İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MAHLEP YAĞ ASİTLERİ İLE MODİFİYE LİPİDLERİN ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hüma Özlem ELDEN

Anabilim Dalı : Kimya Mühendisliği

Programı : Kimya Mühendisliği

HAZİRAN 2009

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MAHLEP YAĞ ASİTLERİ İLE MODİFİYE LİPİDLERİN ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Hüma Özlem ELDEN
(506071016)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04 Mayıs 2009
Tezin Savunulduğu Tarih : 03 Haziran 2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Güldem ÜSTÜN (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ayşe AKSOY (İTÜ)
Doç. Dr. Beraat ÖZÇELİK (İTÜ)

HAZİRAN 2009

ÖNSÖZ

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

Yaşamım boyunca bana her zaman destek olan aileme, Yüksek Lisans tez çalışmam sırasında yaşadığım zorlukları paylaşarak bana destek olan laboratuar arkadaşlarım, Funda Süzen'e, Begüm Elibal'a, ismini sayamadığım tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2009

Hüma Özlem ELDEN

Kimya Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KISALTMALAR ..... **vii**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **ix**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xi**
SEMBOL LİSTESİ ..... **xiii**
ÖZET ..... **xv**
SUMMARY ..... **xvii**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Giriş ve Çalışmanın Amacı 1
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Soya Fasulyesi ve Soya Yağı 3
2.1.1 Soya fasulyesi özellikleri, bileşimi ve kullanım alanı 3
2.1.2 Soya yağı özellikleri, bileşimi ve kullanım alanı 6
2.2 Mahlep Bitkisi 8
2.2.1 Yetiştirildiği bölgeler ve kullanım alanları 9
2.2.2 Mahlebin bileşimi ve sağlığa etkileri 10
2.3 Konjuge Linolenik Asit 11
2.3.1 KLNA kaynakları 12
2.3.2 KLNA kullanım alanları ve sağlık üzerine etkileri 12
2.4 Yapılandırılmış Yağlar 13
2.4.1 Yapılandırılmış yağ sentezlenmesinin nedenleri 14
2.4.2 Yapılandırılmış yağ sentezinde kullanılan yağ asitleri 15
2.4.3 Yapılandırılmış yağların sentezi 15
2.4.4 Enzimatik proseslerde ürün verimini etkileyen faktörler 18
2.4.5 Kimyasal ve enzimatik yöntemlerin kıyaslanması 22
2.5 Yapılandırılmış Yağ Üretimi ile İlgili Literatür Çalışması 23
2.6 Tepki Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology) 25
2.6.1 Merkezi bileşik deney tasarımları 26
2.6.2 Varyans analizi (ANOVA) 27
2.6.3 Regresyon analizi 28
2.6.4 Kalanların toplamı 28
2.6.5 Korelasyon sayısı 28
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR **31**
3.1 Kullanılan Hammaddeler 31
3.2 Çalışma Yöntemi 31
3.2.1 Mahlep yağının ekstraksiyonu 31
3.2.2 Mahlep yağından serbest yağ asitlerinin hazırlanması 31
3.2.3 Kullanılan hammaddelerin karakterizasyonu 32
3.2.4 Soya yağı ile mahlep yağ asitlerinin asidoliz reaksiyonunda uygulanan yöntem 33
3.2.5 Asidoliz ürünlerinin analizi 33

3.2.6 Deneysel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi 34
3.2.7 Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu..... 35
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 37
4.1 Mahlep Yağının Ekstraksiyonu 37
4.2 Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri..... 38
4.3 Tepki Yüzey Metodolojisi'de Kullanılıcak Deney Noktalarının Belirlenmesi 39
4.4 Tepki Yüzey Metodolojisi'ne Göre Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu 45
4.5 Farklı Reaksiyon Koşullarının Soya Yağı ile Mahlep Kaynaklı Konjuge Linolenik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Etkilerinin İstatiksel Açıdan Değerlendirilmesi 48
4.6 Tepki-Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması..... 51
5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER 53
KAYNAKLAR..... 55
ÖZGEÇMİŞ..... 61

KISALTMALAR

ANOVA : Varyans Analizi
DAG : Diaçilgliserol
DHA : Dokosahekzaenoik asit
EPA : Eikosapentaenoik asit
GC : Gaz Kromatografisi
KLA : Konjuge Linoleik Asit
KLNA : Konjuge Linolenik Asit
L : Uzun Zincirli Yağ Asidi
M : Orta Zincirli Yağ Asidi
MAG : Monoaçilgliserol
MYA : Mahlep Yağ Asitleri
S : Kısa Zincirli Yağ Asidi
TAG : Triaçilgliserol
TYM : Tepki Yüzey Metodolojisi
YY : Yapılandırılmış Yağ
SY : Soya yağı

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Soya fasulyesinin besin değeri (100g). 5
Çizelge 2.2 : Soya yağı yağ asidi bileşimi. 6
Çizelge 2.3 : Soya yağının bazı karakteristik özellikleri. 7
Çizelge 2.4 : Ham ve rafine soya yağlarının ortalama bileşimi. 8
Çizelge 3.2 : Gaz kromatografik analiz koşulları. 32
Çizelge 4.1 : Mahlep tohum örneklerinin yağ içerikleri. 38
Çizelge 4.2 : Soya yağı yağ asitleri bileşimi. 38
Çizelge 4.3 : Mahlep yağ asitleri bileşimleri. 39
Çizelge 4.4 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin SY:MYA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, % 10 enzim). 40
Çizelge 4.5 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin SY:MYA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, % 10 enzim). 40
Çizelge 4.6 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin SY:MYA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, % 10 enzim).. 41
Çizelge 4.7 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin enzim miktarı (E) ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, reaksiyon süresi 3 saat, SY:MYA mol oranı 1:5). 43
Çizelge 4.8 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin sıcaklık ile değişimi (enzim miktarı % 10, reaksiyon süresi 3 saat, SY:MYA mol oranı 1:5). 44
Çizelge 4.9 : Asidoliz ile soya yağından konjuge linolenik asit (KLNA) ile zenginleştirilmiş lipidlerin eldesinde yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviye değerleri. 45
Çizelge 4.10 : Yüzey merkezli küp deney tasarımında belirlenen deney tasarım noktaları (reaksiyon süresi: 3 saat; enzim miktarı %10). 46
Çizelge 4.11 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri (reaksiyon süresi: 3 saat, enzim miktarı: % 10) (deney no : 1-6 sonuçları). 46
Çizelge 4.12 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri (reaksiyon süresi: 3 saat, enzim miktarı: % 10) (deney no : 7-11 sonuçları). 47
Çizelge 4.13 : Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş asidoliz deneyleri sonucunda elde edilen ürünlerin tepki değerleri (% KLNA). 47

Çizelge 4.14 : Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları. 48
Çizelge 4.15 : Varyans analizi sonuçları. 49
Çizelge 4.16 : Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri. 50

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Soya fasulyesi bitkisi. 3
Şekil 2.2 : Mahlep bitkisinin meyveleri, çiçekleri ve tohumları. 9
Şekil 2.3 : Alfa-linolenik asitin genel yapısı. 11
Şekil 2.4 : Yapılandırılmış yağların genel yapısı (U: uzun zincirli yağ asidi, O: orta zincirli yağ asidi ve K: kısa zincirli yağ asidini ifade etmektedir). 14
Şekil 2.5 : Esterifikasyon reaksiyonu. 16
Şekil 2.6 : İki farklı triaçilgliserol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu.....17
Şekil 2.7 : Bir açilgliserol ve bir alkol arasında gerçekleşen alkoliz reaksiyonu....17
Şekil 2.8 : Bir açilgliserol ve bir asit arasındaki asidoliz reaksiyonu. 18
Şekil 2.9 : Pozisyonel seçiciliğe sahip olmayan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonları (L: Uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi). 19
Şekil 2.10 : sn-1 ve sn-3 pozisyonunda seçiciliğe sahip olan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonları (L: Uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi). 20
Şekil 2.11 : Üç faktörlü bir sistem için merkezi bileşik deney deseni. 26
Şekil 2.12 : Yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarım noktaları örneği. 27
Şekil 4.1 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin SY:MYA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, enzim % 10). 41
Şekil 4.2 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin MYA:SY mol oranı ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, enzim % 10, reaksiyon süresi 3 saat). 42
Şekil 4.3 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin enzim miktarı ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, reaksiyon süresi 3 saat, SY:MYA mol oranı 1:5). 43
Şekil 4.4 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin sıcaklık ile değişimi (enzim miktarı % 10, reaksiyon süresi 3 saat, SY:MYA mol oranı 1:5). 45
Şekil 4.5 : Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki. ..50
Şekil 4.6.a : Soya yağına mahlep kaynaklı %KLNA katılımının mol oranı ve sıcaklık ile değişiminin izdüşüm grafiği. 52
Şekil 4.6.b : Soya yağına mahlep kaynaklı %KLNA katılımının mol oranı ve sıcaklık ile değişiminin tepki yüzey grafiği. 52

SEMBOL LİSTESİ

ε	: Kalanların Toplamı
y	: Deneylerde Gözlenen Çıktı Değerleri
$\hat{y}$	: Deneysel Tasarımdan Elde Edilen Çıktı Değerleri
R^2	: Korelasyon Sayısı
$\tilde{y}$	: Deneysel Sonuçların Ortalama Değeri
Y	: Tepki
β_0	: Ortalama Etki
β_i	: Değişkenlerin Lineer Katsayıları
β_{ii}	: Değişkenlerin Kuadratik Katsayıları
β_{iii}	: Değişkenlerin Etkileşimleri için Belirlenen Katsayılar
X_i	: Bağımsız Değişkenler
X_j	: Bağımsız Değişkenler
S	: Süre
M	: Soya Yağı/Mahlep Yağ Asitleri Mol Oranı
E	: Enzim Miktarı

MAHLEP YAĞ ASİTLERİ İLE MODİFİYE LİPİDLERİN ÜRETİMİ

ÖZET

Soya yağı iki esansiyel yağ asidi olan linoleik asit (LA) ve linolenik asit (ALA) ile zengin olan bir yağdır. LA, ALA ve bunların uzun karbon zincirli türevleri insan sağlığı için gereken önemli bileşiklerdir. Konjüge linolenik asitler (KLNA), oktatrienoik yağ asitlerinin konjüge pozisyonel ve geometrik izomerleri karışımı için kullanılan kollektif bir terimdir. Bunlara hayvansal yağlarda rastlanmaz fakat çeşitli bitki tohum yağlarında bulunur. Örnek olarak, Türkiye'ye özgü bitkilerden olan mahlep (*Prunus mahaleb* L.) tohum yağında % 27-45 KLNA bulunur ki ana komponent α-eleostearik asittir. Günümüzde KLNA insan sağlığı üzerine olumlu yararlarından dolayı büyük ilgi görmektedir. Bunların iç organ yağlarını azaltıcı, kandaki kolesterol seviyesini ayarlayıcı, bağışıklık sistemini kuvvetlendirici ve tip 2 diyabet hastalarının metabolik rahatsızlıkları ile bazı kanser tiplerinde ilerlemeyi önlediği beyan edilmektedir.

