olsen, O.,** 1999. Fish oil reduces gastric acid secretion, *Scandinavian Journal Gastroenterology*, **9**, 845-848.

[57] **Wu, D., and Meydani, S.N.,** 1996. γ-Linolenic acid and immune function. in γ-linolenic acid: Metabolism and its roles in nutrition and medicine, pp.106-117, edited by Huang, Y.-S., and Mills, D. E., *AOCS Press, Champaign.*

[58] **Horribon, D.F.,** 1992. Nutritional and medical importance of gamma-linolenic acid, *Progress in Lipid Research,* **31**, 163-194.

[59] **Newton, I. S.,** 1997. Polyunsaturated fatty acids in diet and health, *Chemistry &Industry,* **8,** 302-305.

[60] **Fukuda, N., Hioki, K., Etoh, T., Hidaka, T., Ikeda, I. and Sugano, M.,** 1992. Comparisons of the effects of dietary fats on serum and liver lipid levels of rats, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry,* **56**, 816-817.

[61] **Engler, M.E. and Engler, M.B.,** 1998. The effects of dietary evening primrose black currant, borage, and fungal oils on plasma, hepatic and vascular tissue fatty acid composition in the spontaneously hypertensive rat, *Nutrition Research,* **18,** 1533-1544.

[62] **Ramesh, G. and Das, U.N.,** 1998. Effect of evening primrose and fish oils on two stage skin carcinogenesis in mice, *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids,* **59,** 155-161.

[63] **Munoz, S.E., Piegari, M., Guzman, C.A. and Eynard, A.R.,** 1999. Differential effects of dietary oenothera, zizyphus mistol and corn oils, and essential fatty acid deficiency on the progression of a murine mammary gland adenocarcinoma, *Nutrition,* **15**, 208-212.

[64] **Stark, A.H., Crawford, M.A. and Reifen, R.,** 2008. Update on alpha-linolenic acid, *Nutrition reviews*, **66**, 326-332.

[65] **De Longeril, M. and Salen, P.,** 2004. Use and misuse of dietary fatty acids for the prevention and treatment of coronary heart disease, *Reproduction Nutrition Development*, **44**, 283-288.

[66] **Simopoulos, A.P.,** 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **70,** 560S-569S.

[67] **Vijaimohan, K., Jainu, M., Sabitha, K. E., Subramaniyam, S., Anandhan, C. and Devi, C.S.S.**, 2006. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats, *Life Sciences*, **79**, 448-454.

[68] **Bloedon, L.T., Balikai, S., Chittams, J., Cunnane, S.C., Berlin, J.A., Rader, D.J. and Szapary, P.O.,** 2008. Flaxseed and cardiovascular risk factors: Results from a double blind, randomized, controlled clinical trial, *Journal of the American College of Nutrition*, **27**, 65-74.

[69] **Paschos, G.K., Magros, F., Panagiotakos, D.B., Votteas, V. and Zampelas, A.,** 2007. Dietary supplementation with flaxseed oil lowers blood pressure in dyslipidaemic patients, *European Journal of Clinical Nutrition*, **61**, 1201-1206.

[70] **Gordon, D.T. and Ratliff, V.,** 1992 .The implications of omega-3 fatty acids in human health, Advances in seafood biochemistry composition and quality, pp. 69-98, Ed. by R.E. Martin, G.L. Flick, Technomic Publishing C. Inc.

[71] **United Nations Food and Agriculture Organization (FAO),** 2007. World production of fish oil, faostat and fishtat databases.

[72] **Baysal, A.,** 2002. *Beslenme*. Hatipoglu Yayınevi, Ankara.

[73] **Sebedio, J.L.,** 1996. Marine oils, pp. 270-271, Oils and fat manual, a comprehensive treatise, properties-production-applications, Ed. by A. Karleskind, J.P. Wollf, Intercept Limited, İngiltere.

[74] **Besler, H.T. and Coşkun, T.,** 2006. Uzun zincirli yağ asitlerinin kimyasal özellikleri ve sağlıkla olan etkileşimi, *Katkı Pediatri Dergisi*, **28**, 5-20.

[75] **Anonim,** 2007. Büyük benekli alabalık, http://www.tr.wikipedia.org/wiki/Büyük_benekli-alabalık, 16.07.2008.