Bu çalışmada, soya yağının sağlık yararları triaçilgliserollerine KLNA katılması ile daha da arttırılmıştır. İçeriğinde % 40,0 KLNA bulunan mahlep yağ asitleri mahlep tohumlarından elde edilmiştir. Soya yağı (SY) ile mahlep yağ asitleri (MYA) arasında Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosa*) lipaz enzimi varlığında asidoliz reaksiyonları yürütülmüştür. Reaksiyon değişkenlerinin (süre, sıcaklık, enzim miktarı ve substrat mol oranının) SY'na KLNA katılımı üzerindeki etkileri incelenmiş ve reaksiyon koşulları Tepki Yüzey Metodolojisine göre optimize edilmiştir.

Ön denemelerde enzim miktarının ve reaksiyon zamanının reaksiyon yürüyüşü üzerinde önemli bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Bundan dolayı reaksiyonlarda iki bağımsız değişken olarak SY:MYA mol oranı ve sıcaklık seçilmiştir. Asidoliz reaksiyonları % 10 enzim kullanarak 3 saatlik reaksiyon süresinde iki değişkenli ve üç seviye değerli küp tasarım noktalarında yürütülmüştür. Her değişken için çalışma aralığı: SY:MYA mol oranı için 1:3-1:7 ve sıcaklık için 35-55 °C olarak belirlenmiştir.

Optimal reaksiyon koşulları, SY:MYA mol oranı 1:6,4 ve sıcaklık 36,8 ºC olarak saptanmıştır. Bu koşullarda SY'na katılması beklenen KLNA miktarı % 26,7'dir. Aynı koşullarda yürütülen deney sonucunda % 26,8 KLNA içeren yapılandırılmış lipid elde edilmiştir.

Substrat mol oranı ve sıcaklığın fonksiyonu olarak KLNA katılımının tahmini değerlerini veren kuadratik model oluşturulmuştur. Bu modelin regresyon katsayısı (R^2) 0,99 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, soya yağından içerisinde % 27 KLNA bulunan ve sağlıklı gıda ürünlerinde kullanılabilecek modifiye bir lipid üretilmiştir.

PRODUCTION OF LIPIDS MODIFIED WITH MAHALEB FATTY ACIDS

SUMMARY

Soybean oil is rich in two essential fatty acids, linoleic acid (LA) and linolenic acid (ALA). LA and ALA and their long chain derivatives are important components required for human health. Conjugated linolenic acids (CLNA), is the collective term for a mixture of conjugated positional and geometric isomers of octatrienoic fatty acids. They are not very common in animal fats but are found in various seed oils. For example, mahaleb seed (*Prunus mahaleb* L.) oil, which is virtually unique to Turkey, contains 27-45% of CLNA, mainly α-eleostearic acid. Recently CLNA have attracted a great attention due to their beneficial effects on human health. It was reported that they reduce visceral lipids, regulate cholesterol level in blood, enhance immune responce, prevent metabolic disorders of type 2 diabetes and progression of some cancer types.

In this study, the health benefits of soybean oil was enhanced with the incorporation of CLNA into their triacylglycerols. Mahaleb fatty acids having 40.0% of CLNA were obtained from mahaleb seed oil. Acidolysis reactions were conducted between soybean oil (SO) and mahaleb fatty acids (MFA) in the presence of Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosa*) lipase. The effects of reaction variables (time, temperature, enzyme load, and substrate molar ratio) on the incorporation of CLNA into SO were studied and reaction conditions were optimized by Responce Surface Methodology.

Preliminary experiments revealed that enzyme amount and reaction time had no significiant effect on the course of the reaction. Therefore, the molar ratio of SO:MFA and reaction temperature were chosen as two independent reaction variables. Acidolysis reactions were carried out using enzyme load of 10% for 3 h according to two variable and three level cube design points. The range of each variable was selected as follows: SO:MFA molar ratio, 1:3-1:7 and temperature, 35-55 °C.

Optimal reaction conditions were determined to be a SO:MFA molar ratio of 1:6,4 and temperature of 36,8 ºC. Incorporation of 26,7% CLNA into SO was predicted at these conditions. The structured lipid containing 26,8% of CLNA was obtained at similar conditions.

A good quadratic model was obtained to predict CLNA incorporation as a function of substrate molar ratio and temperature with a satisfactory regression coefficient (R^2) found as 0,99.

In conclusion, modified lipid produced from soybean oil having 27% of CLNA could be used in the formulation of healthy food products.

1. GİRİŞ

1.1 Giriş ve Çalışmanın Amacı

Yağlar, karbonhidratlar ve proteinler gibi insan vücudu için yaşamsal değeri olan ve insanların beslenmesinde önemli yer tutan temel ihtiyaç maddelerinden biridir. Özellikle doymuş yağ oranlarının düşük olması, hücre yapısı için gerekli olan yağ asitlerini içermesi ve insan vücudunda A, D, E, K gibi yağda eriyen vitaminleri çözmesi gibi özellikleriyle bitkisel yağlar, insan sağlığına katkıları ve yüksek besin değerine sahip olmaları bakımından ayrı bir öneme sahiptir.

Bitkisel veya hayvansal yağların bir kısmı gıda uygulamaları ve beslenme için çok uygun değildir. Bu yüzden, günümüzde yağların çoğu biyoteknolojik uygulamalar ile değişik şekillerde modifiye edilerek amaca uygun hale getirilmektedir. Yapılandırılmış Yağlar (YY'lar) triaçilgliserollerin yapısı üzerine yeni yağ asitlerinin yerleştirilmesi veya doğal yapısındaki yağ asitlerinin pozisyonlarının ve/veya yağ asitlerinin bileşimlerinin değiştirilmesi ile modifiye edilmiş triaçilgliserolleridir. Yapılandırılmış yağlar, yağların fiziksel ve/veya kimyasal karakterini geliştirmek, besinsel özelliklerini değiştirmek amacı ile sentezlenirler. Yapılandırılmış yağların sentezi, temel olarak kimyasal ya da enzimatik yolla gerçekleştirilmektedir. En çok kullanılan yöntem enzimatik yöntemdir.

Soyanın bir çok hastalığa, özellikle de kalp ve kanser hastalıklarına karşı koruyucu olarak insan beslenmesinde önemli bir yeri vardır. Soya fasulyesi, gıda, hayvan yemi ve endüstriyel malzeme olarak çok geniş kullanım alanlarına sahiptir. Soya yağı vücudumuz için gerekli olan yağ asitleri ile yağda çözünen vitaminler açısından önemli bir kaynaktır.

Konjuge linolenik asit (KLNA), omega-6 olarak bilinen esansiyel yağ asitleri ailesinin bir üyesidir. KLNA'nın sağlık ve biyolojik açıdan faydalı etkileri de vardır. Antikanserojenik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. KLNA'nın izomeri olan α-eleostearik asit'in antioksidan özellikleri olduğu rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, soya yağına mahlep tohumlarından elde edilen KLNA katılımının etkileri incelenmiş ve Tepki Yüzey Metodolojisine göre optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmada *Thermomyces lanuginosa* orijinli Lipozyme TL IM lipaz enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon verimine reaksiyon süresi, sıcaklık, enzim miktarı ve substrat mol oranının etkileri incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Soya Fasulyesi ve Soya Yağı

2.1.1 Soya fasulyesi özellikleri, bileşimi ve kullanım alanı

Soya fasulyesi Leguminosae familyasına aittir. Ekilen çeşidi *Glycine max* (L.) Merrill yıllık olarak yetişir. *Glycine* Yunanca tatlı anlamına gelmektedir ve Baklagiller familyasındaki kökü yenen tüm bitkiler için de kullanılmaktadır. *Max* sözcüğü ise geniş anlamına gelmekte ve soya fasülyesi bitkisi üzerindeki geniş yumruları ifade etmektedir [1]. Soya fasulyesi tohumu küresel veya uzun oval şekillidir. Çoğunlukla sarı renkte olup yeşil, koyu kahve renkli, morumsu siyah veya siyah renklerde olabilmektedir [2]. Boyu 75 cm'den 1,5 metreye kadar olan soya bitkisinin meyvesi bir bakladır. Soya baklaları olgunlaşınca içerisinde yuvarlak ve sarı renkli tohumlar oluşmaktadır [3]. Esas olarak ılıman iklim bölgelerinde yetişen soya fasulyesi bitkisi bir kısa gün bitkisi olup günlerin kısalmasıyla çiçek açmakta, kasım ve aralık aylarında ise hasat edilmektedir [4]. Şekil 2.1'de soya fasulyesine ait bir resim görülmektedir.



Şekil 2.1 : Soya fasulyesi bitkisi [5].

Bitkinin bu genel özelliklerinin yanı sıra yetiştiricilik açısından kendine özgü çok avantajlı özellikleri de vardır. Nerdeyse hiç yada çok az gübre isteği olan soya fasulyesinin ekim ve hasadı çok kolay yapılmaktadır. Ayrıca böcek ve zararlılara karşı da çok dirençlidir. Soya köklerinde havanın serbest azotunu bağlayabilen *Rhizobium (Bradyrhizobium) japonicum* bakterisinin bulunması sebebiyle hem kendi besin ihtiyacını karşılamakta hem de toprağı bir sonraki ürün ekimi için hazır hale getirerek tarımsal açıdan büyük fayda sağlamaktadır [4].

Tarihsel ve coğrafik bilgilere göre, soya 5000 yıl öncesinde Doğu Asya ovalarında Kuzey Çin'de keşfedilmiş olup, Çin halkının beş kutsal (çeltik, soya, buğday, arpa ve darı) ekininden biri olarak kabul edilmiş ve yüzyıllardır Asya halkının en önemli gıdası haline gelmiştir [6]. Soya fasulyesinin toprağa ekimi ile birlikte, Çinliler bu mahsulü tofu (soya peyniri), soya sütü, soya filizi, soya ezmesi, soya sosu ve bunun gibi birçok lezzetli ve besleyici ürüne dönüştürmüşlerdir. Yaklaşık 1100 yıl öncesinde, Japonya, Kore ve diğer Uzakdoğu ülkeleri bu ürünlerle tanışmış olup, yeni metotlarla kendilerine özgü yeni soyalı ürünler oluşturmuşlardır. Soya fasulyesi, Avrupa ve Kuzey Amerika'da 18. yüzyılda ilk kez ortaya çıkmış, ancak 1900'lü yılların başına dek büyük ölçekli resmi bir üretim olmamıştır. 1954'lü yıllara dek soya fasulyesi üretiminde Çin dünyada lider konumda iken, bu tarihten itibaren ABD dünyada lider konuma gelmiştir [2]. ABD'de soyanın önem kazanmasının başlıca nedeni 20. yüzyılda İkinci Dünya Savaşı sonrasında protein ve yağ teminindeki yetersizlikler nedeniyle besin değeri yüksek bu insan gıdasına ihtiyaç duyulmasıdır [6]. 1950'li yıllardan bu yana dünyada yıllık üretimi her geçen yıl kararlı bir şekilde artan bir ürün olmuştur. Günümüzde soya tarımı en çok ABD'de gelişmiş olup soya fasulyesi dünyada en çok yetiştirilen ürünlerden biridir. Dünyada bu konuda lider diğer üretici ülkeler ise Brezilya, Arjantin, Çin ve Hindistan'dır [7].

Türkiye'ye girişi Birinci Dünya Savaşı sonrasına rastlayan soya fasulyesi ilk olarak Karadeniz Bölgesi'nde birinci ürün olarak yetiştirilmeye başlanmış, 10-12 bin tonluk üretim seviyelerine kadar ulaşılmış fakat üretim miktarı 1970'li yılların sonuna doğru 2.000 tona kadar düşmüştür. Sözü edilen yıllarda meydana gelen bitkisel yağ darboğazı nedeniyle Tarım ve Orman Bakanlığı'nca 1981 yılında uygulamaya konan İkinci Ürün Araştırma Projesi kapsamında yürürlüğe giren projeler ve sağlanan teşviklerle soya üretiminde 5-6 yıl içerisinde önemli artışlar kaydedilmiştir. İkinci Ürün Projesi ile Ege ve Akdeniz bölgelerinin sulanır alanlarında yetiştirilmeye başlanılan soyanın tarımı bugün için ağırlıklı olarak Çukurova Bölgesinde yapılmaktadır [8]. Soya ekiminin % 91'i Adana, Osmaniye, Hatay, Mersin, K.Maraş illerini kapsayan Akdeniz bölgesinde, % 8'i Karadeniz Bölgesinde Ordu ve Samsun civarı ile % 1'i Ege bölgesinde gerçekleşmektedir. Yıllara göre değişmekle birlikte ortalama 20.000 hektarda soya ekimi yapılmaktadır [6].

Soya fasulyesi, besin değeri ile içerdiği mineral ve vitaminler açısından oldukça zengindir. İçeriğinde yüksek miktardaki protein yanında soya fasulyesinde lif,

kalsiyum ve magnezyum bolca bulunmaktadır. Tohumları ortalama % 18-24 yağ, % 35-45 protein, % 30 karbonhidrat, % 5 mineral, çok sayıda vitamin ve değerli aminoasitler içermektedir [9]. Soya fasulyesi diğer baklagiller ve tahıllar içerisinde en yüksek protein miktarına sahiptir ve proteini elzem aminoasitlerce zengindir. Diğer baklagiller % 20-30 civarında protein içermektedir [10]. Çizelge 2.1'de 100 g soya fasulyesinde bulunan besin değeri ve içeriğinde bulunan bazı maddeler kısaca özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 : Soya fasulyesinin besin değeri (100 g) [6].

Protein	36,5 g
Karbonhidrat	30,2 g
Yağ	19,9 g
Doymuş yağ asitleri	2,9 g
Doymamış yağ asitleri	15,7 g
Lif	9,3 g
Su	8,59 g
Kül	4,9 g
Magnezyum	280 mg
Kalsiyum	277 mg
İzoflavonlar	200 mg
Demir	15,7 mg
Enerji	416 kcal

Soya fasulyesi çok çeşitli kullanım alanları bulunan bitkisel bir gıda maddesidir. Soya taneleri çimlendirilip filizleri sebze olarak yenebileceği gibi, işlenerek soya yağı ve unu elde edilir. Soya dünyada bitkisel yağların ve yüksek proteinli hayvan yemlerinin başlıca kaynağıdır. Hamur ürünleri (ekmek, kurabiye, bisküvi, kekler, baklava, pasta, hamur tatlıları, dondurma külahı, makarna, şehriye, mantı, tarhana, leblebi); bebek mamaları, şekerleme ürünleri (çikolata, helva); alerji yapmayan süt ve süt ürünleri (yoğurt, peynir, dondurma); özel diyet ürünleri; yapay et ürünleri; kuru veya soğuk hazır yemek karışımları ile soya gıda sektöründe kullanılmaktadır [10].

Soya bitkisi, sağlıklı beslenme ve tıp alanlarının yanı sıra tutkal, mürekkep, sabun, benzin, böcek ilacı, alkol, plastik ve lastik gibi endüstriyel ürününlerin üretiminde de kullanılan ender tarla bitkilerinden biridir [6].

Soya, Türkiye'de gıda sektöründe yeni yeni yaygınlaşmaya başlamıştır ve ağırlıklı olarak yem sektöründe kullanılmaktadır [6].

2.1.2 Soya yağı özellikleri, bileşimi ve kullanım alanı

Soya yağı, dünyada en çok üretilen ve tüketilen bitkisel yağdır. Kaliteli bir soya yağının rengi açık, berrak, akıcı ve iyi filtre edilmiş olmalıdır. Bütün bitkisel yağlar gibi, soya yağı da kolestrolsüzdür. Soya ve soya yağı insana faydalı yağ asitlerini içermesinden dolayı şeker, koroner kalp ve damar sertliği gibi hastalıkları olan kişilere önerilmektedir. Bunlara ilaveten doymamış yağ asidi/doymuş yağ asidi oranının diğer bitkisel yağlarla kıyaslandığında 5,7 gibi yüksek bir değer olması da istenen bir özelliktir ve yüksek oranda doymamış yağ içerdiğinden, tohumun % 20'sini oluşturan yağlar salata, kızartma yağı ve margarin olarak kullanılmaktadır. [11]. Çizelge 2.2'de soya yağının yağ asidi bileşimi görülmektedir.

Çizelge 2.2 : Soya yağı yağ asitleri bileşimi [6].

Yağ asidi	**Yağ asitleri bileşimi, %**
Doymuş yağ asitleri	
Miristik asit	<0,5
Palmitik asit	7-12
Stearik asit	2-5,5
Araşidik asit	<1,0
Behenik asit	<0,5
Doymamış yağ asitleri	
Palmitoleik asit	<0,5
Oleik asit	20-50
Linoleik asit	35-60
Linolenik asit	2-13

Çizelge 2.2'den de görüldüğü gibi soya yağında insan vücudunda sentezlenemeyen omega-3 (linolenik asit) ve omega-6 (linoleik asit) yağ asitleri bulunmaktadır. Soya yağındaki omega-3 yağ asitinin kalp hastalığı riskini azalttığı kanıtlanan balık

yağının içeriğindeki yağ cinsine benzer özelliktedir [6]. Büyüme ve üreme için çok önemli olan omega-6 yağ asitlerinin vücuttan aşırı su kaybının önlenmesinde ve radyasyondan kaynaklanacak zararların azaltılmasında da son derece büyük rolü vardır. Aynı zamanda deri kurumalarını ve çatlamalarını önlemektedir [3]. Bundan başka soya yağında Ca, Fe ve Zn elementleri ile B ve E vitaminleri de bulunmaktadır [6].

Çizelge 2.3'de soya yağının bazı karakteristik özellikleri görülmektedir.

Çizelge 2.3 : Soya yağının bazı karakteristik özellikleri [6].

Ham soya yağı özellikleri	**Değerler**
İyot sayısı (g iyot/100 g)	124-139
Sabunlaşma sayısı (mg KOH/g yağ)	189-195
Sabunlaşmayan madde (g/kg),	<15
Bağıl yoğunluk, (20°C/20°C)	0,919 – 0,925
Kırılma indisi, (25°C'de)	1.470 - 1.476
Viskozite, (20°C'de) (cP)	53-58
Katılaşma noktası, (°C)	-10'dan -16'a kadar

Soya yağı, özellikle polar olmayan ve hidrojen köprüsü oluşturmayan çözücülerle ve pek çok organik çözücüde çözünmektedir. Bunlar arasında hidrokarbonlar, esterler, eterler, ketonlar ve klorlanmış hidrokarbonlar sayılabilir [6].

Soya yağı diğer bitkisel yağlara oranla fazla miktarda fosfatid içermektedir. Fosfatidler, ham yağın rafinasyonu sırasında yan ürün olarak elde edilir ve ticari lesitin olarak pazarlanırlar. Lesitin, beyindeki sinir hücreleri arasında iletişimi sağlayan kimyasal maddelerin en önemlilerinden biri olan asetilkolin düzeyini desteklemektedir. Böylece kişilerin zihinsel yetenek ve hafızalarını güçlendirmektedir. Soya lesitininin, emülsiyon yapma özelliğinden dolayı, gıda sanayinde margarin ve çikolata yapımı gibi çeşitli kullanım alanları vardır. Ayrıca kozmetik ve ilaç yapımında da önemli bir katkı maddesidir [3,6].

Çizelge 2.4'de ham ve rafine soya yağlarının ortalama bileşimi görülmektedir.

Çizelge 2.4 : Ham ve rafine soya yağlarının ortalama bileşimi [1].

Bileşenler	**Ham yağ**	**Rafine yağ**
Triaçilgliseroller (%)	95-97	>99
Fosfatidler (%)	1,5-2,5	0,003-0,045
Serbest yağ asitleri (%)	0,3-0,7	<0,05
Sabunlaşmayan maddeler (%)	1,6	0,3
Steroller (%)	0,33	0,13
Tokoferoller (%)	0,15-0,21	0,11-0,18
Hidrokarbonlar (%)	0,014	0,01
Demir (ppm)	1-3	0,1-0,3
Bakır (ppm)	0,03-0,05	0,02-0,06

Soya lesitini dışında diğer başlıca soya yağı ürünleri; gliserol ve rafine soya yağıdır. Ayrıca soya yağının kullanılması ile anti-korozyon maddeler, macun bileşenleri, inşaat malzemeleri, beton katkı maddeleri, bakım yağları, dezenfektan, toz kontrol maddeleri, elektrik izolasyonu, fungisitler (mantar zehirleri), metal kaplama, mürekkep gibi ürünler elde edilmektedir [6].