[76] **Tar-Get tarım ve hayvancılık,** 2007. Alabalık yetiştiriciliği, http://www.tarimsal.com/alabalık.htm, 17.07.2008.

[77] **Tarımsal üretim ve geliştirme genel müdürlüğü,** 2007. Su ürünleri üretimini geliştirme projesi, http://www.tugem.gov.tr, 12.07.2008.

[78] **Boran Ş.,** 2007. İzmir ticaret odası, AR&GE Bülteni, Şubat-Sektörel, 17-20.

[79] **Gunstone, F.D.,** 1992. Gamma-linolenic acid-occurrence and physical and chemical properties, *Progress in Lipid Research,* **31**, 145-161.

[80] **Gunstone, F.D.,** 1997. The availability of polyunsaturated fatty acids, *Lipid Technology,* **9,** 91-94.

[81] **Kendrick, A. and Radledge, C.,** 1990. Microbial lipid technology: Microbial formation of polyunsaturated fatty acids, *Lipid Technology,* **2,** 62-66

[82] **Funtikova, N.S., Kulakova, S.N., Medvedev, F.A., Konova, I.V. and Levachev, M.M.,** 1992. Mucor 12 m- a prospective source of gamma-linolenic acid, *Applied Biochemistry and Microbiology,* **28**, 110-113

[83] **Helme, J.P.,** 1996. Evening primrose, borage, and blackcurrent seeds, pp. 168-179, Oils and fat manual, a comprehensive treatise, properties-production-applications, Ed. by A. Karleskind, J.P. Wollf, Intercept Limited, İngiltere.

[84] **Favati, F., King, J.W. and Mazzanti, M.,** 1991 Supercritical carbon dioxide extraction of evening primrose oil, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **68,** 422-427

[85] **Uzan, A., Helme, J.P. and Klein, J.M.,** 1992. Fatty acid composition and quality data for oils rich in GLA, *Revue Francaise des Corps Gras,* **39**, 339-343.

[86] **Rio, M., Fernandez-Martinez, J. and Haro, A.,** 1993. Wild and cultivated borage officinalis l: Sources of gamma-linoleic acid, *Grasas y Aceitas,* **44**, 125-126.

[87] **Sensidoni, A., Bortolussi, G., Orlando, C., Lognay, G., Santi, R. and Fantozzi, P.,** 1994. Borage oil (*borago officinalis* l): An important source of gamma-linolenic acid. I. compositive characteristics and oxidative stability of oils extracted by different techniques and mixed with extra virgin olive oil, *Industrie Alimentari,* **33,** 1121-1127.

[88] **Ucciani, E., Mallet, G. and Gamisns, J.,** 1992. Borage pygmea:A new source of gamma-linolenic acid, *Revue Francaise de Corps Gras,* **39,** 135-138.

[89] **Zadernowski, R., Lossow, B., Nowak-Polakowska, H. and Nesterowicz, J.,** 1995. Fruits of berry plants as a source of bio-oils, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences,* **45**, 55-69.

[90] **Hansen, C.E., Stoessel, P. and Rossi, P.,** 1991. Distribution of gamma-linolenic acid in the cofrey (*symphytum officinale*) plant, *Journal of the Science of Food and Agriculture,* **54,** 309-312.

[91] **Gao, Y. and Fan, T.,** 1998. Microula-a new resource of vegetable oil rich in gamma-linolenic acid, *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,* **13**, 22-24.

[92] **Krist, S., Stuebiger, G., Bail, S. and Unterweger, H.,** 2006. Analysis of volatile compounds and triacylglycerol composition of fatty seed oil gained from flax and false flax, *European Journal of Lipid Science and Technology,* **108**, 48-64.

[93] **Przybylski, R.,** 2005. Flaxseed oil and high linolenic oils, pp.281-301, Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Ed. F. Shahidi, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

[94] **Baytop, T.,** 1984. *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi*, Nobel Tıp Kitabevleri, Istanbul.

[95] **Jackson, D. and Bergeron, K.,** 1997. Perilla, *perilla frutescens*, http://www.altnature.com/gallery/perilla.htm, 12.07.2008.

[96] **Brenner, D.,** 1998. Perilla, http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/perilla.html, 12.07.2008.