2.2 Mahlep Bitkisi

Mahlep ağacı *Rosaceae* (gülgiller) familyası, *Prunoidea* (Sert çekirdekliler) alt familyasının bir üyesidir [12]. Türkçe'de idrisağacı olarak da bilinen mahlep (*Prunus mahaleb* L.), İngilizce'de St. Lucie cherry, English cherry, Rock cherry olarak adlandırılmaktadır [13].

Mahlep, zeytin gibi önce yeşil, sonra siyahî olan meyveleri ve bu meyvelerden elde edilen özütün adıdır. Tadı acı, çekirdeği düzgündür ve içerdiği kumarinden dolayı hoş kokuludur [14].

Yapraklarını döken, 10-15 metre boya ulaşabilen küçük ağaç yada ağaççık görünümündedir ve beyaz kokulu çiçekleri vardır [15,16]. Mahlep ağacı mart sonunda çiçek açmaktadır. Bu çiçekler nisan ayının onuncu gününden itibaren yerlerini yeşil yapraklara bırakmaktadır. Haziran ayı meyve verme dönemidir. Kırmızı, siyah ve sarı olmak üzere üç çeşit meyvesi bulunmaktadır [14].

2002 yılında yapılan bir çalışmaya göre mahlep tohumları kuru ağırlığa göre % 2,9-10,2 nem içermektedir [15].

Şekil 2.2'de mahlep bitkisinin meyveleri, çiçekleri ve tohumları görülmektedir.



Şekil 2.2 : Mahlep bitkisinin meyveleri, çiçekleri ve tohumları [17].

Hasatı Ağustos ayında yapılmaktadır. Meyveler dallarıyla beraber toplanır. Meyvelerin etli kısmı sıyrılarak alınır ve çekirdekleri güneşte kurutulur. Silindirler arasından geçirilerek çekirdek kırılır ve eleme yöntemi ile çekirdek tohumu kabuğundan ayrılır [18].

2.2.1 Yetiştirildiği bölgeler ve kullanım alanları

Mahlep doğada yabani olarak yetişen bir bitkidir. Çiftçiler ekonomik getirisi az olduğu ve meyvesi zor toplanıp işlendiği için mahlep ağacı yetiştirmeyi tercih etmemektedir. Bu özelliğinden dolayı mahlep ağacı bulmak son derece zordur [14]. Mahlep Batı Asya' da ise çok yaygın olarak yetişmekle birlikte, Doğu ve Orta Avrupa'nın ılık ve kuru iklime sahip olan yerlerinde de yetişmektedir [12].

Mahlep ağacı kayalık ve güneşli yerlerde yetişir. Türkiye'deki mahlep üretim alanlarının yaklaşık 18.375 ha olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye'den toplanan mahleplerin büyük bir kısmı ihraç edilmektedir. Türkiye'de yöresel ilaçlarda tonik ya da antidiyabetik olarak, turta ve şekerlemelerde ise tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Çekirdeklerinden elde edilen yağ, vernik hazırlamada çok değerlidir [12,15].

Mahlep ağaçlarından ilaç eldesi ve ihracatında Amasya ve Tokat illerinin iki önemli merkez konumunda olduğu bilinmektedir. Ağaca verilen isim bölgelere göre değişim göstermekte; Zile (Tokat)'de endulus, Amasya ve Tokat'da mahlep yada melhem; Merzifon (Amasya)'da idrisağacı yada pis ağaç olarak adlandırılmaktadır [15]. Anavatanı Anadolu olarak bilinen mahlebin tabii yayılış gösterdiği diğer iller; Gümüşhane, Mardin, Uşak, Van, Diyarbakır, Kars, Muğla ve Kütahya civarlarıdır [19].

Meyve ve tohumları değerlendirilen mahlep ağacının odunu da mobilyacılıkta kullanılmaktadır. Meyvelerinin jölesi, pestili, şekerlemesi yapılmakta; tohumları krem ve ilaç sanayiinde ve toz haline getirilerek de kurabiye ve hamurlu yiyeceklere koku vermek için de kulanılmaktadır [19].

Mahlebin asıl kullanım alanı anaçlık özelliğinden kaynaklanmaktadır [19]. Mahlep bitkisi, hastalıklara karşı dirençli ve duyarsızdır, bu nedenle de kiraz (*Prunus avium)* ve Marasca vişnesine (*Prunus cerasus* var. marasca) anaç olarak kullanılmaktadır [15]. Kiraz ve vişne yetiştiriciliğinde kullanılan anaçların büyük bir kısmını tohum anaçları oluşturmaktadır. Her iki tür için orta kuvvette bir anaç olan mahlebin, ülkemizdeki kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Türkiye'deki kiraz anaçlarının % 75- 80'inin mahlep anacı üzerine aşılı olduğu belirtilmektedir. Mahlep anacının sert, soğuk ve kısmen kurak iklimlere dayanımı iyi olup, toprak bakımından fazla seçici değildir. Yapılan araştırmalar mahlep anacına aşılı kiraz ve vişnelerin, kiraz üzerine aşılı olanlara göre daha fazla ürün verdiklerini ve erken olgunlaştıklarını göstermiştir. Genellikle uyuşma daha iyi olduğundan vişnelere anaç olarak sarı mahlepler tercih edilmektedir [19].

2.2.2 Mahlebin bileşimi ve sağlığa etkileri

Mahlep tohumlarının halk arasında tıbbi olarak kullanım amacı sindirimi kolaylaştırıcı ve idrar söktürücü etkisinden kaynaklanmaktadır [20]. Bunun dışında ecza dalında kuvvet verici, balgam söktürücü, cinsel gücü artırıcı, nefes darlığına karşı ve prostat büyümesini önleyici olarak kullanılmaktadır. Genellikle toz haline getirilip bal ile karıştırılarak macun şekilinde tüketilmektedir. Ayrıca şeker hastalığına karşı da tavsiye edilmektedir [18].

Akev ve arkadaşları Türkiye'de (Tokat, Amasya yöreleri) halk arasında kan şekerini düşürücü olarak kullanıldığı belirtilen *Prunus mahaleb* tohumlarının (idris ağacının kurutulmuş tohumları, mahlep tohumu) kan şekerini düşürücü etkisini tavşanlar üzerinde çalışmışlar, fakat bitki ekstresinin bu etkiye sahip olmadığını göstermişlerdir [21].

Mahlep çekirdekleri, kanın pıhtılaşmasını önleyen, anti-mantar, anti-tümör etkileri olduğu bilinen kumarin; karaciğer metabolizmasının düzenli bir şekilde çalışmasında etkili olan herniarin (7-metoksikumarin); koku ve lezzet ajanı olarak gıda ve esans katkı maddesi olarak kullanılan dihidrokumarin ve az miktarda amygdaline (vitamin

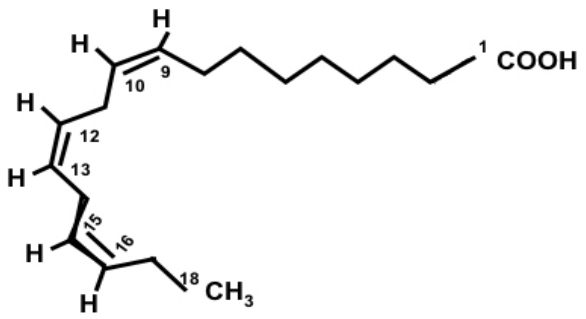
B17) içermektedir. Mahlep tohumları, önemli bir protein (% 31) ve yağ asitleri (% 40) kaynağıdır [22].

Özgül-Yücel'in 2005 yılındaki çalışmasında mahlep tohumlarından elde edilen mahlep yağındaki ana yağ asitleri oleik asit ve linoleik asit olarak bulunmuştur. Mahlep yağı, bu yağ asitlerince zengin olduğundan yarı-kuruyan bir yağ özelliğe sahiptir [23]. Linoleik ve linolenik asitin (çoklu doymamış yağ asitleri) yüksek oranlarda olması tıbbi (egzema ve damar sertliği hastalıklarında korunma yöntemleri ve tedavilerinde) ve gıdasal uygulamalarda istenen bir özelliktir [20]. Aynı çalışmada mahlep yağının konjuge linolenik asit (KLNA) açısından zengin olduğu (%27,6) ve toplam KLNA'nın %76,1'ini α-eleostearik asit oluşturduğu saptanmıştır. KLNA'nın özellikle α-eleostearik asit'in anti-kanserojenik ve sağlığa olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir [23]. Ayrıca Bölüm 2.3'de bu yağ asitlerinin sağlık açısından önemleri anlatılacaktır.

Ercisli ve Orhan tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmaya göre sarı, kırmızı ve siyah mahlep meyvelerinin yağ asitleri bileşimleri incelenmiş ve yağ asit miktarları hemen hemen aynı bulunmuştur. Çok küçük bir farkla KLNA içeriği kırmızı mahlepte daha yüksek çıkmıştır [20].

2.3 Konjuge Linolenik Asit

Konjuge linolenik asit (KLNA), omega-6 olarak bilinen esansiyel yağ asitleri ailesinin bir üyesidir. KLNA, oktadekatrienoik yağ asitlerinin geometrik ve pozisyonal izomerlerinin genel adıdır. KLNA'daki üç çift bağ Δ9,11,13 ve Δ8,10,12 pozisyonlarında olup aynı zamanda geometrik izomerler (cis veya trans konfigürasyonlarında) olabilirler. Alfa-linolenik asitin genel yapısı Şekil 2.3'de gösterilmektedir [24].



Şekil 2.3 : Alfa-linolenik asitin genel yapısı [25].

Yedi farklı KLNA izomerinin olduğu bilinmektedir. Bunlar, α-eleostearik asit (9c, 11t,13t-18:3), punisik asit (9*c*,11*t*,13*c*-18:3), katalpik asit (9*t*,11*t*,13*c*-18:3), α-kalendik asit (8*t*,10*t*,12*c*-18:3) , jakarik asit (8*c*,10*t*,12*c*-18:3), β-kalendik asit (8t,10t,12t-18:3) ve β-eleostearik asit (9t,11t,13t-18:3)'dir [24].

2.3.1 KLNA kaynakları

KLNA izomerlerine hayvan yağlarında çok yaygın olarak rastlanılmaz ancak çeşitli tohum yağlarında bulunurlar. Örneğin bu izomerlerden α-eleostearik asit; tung (Çin ağacı) tohumu (*Aleurites fordi*) yağında (% 68), kudret narı (*Momordica charantia* L.) yağında (% 56,2), mahlep tohumu (*Prunus mahaleb* L.) yağında (% 35), punisik asit; nar tohumları *(Punica granatum* L.) yağında (% 83), katalpik asit; katalpa tohumları *(Catalpa bignonoides)* yağında (% 42.3), kalendik asit; kadife çiçeği (*Calendula officinalis* L.) tohumlarından elde edilen yağda (% 62), jakarik asit; mavi jakaranda (*Jacaranda mimosifolia)* tohumlarında bulunmaktadır [23,24,26].

2.3.2 KLNA kullanım alanları ve sağlık üzerine etkileri

KLNA içeren yağlar, organik kaplama ve polimer üretiminde kullanılan çok önemli hammaddelerdir (konjuge doymamışlık polimerizasyonu kolaylaştırır ve tamamıyla işlem gördüğünde adezif özellikler kazandırır). Son günlerde kadife çiçeği yağı boya formülasyonlarında seyreltici bir reaktif olarak popüler hale gelmiştir [23].

Bununla birlikte KLNA'nın sağlık ve biyolojik açıdan da faydalı etkileri vardır. KLNA'nın iç organ lipidlerini azaltıcı, bağışıklık sistemini kuvvetlendirici ve Tip2 diyabet hastalarının metabolik rahatsızlıklarını önleyici etkileri olduğu da bilinmektedir [27]. KLNA izomerlerinin α--linolenik asit ile hazırlanmış karışımların vücuttaki yağ oranının azaltılması ve tümör aktivitesi üzerine etkisi konusunda birçok araştırma yürütülmektedir [28]. KLNA'nın kanser hücrelerinin gelişimi ve kanser hücrelerinin *in vitro* öldürücü etkisini azalttığı yapılan araştırmalar sonucu belirlenmiştir [29].

Suzuki ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; katalpa, tung ve narda bulunan KLNA'nın; fare ve insanların tümör hücreleri üzerinde güçlü bir sitotoksik etkisi olduğu belirtilmiştir. Aynı çalışmada punisik asit, α-eleostearik asit ve katalpik asitin sitotoksitesinin kalendik asitten çok daha kuvvetli olduğu bulunmuştur [30].

Igarashi ve Miyazawa α-linolenik asitin alkali ortamda kimyasal izomerizasyonu ile oluşan bütün konjuge trans trienoik yağ asitlerinin, konjuge dienoik asit ve konjuge trienoik asitler arasında tümör hücreleri üzerinde en kuvvetli büyüme-engelleyici etkiyi gösterdiğini söylemektedirler [31].

Narın ve kudret narının çekirdeklerinin yağından saflaştırılmış α-eleostearik asitin insan hücreleri üzerinde antikanserojenik etkiye sahip olduğu bilinmektedir [32,33]. Kudret narı KLNA'sının diyetinin etkileri farelerdeki kan dokusunda ve karaciğer lipidlerinde incelenmiş ve kudret narındaki α-eleostearik asitin antioksidan özellikleri olduğu rapor edilmiştir [34]. Başka bir çalışmada da α-eleostearik asitin *in vitro* şartlarında kuvvetli bir antioksidan olduğu ve *in vivo* şartlarında ise şeker hastalığındaki koroner kalp hastalığı riskini azaltabileceği vurgulanmıştır [35]. Diğer bir çalışmada ise kimyasal olarak sentezlenen α-eleostearik asitin, konjuge linoleik asitten (KLA) farelerdeki tümör hücreleri üzerinde daha etkili olduğu gözlenmiştir [36].

Koba ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise kalendik asitin zayıf vücut ağırlığında ve yağ dokusu ağırlığını azaltmada KLA'dan daha etkili olduğu bulunmuştur [37]. β-kalendik asit'in insan kolon kanseri hücrelerinde antikanserojenik etkiye sahip olduğu bilinmektedir [38].

Alkali izomerizasyon ile hazırlanan KLNA, konjuge eikosapentaenoik asit (EPA), konjuge dokosaheksaenoik asit (DHA) , konjuge olmayan linolenik asit, EPA, DHA'ya göre; insan tümör hücreleri üzerinde daha çok sitotoksik etkiye sahiptir [31].

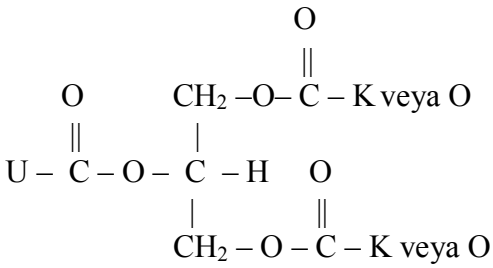
2.4 Yapılandırılmış Yağlar

Yağların temel yapısı, gliserol ve yağ asitlerinden oluşan triaçilgliseroldür (TAG). Yağlar triaçilgliseroller dışında mono ve digliseritler, fosfatidler, steroller, terpenler, yağ alkolleri, yağda çözünen vitaminler ve diğer bazı bileşenleri de içermektedirler. Yağlar suda çözünemezler, ancak eter, benzen, kloroform gibi organik çözücülerde çözünürler [39,40].

Yağların kimyasal yapısı, onun fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini belirler. Yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin hemen hemen tamamı yağ asitlerinin yağdaki oranı ve çeşitleri tarafından etkilenmektedir. Yağların fiziksel ve kimyasal yapısı,

triaçilgliserol üzerindeki yağ asitlerinin yapısına ve yağ asitlerinin gliserol iskelet üzerindeki dağılımına bağlıdır. Yağ asitleri, zincir uzunluğuna ve çift bağın sayı, pozisyon ve konfigürasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Triaçilgliserollerin kompozisyonu her yağa özgüdür. Yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerinin aynı olmamasının nedeni triaçilgliserol içindeki yağ asidi dağılımının ve yapısının farklılığıdır [41-43].

Yapılandırılmış yağlar triaçilgliserol (TAG)'lerin kimyasal ya da enzimatik yollarla tekrar yapılandırılması veya modifiye edilmesi ile elde edilir. Böylece TAG'ı oluşturan yağ asitlerinin yapı içerisindeki kompozisyonu ve dağılımı değiştirilir. Bu yağlar yeni nesil yağlar olarak tanımlanır [42,44]. Şekil 2.4'te yapılandırılmış yağların genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2.4 : Yapılandırılmış yağların genel yapısı (U: uzun zincirli yağ asidi, O: orta zincirli yağ asidi ve K: kısa zincirli yağ asidini ifade etmektedir) [44].

2.4.1 Yapılandırılmış yağ sentezlenmesinin nedenleri

Yapılandırılmış yağlar, yağların besinsel özelliklerini değiştirmek, fiziksel ve/veya kimyasal yapısını değiştirmek için sentezlenir. Yapılandırılmış yağ üretiminde farklı yağ asitleri kullanılarak her birinin özellikleri sayesinde bu özel yağların fizyolojik yararları da arttırılmış olmaktadır. Yapı taşları olarak kullanılan yağ asitlerinin TAG molekülündeki pozisyonu yapılandırılmış yağların sağlık için yararlarını belirlemektedir.

Yapılandırılmış yağların kalp ve beyin sağlığı için gerekli ve insan metabolizması üzerinde birçok faydasının olduğu yapılan çalışmalar sonucunda belirlenmiştir. Bağışıklık sisteminin geliştirilmesi, metabolizmadaki azot dengesinin düzenlenmesi ve kandaki kolesterol miktarının düşürülmesi yapılandırılmış yağların metabolizma üzerindeki faydalarından birkaçıdır. Bunun yanında sindirim ve emilim özellikleri değiştirilerek hazırlanan yapılandırılmış yağlar, belirli diyet yağlarını metabolize edemeyen veya pankreatik rahatsızlıkları bulunan kişiler için gerekli olmaktadır.

Yapılandırılmış yağlar kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu özelliklerinin yanında kanser oluşumunu inhibe edebilme ve trombozu önleyebilme etkisine de sahiptirler [44,45].

Ayrıca, bu yağlar TAG'ın erime sıcaklığı, katı yağ miktarı, iyot ve sabunlaşma değerleri gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değiştirilmesi amacıyla da üretilirler. Farklı nitelikte özel yağlar üretmek, doymamış yağ asidi içeren margarin üretmek, yağın kristal yapısını değiştirmek ve yağların erime özelliklerini geliştirmek yapılandırılmış yağların üretilmesinin diğer nedenleri arasındadır [46,47].

Yapılandırılmış yağların potansiyel kullanım alanları: margarinler, tereyağları, sürmeler, soslar; kızartma yağları; kakao yağı ikamesi; şekerlemeler; yumuşak şekerler; azaltılmış ve düşük kalorili yağlar; bebek mamaları; cipsler, unlu mamüller; çerez gıdalar; günlük süt ürünleri olarak özetlenebilir [42].

2.4.2 Yapılandırılmış yağ sentezinde kullanılan yağ asitleri

Yapılandırılmış yağ sentezinde çeşitli yağ asitleri kullanılmaktadır. Yapılandırılmış yağların istenilen özelliklere sahip olması için yağ asitlerinin hepsinin fonksiyon ve özelliklerini göz önünde bulundurmak son derece önemlidir. Yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılan yağ asitleri kısa zincirli yağ asitleri, orta zincirli yağ asitleri ve uzun zincirli yağ asitleri şeklinde sıralanabilir. Ayrıca çoklu ve tekli doymamış yağ asitleri de yapılandırılmış yağ üretiminde kullanılmaktadır. Kullanılan yağ asidi ve bunların TAG içindeki konumu yapılandırılmış yağların fiziksel, fonksiyonel ve metabolik özelliklerini belirler [48,49].

2.4.3 Yapılandırılmış yağların sentezi

Yapılandırılmış yağların sentezi, kimyasal ya da enzimatik yolla gerçekleştirilen esterleşme, iç esterleşme, alkoliz ve asidoliz reaksiyonları sonucunda gerçekleşir. Kullanılan substratın uygunluğuna ve istenen son ürüne bağlı olarak uygun bir metot tercih edilir [47,50].

Kimyasal yolla gerçekleştirilen sentezde, triaçilgliserollerde açil gruplarının tamamen rasgele dağılımları margarin ve sürme (spread) üretiminde dokulsal özelliklerin iyileştirilmesi, yağların erime özelliklerinin değiştirilmesi ve yağların stabilitenin artırılması için kullanılır. Reaksiyon alkali metal ve alkali metal alkilatı katalizörlüğünde gerçekleşir. Proses yüksek sıcaklık ve susuz ortam gerektirir.

Kimyasal transesterifikasyon yapılandırılmış yağ olarak bilinen istenen triaçilgliseroller ve ayrılması çok zor olan birçok istenmeyen yan ürünler ile sonuçlanır [43,44].