[97] **Artvin Ansiklopedisi,** 2006. Perilla frutescens, http://www.artvinansiklopedisi.com/index.php/Perilla-frutenscens, 12.07.2008.

[98] **Anonim,** 2008. Chromatografic and extraction techniques, http://www.faqs.org/faqs/sci/chem-faq/part5/section-5.html

[99] **Anonim,** 2008. History of the developments of fatty acid separation techniques, http://www.cyberlipid.org/fattyt/fatt0008.htm

[100] **Timms, R. E**., 2005. Fractional crystallisation-the fat modification process for the 21st century, *European Journal of Lipid Science and Technology,* **107**, 48-57.

[101] **Sharma, R., Christi, Y. and Banerjee, C**., 2001. Production, purification, characterization, and application of lipases, *Biotechnology Advances,* **19**, 627-662.

[102] **Kuo, T.M. and Gardner, H.W**., 2002. Lipid Biotechnology, Marcel Decker, Inc., New York-Basel.

[103] **Bengen, M.F.,** 1951. Mein weg zu den neuen harnstoff-einschluss-verbindungen, *Angewande Chemie* , **63**, 207-208.

[104] **Hayes**, **D.G., Van Alstine, J.M. and Setterwall, F.** 2000. Urea-based fractionation of seed oil samples containing fatty acids and acylglycerols of polyunsaturated and hydroxy fatty acids, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **77,** 207-213.

[105] **Hayes, D.G**., **Bengtsson, Y.C., Van Alstine, J.M. and Setterwall, F.** 1998. Urea complexation for the rapid, ecologically responsible fractionation of fatty acids from seed oil, *Journal of the American Oil Chemists Society*, **75**, 1403-1409.

[106] **Hayes, D.G***,* 2002. Free fatty acid fractionation via urea inclusion compounds, *Inform*, **13**, 832-834.

[107] **Luthria, D.L.,** 2001. Process for making an enriched mixture of polyunsaturated fatty acid esters, *European Patent Office*. Publication number WO/2001/051598

[108] **Wilson, R., Henderson, R.J., Burkow, I.C. and Sargent, J.R.,** 1993. The enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids using aminopropyl solid phase extraction column, *Lipids,* **28,** 51-4.

[109] **Abe, Y. and Tanaka, M.,** 1984. Concentration of ethyl eicosapentaoate from Japanase sardine oil by a molecular sieve column, *Fette, Seifen, Anstrichmittel,* **86,** 8-10

[110] **Chen, T.C. and Ju, Y.H.,** 2002. Concentration of n-3 PUFA in saponified menhaden oil by fractional solvent crystallization, *Journal of the Chienese Institute of Chemical Engineers,* **33**, 143-147.

[111] **Mishra, V.K., Temelli, F. and Ooraikul, B.,**1993. Extraction and purification of ω-3 fatty acids with an emphasis on supercritical fluid extraction-a review, *Food Research International,* **26,** 217-226.

[112] **Nilsson, W.B., Gauglitz, E.J., Hudson, J.K., Stout, V.F. and Spinelli, J.,** 1988. fractionation of menhaden oil ethyl esters using supercritical fluid CO2, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **65,** 109-117.

[113] **Jachmanian, I., Margenat, L., Torres, A.I. and Grompone, M.A**., 2007. Selectivity of supercritical CO2 in the fractionation of hake liver oil ethyl esters, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **84,** 597-601.

[114] **Wanasundara, U.N. and Shahidi, F.,** 1998. Concentration ω-3 polyunsaturated fatty acids of marine oils using candida cylindracea lipase: optimization of reaction conditions, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **75,** 1767-1774.

[115] **Robles, V.J., Garcia, H.S., Monroy, J.A. and Angulo, O.,** 1998. Lipase-catalyzed esterification of glycerol with n-3 polyunsaturated fatty acids from winterized fish oil, *Food Scienc*e *and Technology International,* **4,** 401-405.

[116] **Üstün, G., Güner, S., Arer, G., Türkay, S. and Erciyes, A.T.,** 1997. Enzymatic hydrolysis of anchovy oil: Production of glycerides enriched in polyunsaturated fatty acids, *Applied Biochemistry and Biotechnology,* **68,** 171-186.

[117] **Okada, T. and Morrissey, M. T.**, 2007. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis, *Food Chemistry*, **103**, 1411-1419.