Enzimatik yöntem yapılandırılmış yağ üretiminde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Çalışmamızda enzimatik yöntemi kullandığımızdan dolayı bundan sonraki bölümlerde yapılandırılmış lipidlerin enzimatik üretimine dair bilgi verilecektir [44].

Esterleşme reaksiyonları (Esterifikasyon)

Esterleşme reaksiyonları hidrolizin tam tersi gerçekleşen bir reaksiyondur. Yağ asitlerinin gliserid ile reaksiyonu ile gerçekleşir. Hidroliz reaksiyonları ise, su varlığında yağların ester bağlarının kırılması ile gliserol, yağ asitleri ve kısmi açil gliserollere dönüştüğü reaksiyonlardır. Hidroliz ve esterifikasyon reaksiyonları arasındaki denge değişiminde ortamdaki su miktarı ve aktivitesi son derece etkilidir.

Esterifikasyon reaksiyonları tersinir reaksiyonlardır ve susuz ortamda gerçekleşirler. Bu nedenle hidroliz ve esterleşme reaksiyonları arasındaki denge, ortamdaki su miktarı ile kontrol edilir. Reaksiyon karışımında aşırı su olması durumunda denge hidroliz tarafındadır. Tam tersi şekilde, ortamda su miktarı sınırlıysa denge esterleşmeden yanadır. Ortamda biriken su lipazın aktivitesini inhibe ederek oluşan esterlerin hidrolizini artırdığından dolayı esterleşme esnasında ortaya çıkan suyun birikmesi sorun yaratır. Bu nedenle esterleşme sonucu ortaya çıkan su, moleküler elekler kullanılarak düzenli olarak ortamdan çekilmelidir. Enzimin aktivitesini koruyabilmesi için ortamda bir miktar su bırakılmalıdır [47,50,51].

Esterifikasyon sonucunda ortamda monoaçilgliseroller (MAG), diaçilgliseroller (DAG) ve triaçilgliseroller (TAG) oluşmaktadır. Reaksiyon ürünleri MAG, DAG ve TAG karışımı ile değişen oranlarda reaksiyona girmemiş gliseridden oluşmaktadır. Bu ürünlerin kozmetik, gıda, eczacılık gibi birçok alanda uygulaması mevcuttur [42,47,50,51]. Şekil 2.5'de genel olarak esterifikasyon reaksiyonu görülmektedir.

$$R_1COOH + R_2OH \rightleftharpoons R_1COOR_2 + H_2O$$

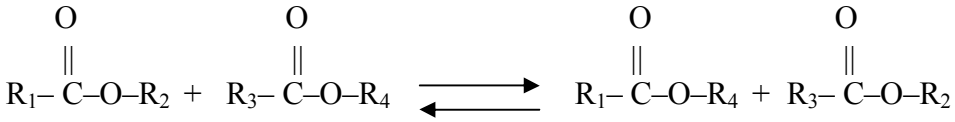
Şekil 2.5 : Esterifikasyon reaksiyonu [52].

İnteresterifikasyon (İç esterleşme)

İnteresterifikasyon reaksiyonları bir ester ile başka bir bileşen arasında gerçekleşen açil grup değişimleridir. Reaksiyonlara giren bileşenler asit, alkol veya ester olabilir. Reaksiyonlar sonucunda farklı bir ester oluşumu gerçekleşir. İnteresterifikasyon tek başına ya da diğer yöntemlerle beraber kullanılarak yapılandırılmış yağların fiziksel ve fonksiyonel açıdan istenilen özelliklerde üretilmelerini sağlamaktadır. Hem kimyasal hem de enzimatik olarak interesterifikasyon reaksiyonları gerçekleştirilebilmektedir [43,53].

Transesterifikasyon (Transesterleşme reaksiyonları)

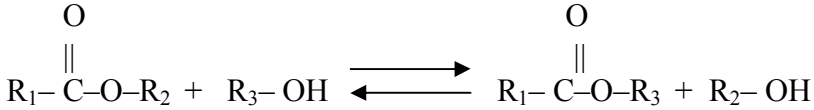
Transesterifikasyon reaksiyonu, iki ester arasında gerçekleşen açil grup değişimidir. Bunun yanında bazı kaynaklarda transesterifikasyon bir ester ile bir alkol, bir asit, bir başka ester veya amin arasında gerçekleşen reaksiyonları ifade eden genel bir terim olarak da kullanılmaktadır. Yapılandırılmış yağların üretiminde kullanılan en temel reaksiyonlardan biri transesterifikasyon reaksiyonudur. İki TAG arasından yağ asitlerinin yer değiştirmesi ile yeni TAG oluşumunu sağlayan transesterifikasyon reaksiyonu yağlara farklı özellikler kazandırmada son derece etkindir [43]. Şekil 2.6'da iki farklı triaçilgliserol arasındaki transesterfikasyon reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.6 : İki farklı triaçilgliserol arasındaki transesterifikasyon reaksiyonu [43].

Alkoliz

Alkoliz, bir alkol ve bir ester arasında gerçekleşen esterifikasyon reaksiyonudur. Şekil 2.7'de bir açilgliserol ve bir alkol arasında gerçekleşen alkoliz reaksiyonu görülmektedir. Alkoliz sırasında TAG'ların hidrolizi ile DAG ve MAG oluşabilir [43].

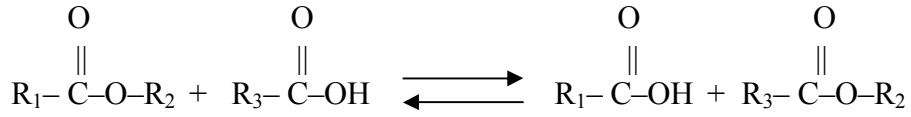


Şekil 2.7 : Bir açilgliserol ve bir alkol arasında gerçekleşen alkoliz reaksiyonu [43].

Alkolizin en temel uygulamalarından biri gliseroliz reaksiyonudur. Gliseroliz reaksiyonu, triaçilgliserol ve gliserol arasındaki açil grup değişimidir. Gliseroliz sonucunda TAG, DAG ve MAG'lar oluşmaktadır. Alkoliz reaksiyonu bir denge reaksiyonudur ve alkol fazlası reaksiyonu ürün lehine döndürür. Alkoliz reaksiyonlarında metanol, bütanol, propanol gibi basit alkoller kullanılır. Bu alkoller arasında en çok metanol kullanım alanı bulmaktadır. Çünkü, metanol kısa zincirli bir alkoldür ve polar bir bileşiktir [54].

Asidoliz

Asidoliz bir asit ve bir ester arasındaki açil grup değişiminin gerçekleştiği esterifikasyon reaksiyonudur. Asidoliz reaksiyonu ile bir yağ asidini TAG molekülüne bağlamak mümkündür. Belirli fonksiyonlara sahip serbest yağ asitlerini bitkisel yağlara bağlayarak bu yağların besin değerleri yükseltilebilir [43,55]. Şekil 2.8'de bir açilgliserol ve bir asit arasındaki asidoliz reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 2.8 : Bir açilgliserol ve bir asit arasındaki asidoliz reaksiyonu [43].

2.4.4 Enzimatik proseslerde ürün verimini etkileyen faktörler

Reaksiyonlarda kullanılacak enzim çeşidi, enzimin aktivitesi, enzimin miktarı, enzimin yükü, enzimin substrata tipine seçiciliği, su miktarı, solvent çeşidi, ortamın pH'sı, substrat-molar oranı, inkübasyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı, prosesi ve ürün verimini etkileyen temel faktörlerdir [44,56].

Reaksiyonların hangi şartlar altında yürütüleceği substratın tipine ve istenen son ürünün özelliklerine bağlı olarak belirlenir [44,56].

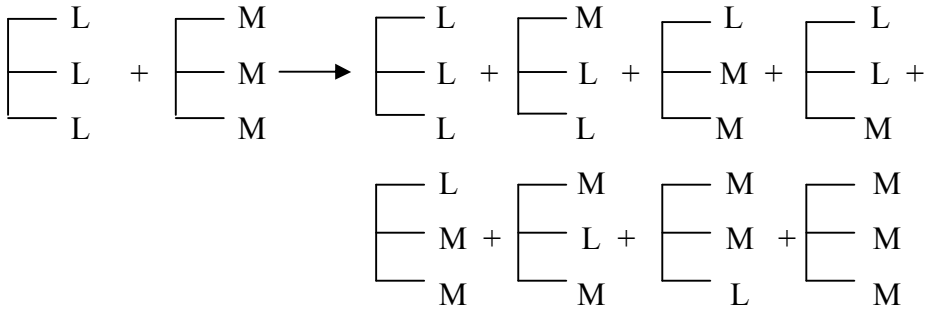
Lipaz seçiminin etkisi

Lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilen reaksiyonlarda en yüksek verimle en yüksek saflıkta ve istenen özellikte ürün elde etmek amaçlanmaktadır. Bu nedenle reaksiyon veriminin artırılmasında proses koşullarının optimizasyonu yanında enzim seçimi de oldukça önem taşımaktadır [43].

Lipazlar substrat seçiciliği açısından değişiklik gösterirler. Lipazın seçicilik özelliği enzimin moleküler seçicilik özelliği, substratın yapısı ve enzimin substrata

bağlanmasını etkileyen faktörler tarafından kontrol edilir. Lipazların sahip oldukları yağ asidi seçicilikleri, insan sağlığını olumlu yönde etkileyecek yağ üretiminde ve yağın besin değerini arttırmak için yağ asitleri ile zenginleştirmede kullanılmaktadır. Lipazların pozisyonel seçiciliği, substrat seçiciliği ve stereospesifikliği sayesinde daha verimli bir şekilde istenen özelliklerde yapılandırılmış yağ üretmek mümkündür [57,58].