[118] **Lyberg, A. M. and Adlercreutz, P**., 2008. Lipase-catalyzed enrichment of DHA and EPA in acylglycerols resulting from squid oil ethanolysis, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 317-324.

[119] **Schmitt-Rozieres, M., Deyris, V. and Comeau, L. C.,** 2000. Enrichment of polyunsaturated fatty acids from sardine cannery effluents by enzymatic selective esterification. *Journal of the American Oil Chemists Society,* **77,** 329-332.

[120] **Revankar, G.D.,** 1974. Fractionation of fatty acids of sardine oil by urea adduct method, *Journal of Food Science and Technology,* **11,** 27-8.

[121] **Wille, H. J., Traitler, H. and Kelly, M.,** 1987. Production of polyenoic fish oil fatty acids by combined urea fractionation and industrial-scale HPLC, *Revue française des corps,* **34**, 69-74.

[122] **Ratnayake, W.M.N., Olsson, B., Matthews, D. and Ackman, R.G.,** 1988. Preparation of omega-3 PUFA concentrates from fish oils via urea Complexation, *Fat Science and Technology,* **90,** 381-386

[123] **Grompone, M.A.,** 1992. Enrichment of omega-3 PUFAs from fur seal oil, *Fat Science and Technology,* **94**, 388-394.

[124] **Zuta, C.P., Simpson, B.K., Chan, H.M. and Phillips, L.,** 2003. Concentrating PUFA from mackerel processing waste, *Journal of the American Oil Chemists Society***, 80** , 933-936.

[125] **Kojima, Y., Sakuradani, E. and Shimizu, S.,** 2006. Different specificity of wo types pseudomonas lipases for C20 fatty acids with a Δ5 unsaturated double bond and their application for selective concentration of fatty acids. *Journal of Bioscience and bioengineering* **101**, 496-500

[126] **Senanayake, N.S.P.J. and Shahidi, F.,** 2000. Concentration of docosahexaenoic acid from algal oil via urea complexation. *Journal of Food Lipids*, **7**, 51-61.

[127] **Liu, S., Zhang, C., Hong, P. and Ji, H.,** 2006. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: Optimization of process parameters. *Journal of Food Engineering*, **73** , 203-209.

[128] **Wanasundara, U.N. and Shahidi, F.,** 1999. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. *Food Chemistry*, **65**, 41-49.

[129] **Arai, M., Fukuta, H. and Morikwa, H.,** 1987. Selective separation of γ-linolenic acid ether ester using y-zeolite, *Journal Fermentation Technology,* **65,** 569-573.

[130] **Guil-Guerrero, J.L., Campra-Madrid, P. and Belarbi, H.,** 2000. γ-Linolenic acid purification from seed oil sources by argentated silica gel chromatography column, *Process Biochemistry*, **36**, 314-354.

[131] **Sajilata, M.G., Singhal, R.S. and Kamat, M.Y**., 2008. Fractionation of lipids and purification of γ-linolenic acid (GLA) from spirulina platensis, *Food Chemistry*, **109**, 580-586.

[132] **Ju, Y.H. and Chen, T.C**., 2002. High-purity gamma-linolenic acid from borage oil fatty acids, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **79**, 29-32.

[133] **Lopez-Martinez, J.C., Campra-Madrid, P. and Guil-Guerrero, J.L.,** 2004. γ-Linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **97**, 294-298.

[134] **Syed Rahmatullah, M.S.K., Shukla, V.K.S. and Mukherjee, K.D.,** 1994. Enrichment of γ-linolenic acid from evening primrose oil and borage oil via lipase-catalyzed hydrolysis, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **71**, 569-573.

[135] **Syed Rahmatullah, M.S.K., Shukla, V.K.S. and Mukherjee, K.D.,** 1994. γ-Linolenic acid concentrates from evening primrose oil and borage oil via lipase-catalyzed esterification, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **71**, 563-567.

[136] **Shimada, Y., Fukushima, N., Fujita, H., Honda, Y., Sugihara, A. and Tominaga, Y.,** 1998. Selective hydrolysis of borage oil with *Candida rugosa* lipase: Two factors affecting the reaction, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **75**, 1581-1586.

[137] **Shimada, Y., Sugihara, A., Shibahiraki, M., Fujita, H., Nakano, H., Nagao, T., Terai, T. and Tominaga, Y.,** 1997. Purification of γ-linolenic acid from borage oil by a two-step enzymatic method, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **74**, 1465-1470.

[138] **Shimada, Y., Sakai, N., Sugihara, A., Fujita, H., Honda, Y. and Tominaga, Y.,** 1998. Large-scale purification of gamma-linolenic acid by selective esterification with *Rhizopus delemar* lipase, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **75,** 1539-1544

[139] **Huang, F.C., Ju, Y.H. and Huang, C.W.,** 1997. Enrichment in γ-linolenic acid of acylglycerols by the selective hydrolysis of borage oil, *Applied Biochemistry and Biotechnology,* **67,** 227-236

[140] **Huang, F.C., Ju, Y.H. and Huang, C.W.,** 1997. Enrichment in γ-linolenic acid from borage oil via lipase-catalyzed reactions, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **74**, 977-981.

[141] **Huang, F.C., Ju, Y.H. and Chiang, J.C.,** 1999. Gamma–linolenic acid-rich triacylglycerols from borage oil via lipase-catalyzed reactions, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **76,** 833-837

[142] **Traitler, H., Wille, H.J. and Studer, A.,** 1988. Fractionation of blackcurrant seed oil, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **65,** 755-758.

[143] **Spurvey, S.A. and Shahidi, F.,** 2000. Concentration of gamma linolenic acid (GLA) from borage oil by urea complexation: Optimization of reaction conditions, *Journal of Food Lipids*, **7**, 163-174.

[144] **Guil-Guerrero, J.L., Campra-Madrid, P. and Navarro-Juarez, R.,** 2003. Isolation of some PUFA from edible oils by argentated silica gel chromatography, *Grasas y Aceites*, **54**, 116-121.

[145] **Uksila, E. and Lehtinen, I.,** 1966. Crystallization of linseed oil fatty acids from acetonitrile, *Acta Chemica Scandinavica*, **20**, 1645-1650.

[146] **Chen, T. and Ju, Y.H.,** 2001. Polyunsaturated fatty acid concentrates from borage and linseed oil fatty acids, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **78,** 485-488.

[147] **Newey, H.A., Shokal, E.C., Mueller, A.C., Bradley, T.F. and Fetterly, L.C.,** 1950. Separation of fatty acids and their derivatives by extractive crystallization with urea, *American Paint Journal*, **34**, 76-78.

[148] **Swern, D. and Winfred, E.P**., 1953. Application of urea complexes in the purification of fatty acids, esters, and alcohols. III. Concentrates of natural linoleic and linolenic acids, *Journal of the American Oil Chemists Society,* **30,** 5-7.

[149] **Myers, R.H. and Montgomery, D.C.,** 2002. *Response Surface Methodolgy Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley& Sons, Inc.,Newyork.

[150] **Bektaş, İ.,** 2006. Tripalmitinin kaprik asit ile enzimatik asidolizi: Tepki yüzey metodolojisi ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[151] **Sambucini, V.,** 2007. A reference prior for the analysis of a response surface, *Journal of Statistical Planning and Inference*, **137,** 1119-1128.

[152] **Dağlı, R.,** 2005. Tripalmitinin enzimatik asidoliziyle düşük kalorili yapılandırılmış lipidlerin üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[153] **Cornell, J.A.,** 1990. How to Apply Response Surface Methodology, Quality Press, Wisconsin, USA.

[154] **Collins, C.A. and Seeney F.M.,** 1999. Statistical Experiment Design and Interpretation: An Introduction with Agricultural Examples, Wiley, Chichester.

[155] **Vuchkov, I.N. and Boyadjieva, L.N.,** 2001. Quality Improvement with Design of Experiments: a Response Surface Approach, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Leyla Kent

Doğum Yeri ve Tarihi: Istanbul, 1960

Adres: Ömerpaşa Sokak, No. 40/16 Erenköy, Istanbul

Lisans Üniversite: Istanbul Teknik Üniversitesi

Yayın Listesi:

▪ Ustun, G., **Kent, L**., Cekin, N. and Civelekoglu, H., 1990. Investigation of the technological properties of *Nigella sativa* (Black Cumin) seed oil, *Journal of American Oil Chemists Society*, **67**, 958-960.