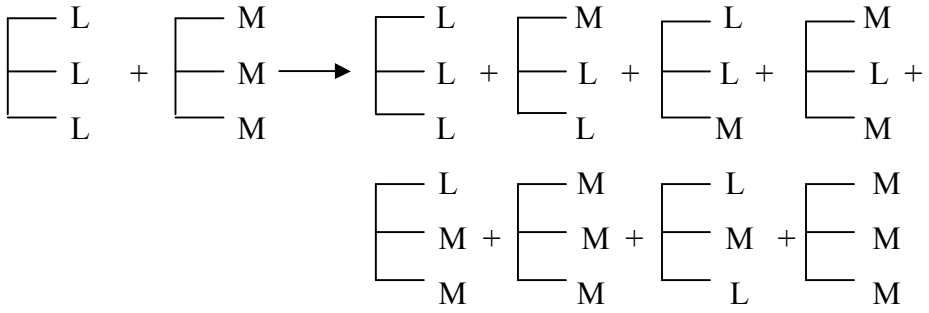
Bazı lipazlar yağ asitleri ile gliserid iskeleti arasındaki bağları gelişigüzel şekilde parçalarlar. Pozisyonel seçicilik özelliğine sahip olmayan bu tür lipaz kaynaklarına örnek olarak *Candida sp.* ve *Pseudomonas sp.* gösterilebilir [58]. Şekil 2.9'da pozisyonel seçiciliğe sahip olmayan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonlarının genel yapısı görülmektedir . Şekil 2.9'daki MLL, LML, LLM, LMM, MLM ve MML yapılandırılmış yağları ifade etmektedir.



Şekil 2.9 : Pozisyonel seçiciliğe sahip olmayan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonları (L: Uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi) [59].

Pozisyonel seçicilikleri olan lipazlar ise sadece sn-1 ve sn-3 pozisyonundaki yani dıştaki ester bağlarını parçalamaktadırlar. *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus* ve *Rhizopus delemar*, sn-1 ve sn-3 pozisyonunda seçiciliğe sahip olan lipazlara örnek olarak gösterilebilir [58].

Şekil 2.10'da , sn-1 ve sn-3 pozisyonunda seçiciliğe sahip olan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonlarının genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2.10 : sn-1 ve sn-3 pozisyonunda seçiciliğe sahip olan lipazların varlığında gerçekleşen interesterifikasyon reaksiyonları (L: Uzun zincirli yağ asidi, M: orta zincirli yağ asidi) [59].

Yağ asidinin zincir uzunluğuna göre seçici olan lipazlar da bulunmaktadır. Örneğin, *Penicillium cyclopium* lipazı uzun zincirli yağ asitlerini parçalamaktadır. Bunun yanında *Aspergillus niger* ve *Aspergillus delemar* lipazları ise kısa zincirli yağ asitlerine seçicilik göstermektedir. Ayrıca yağ asidi seçici özelliğine sahip lipazlar da mevcuttur. Bu lipazlar cis-9 pozisyonuna karşı duyarlıdırlar. *Geotrichum candidum* lipazı cis-9 pozisyonunda çift bağ içeren uzun yağ asitlerine yönelik seçici özellik göstermektedir [58,59].

Su miktarının etkisi

Su miktarı, hem reaksiyon verimini hem de reaksiyon hızını etkiler. Lipazların katalizlediği reaksiyonlar tersinir reaksiyonlardır. Hidroliz reaksiyonunda su tepkimeye girerken, esterifikasyonda su ürün olarak görünmektedir. Su miktarına göre reaksiyon hidroliz ya da esterifikasyon yönünde gerçekleşir [55,56].

Enzimlerin büyük bir kısmı işlevlerini su içerisinde gösterdiklerinden suyun miktarı enzim işlevinde etkili bir parametredir. Enzimlerin sahip oldukları üç boyutlu yapıyı korumaları için ortamda belirli miktarda suyun mevcut olması gerekmektedir. Fakat ortamda aşırı miktarda su bulunması enzim aktivitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Su içeriğinin reaksiyon hızına etkisi enzim kaynağı ve substratı oluşturan bileşenlere göre değişmektedir. Bazı reaksiyonlarda az miktarda su ile yüksek verim elde edilirken, bazılarında ise su miktarı arttıkça reaksiyon hızı da artmaktadır [59,60].

Sürenin etkisi

Enzimatik yöntemle yapılandırılmış yağ üretiminde reaksiyonların en kısa sürede en verimli şekilde gerçekleşebilmeleri üretim maliyetlerini düşürmede son derece

etkilidir. Genel olarak uzun reaksiyon sürelerinin, açil migrasyonunu arttırmasından dolayı daha etkili oldukları bilinmektedir. Enzimatik reaksiyonlarda triaçilgliserollere yağ asitlerinin katılımı belli bir süreden sonra sabitlenmektedir. Kullanılan enzimlere ve substratlara göre hem yağlara modifiye olan yağ asidi yüzdeleri hem de reaksiyonların gerçekleşme süreleri değişim göstermektedir [61,62].

Sıcaklığın etkisi

Sıcaklık enzim aktivitesini belirlemede önemli bir faktördür. Her enzim için optimum sıcaklık farklıdır. Enzim kaynağı, immobilize olup olmaması ve ortam pH'ı, enzim için optimum sıcaklığı belirlemede etkili olan parametrelerdir. İmmobilize enzimler için optimum sıcaklık 30-62 ^{o}C aralığındadır. Genel olarak sıcaklık artışı reaksiyon hızının artmasına neden olur. Sıcaklık arttıkça hem enzim aktivitesi artış gösterir hem de açil migrasyonu hızlanır. Fakat çok yüksek sıcaklıklarda enzimler bozunurlar, düşük sıcaklıklarda ise enzimlerin etkinlikleri azalır. Ayrıca yüksek sıcaklıklarda yağ asitlerinin ısıl bozunmaya uğramaları da reaksiyon hızını azalmaktadır. Bu nedenle reaksiyonlarda optimum çalışma sıcaklığının seçilmesi, enzimin etkinliğini en iyi şekilde gösterebilmesi ve maksimum verimin elde edilmesi açısından son derece önemlidir [62].

Substrat-molar oranının etkisi

Reaksiyonlarda kullanılan substrat-molar oranı genellikle proses maliyetine, serbest yağ asitlerinin veya açil vericilerin evaporasyon veya distilasyon ile uzaklaştırılmasındaki güçlüklere bağlı olarak seçilir. Kullanılan substrat-molar oranı inhibisyona sebep olmayacak bir aralıkta olmalıdır. Belli bir değere kadar substrat-mol oranının artması TAG yapısına istenen yağ asidinin bağlanmasını artırırken aşırı substrat kullanmak inhibisyona sebep olabilir [44,51,55,56].

Solvent sisteminin etkisi

Biyokatalizörler varlığında gerçekleştirilen enzimatik reksiyonlarda seçilen solventin çeşidi, özellikleri ve karışımın su içeriği oldukça önemlidir. Solvent sistemi, istenen TAG özelliklerini elde etmeye elverişli ve proses koşullarını olumsuz yönde etkilemeyecek şekilde oluşturulmalıdır. Özellikle organik solventlerin seçiminde büyük özen göstermek gerekir. Çünkü, organik solventlerin bazıları, enzimatik

reaksiyonları inhibe edebilme etkisine sahiptir. Ayrıca solventlerin hidrofobikliği veya polariteleri enzimlerin üç boyutlu yapılarının korunmasında önemli etkiye sahiptir [43,62].

2.4.5 Kimyasal ve enzimatik yöntemlerin kıyaslanması

Kimyasal ve enzimatik yöntemlerde oluşan reaksiyonlar, açığa çıkan ürünler ve proseslerin işleyişleri bakımından farklılık göstermektedir. Enzimatik reaksiyonların diğer reaksiyonlara göre en önemli avantajı reaksiyonun daha ılımlı koşullar altında yürütülmesidir. Enzimatik reaksiyonlar kimyasal reaksiyonlara oranla daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir. Böylece enzimatik yöntem ile substratın bozunma olasılığı azalır ve enerji tasarrufu sağlanır [44,63].

Enzimatik yöntemde enzimlerin seçicilik özellikleri kullanılarak tepkimeleri yönlendirebilmek mümkün olduğundan istenen niteliklere sahip ürünler elde edilebilir. Enzimlerin seçicilik özellikleri sayesinde yağ asitlerinin TAG yapısındaki dağılımları kontrol edilebilir. Kimyasal katalizörler ise seçicilik özelliğine sahip olmadıklarından, TAG karışımlarında yağ asitlerini rasgele dağıtırlar. Bunun yanında kimyasal reaksiyonlarda istenen özelliklere sahip ürün haricinde istenmeyen pek çok yan ürün oluşumu da gerçekleşmektedir. Enzimatik reaksiyonla oluşan ürünler ise kolay saflaştırılabilir ve reaksiyon sonunda daha az atık oluşur. Enzimatik yöntemde istenmeyen yan reaksiyonlar daha az sayıda oluşur proses kolay bir şekilde kontrol edilebilir [43,62,64].

Son yıllarda yapılandırılmış yağ üretimi ile ilgili gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda, enzimatik yöntemin kimyasal yönteme oranla daha çok tercih edildiği görülmektedir. Enzimatik yöntemin daha fazla uygulama alanı bulmasında, lipazların seçici özellikleri, ılımlı reaksiyon koşulları ve tanımlanan yapıya sahip ürün elde edilebilmesinin kolaylığı büyük rol oynamaktadır [64].

Enzimatik yöntem ile yapılandırılmış yağ üretiminin birçok avantajı olmasına rağmen ticareti halen başlangıç aşamasındadır. Bu durumun başlıca nedenleri arasında enzimin fiyatı ve büyük ölçekteki proseslerin sorunları yer alır. Bu dezavantajların uygun şekilde proses koşullarının lehi yönünde farklılaştırılması ile enzimatik yöntem ticari anlamda daha çok kullanım alanı bulacaktır [62,64].

2.5 Yapılandırılmış Yağ Üretimi ile İlgili Literatür Çalışması

Literatürde konjuge linolenik asitler ile modifiye yapılandırılmış lipidlerin üretimleri üzerine yürütülmüş herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bitkisel yağlara KLNA katılımı ile ilgili çalışmalara İTÜ Kimya mühendisliği bölümünde bitirme ödevleri kapsamında başlanılmıştır. Konjuge linoleik asit (KLA) ile ilgili yapılandırılmış yağ çalışmalarına bazı örnekler verilmiştir.

Bihter Özdoğan ve arkadaşları 2008 yılında soya yağından KLNA ile modifiye lipid üretimi konusunda bir bitirme ödevi hazırlamışlardır. KLNA kaynağı olarak nar çekirdeği yağı yağ asitleri kullanılmıştır. Reaksiyonlar 50 ºC sıcaklıkta, 1:3, 1:4, 1:5 mol oranlarında, 1, 3 ,5 saatlik reaksiyon sürelerinde yürütülmüştür. Ağırlıkça % 10 *Thermomyces lanuginosa* lipaz enzimi kullanılmıştır. Asidoliz reaksiyonları 1:5 mol oranında sabit alınarak 3 saatlik reaksiyon süresinde, enzim miktarları % 10, 15 ve 20 oranlarında değiştirilmiştir. Çalışmada en fazla KLNA katılımı, ağırlıkça % 20 enzim miktarında, 50 ºC sıcaklıkta, 1:5 mol oranında % 45 olarak elde edilmiştir [65].

İpek Öztürk ve Gülden Ergün tarafından 2007 yılında gerçekleştirilen diğer bir bitirme ödevinde ise zeytinyağına nar çekirdeği yağından elde edilen KLNA katılımı incelenmiştir. Çalışmada *Thermomyces lanuginosa* lipaz enzimi kullanılmıştır. Asidoliz reaksiyonları 1:1, 1:3, 1:5 mol oranlarında, 50 ºC'de, toplam substrat miktarının % 12 enzim oranında 2, 4, 6 saatlik reaksiyon sürelerinde gerçekleşmiştir. Mol oranının reaksiyon süresinin etkileri incelenmiştir. Optimum mol oranı 1:5 ve optimum reaksiyon süresi 4 saat olarak belirlenerek bu koşullarda % 45 KLNA katılımına ulaşılmıştır [66].

Esra Demiröz 2007 yılında yapılandırılmış yağ üretimi konusunda bir bitirme ödevi hazırlamıştır. Bu çalışmada kanola yağı, *Thermomyces lanuginosa* enzimi kullanılarak KLA ile zenginleştirilmiştir. Asidoliz reaksiyonları 50 ºC sıcaklıkta, 1:3, 1:4, 1:5 kanola yağı: KLA mol oranlarında ve 2, 4, 6 saatlik reaksiyon sürelerinde gerçekleştirilmiştir. Enzim miktarı toplam substrat miktarının % 12'si olarak seçilmiştir. Çalışma sonucunda maksimum KLA katılımı 1:5 mol oranında 6 saatlik reaksiyon süresinde % 46 olarak gerçekleşmiştir [67].

Kıvanç Kızılkurt 2007 yılında bitirme ödevi kapsamında kanola yağına, *Thermomyces lanuginosa* enzimi varlığında KLA katılımı ile yapılandırılmış yağ

sentezi konusunda çalışmıştır. Asidoliz reaksiyonları kanola yağı: KLA 1:3 mol oranında sabit alınarak 50 ºC sıcaklıkta 6 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Enzim miktarları % 6, % 9 ve % 12 oranlarında seçilmiş ve KLA katılımı % 35,7 iken optimum enzim miktarı % 9 olarak tespit edilmiştir [68].

Demet Şeleci 2007 yılında zeytinyağından KLA ile yapılandırılmış yağ üretimi ve optimizasyonu üzerine çalışmıştır. Reaksiyonlar 50 ºC sıcaklıkta, *Thermomyces lanuginosa* orjinli Lipozyme TL IM lipaz enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tepki Yüzey Metodolojisi uygulanarak reaksiyon parametrelerinin (enzim miktarı, substrat mol oranı, reaksiyon süresi) zeytinyağına katılan KLA yüzdesi üzerine olan etkileri incelenmiş ve reaksiyon koşulları optimize edilmiştir. Üç değişkenli ve üç seviyeli Yüzey Merkezli Küp Deney Tasarımı kullanılarak optimum reaksiyon koşulları % 7,1 enzim miktarı, 1:6 zeytinyağı: KLA mol oranı ve 7,9 saat reaksiyon süresi olarak bulunmuştur. Bu koşullarda ulaşılan KLA katılım oranı ise % 48,2'dir [69].

Pelin Baykar'ın 2006 yılında hazırlamış olduğu diğer bir bitirme ödevi çalışmasında çörek otu yağının KLA ile asidoliz reaksiyonları incelenmiştir. Çalışmada *Thermomyces lanuginosa* enzimi substrat miktarının % 12'si oranında kullanılmıştır. Reaksiyonlar 50 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Çörek otu yağı KLA mol oranı 1:1, 1:3 ve 1:5 olacak şekilde seçilmiştir. Bu koşullar altında optimum KLA katılımı için reaksiyon süresi 6 saat ve mol oranı 1:3 olarak belirlenmiştir [70].

Nurcan Bakır 2005 yılında fındık yağının KLA ile zenginleştirilmesi üzerine bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmada Lipozyme IM enziminin Lipozyme RM ve Novozyme enzimleri ile karşılaştırıldığında en yüksek verimi verdiği görülmüş ve çalışmada bu enzim kullanılmıştır. Sıcaklık, reaksiyon süresi ve substrat-molar oranının reaksiyon verimine etkileri incelenmiştir. Deney sonucunda mol oranındaki artışın süreden bağımsız olarak katılımı arttırdığı görülmüştür. En yüksek katılım oranının elde edildiği koşulların 59 °C sıcaklık, 6 saat süre ve 4:1 substrat molar oranında % 49,42 olduğu bulunmuştur [53].

Literatürde soya yağının KLA ile zenginleştirilmesiyle ilgili tek çalışma, Ortega ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada asidoliz reaksiyonlarında *Candida antartica*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas sp.* ve *Thermomyces lanuginosus* orjinli enzimler toplam substrat ağırlığının % 5'i kadar kullanılmışlardır.

En hızlı reaksiyon *Rhizomucor miehei* lipazı ile en yüksek KLA katılımının ise 12. saatte gerçekleştiği gözlenmiştir [71].

Bu çalışmada soya yağına KLNA katılımının etkileri incelenmiş ve Tepki Yüzey Metodolojisine göre optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmada *Thermomyces lanuginosa* orijinli Lipozyme TL IM lipaz enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon süresi, sıcaklık, enzim miktarı, substrat mol oranının etkileri incelenmiş ve reaksiyon süresinin KLNA katılımını etkilemediği görülmüştür. Bunun yanında enzim miktarındaki değişiklik de reaksiyon verimini büyük ölçüde etkilememektedir. Reaksiyon koşulları 2 değişken ve 3 seviyeli modele uygun olarak optimize edilerek istatiksel değerlendirme sonucunda optimum koşullar belirlenmiştir.

2.6 Tepki Yüzey Metodolojisi (Response Surface Methodology)

Tepki yüzey metodolojisi (TYM), optimum proses koşullarını, özel deney tasarımları ile birleştirerek birinci ve ikinci dereceden polinom denklemleri ile birlikte bir ardışık deney prosedürü içersinde kararlaştıran bir optimizasyon tekniğidir. 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. Kısacası, Tepki yüzey metodolojisi tepkinin en iyi değerini (optimum değerini) bulmak için oluşturulmuş teknikler bütünüdür. TYM ile bir seferde, seçilen bağımsız değişkenlerin tepki üzerindeki etkileri görülebilmekte ve özel deney tasarımları kullanılarak optimizasyon için gerekli deney sayısı azaltılabilmektedir [72-74].

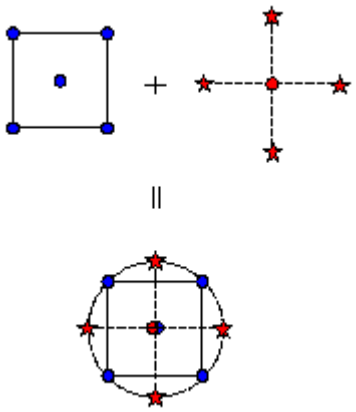
TYM uygulanırken ilk olarak ölçülmek istenen tepkiye en fazla etki ettiği düşünülen değişkenler belirlenir. Literatür araştırmaları ve yapılan ön deneyler yardımıyla değişkenlerin ölçülecekleri değer aralıklarına karar verilir. Daha sonra proses için en uygun model denkleminin seçilmesi gerekir. Model denklemde, ölçülen tepki incelenen proses değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak ifade edilir. Bu denklemler birinci ve ikinci dereceden olabilir. TYM ile yapılan çalışmalarda ikinci dereceden denklemlerin daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Model denklem belirlendikten sonar uygun deney tasarımı tespit edilir. Bunlar arasında en önemlileri, merkezi bileşik, Box-Behnken, tam faktöryel, kısmi faktöryel, rastgele, Latin kareler,

Taguchi, Placekett-Burmann deney tasarımlarıdır. Bu tasarımlar ile optimizasyon için gerekli olan deney sayısı ve deney şartları belirlenmiş olur. Bu tasarımlar sayesinde elde edilen sonuçlar tepki yüzey ve izdüşüm (contour) grafikleri haline getirilerek yorumlanabilir [73,75,69].

2.6.1 Merkezi bileşik deney tasarımları

Merkezi bileşik deney tasarımları içinde sınırlandırılmış, dışından çemberlenmiş ve yüzey merkezli olmak üzere üç çeşittir. Deneyler için kullanılan faktörlerin seviye değerleri bu tasarım türlerinin belirlenmesinde etkilidir [73,76].

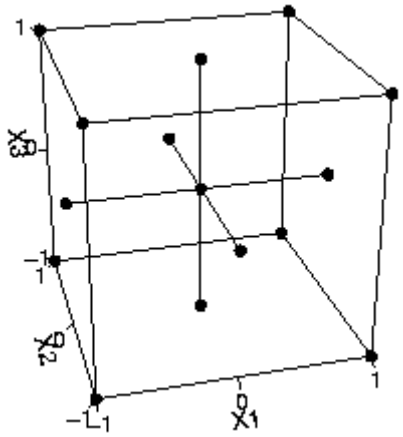
Bu tasarımlara merkezi bileşik denilmesinin sebebi; iki seviyeli tam faktörlü bir yapıda olan sekiz köşeli küp noktaları (cube points), yıldız noktalar olarak bilinen her yüzeyin merkezindeki altı nokta (star or axial points) ve merkez noktaları (center points) olmak üzere üç tip deneysel noktadan oluşmasındandır. Şekil 2.11'de bu noktalar görülmektedir [76,77].



Şekil 2.11 : Üç faktörlü bir sistem için merkezi bileşik deney deseni [77].

Küp noktaları için kodlanan bağımsız değişken değerleri ±1'dir. Merkezi bileşik deney tasarımında yıldız noktalarının (±α, 0, 0,…,0), (0, ±α, 0,…,0), (0, 0,…, ±α) koordinatları vardır. Merkez noktalarının koordinatları ise daima (0,…,0) olan ve tasarım merkezine yerleşen noktalardır [73,76,77].

Şekil 2.12'de üç değişkenli bir sistem için yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarım noktaları görülmektedir. Faktörler x_1, x_2, x_3 şeklinde ifade edilmektedir [73,76,77].



Şekil 2.12 : Yüzey merkezli merkezi bileşik deney tasarım noktaları örneği [78].

Yüzey merkezi deney tasarımında (Face-centered design) α=1'dir. Tasarım merkezi (0,0,0) koordinatlarına sahip merkez noktasıdır. Bu deney tasarımında yıldız noktalar küpün yüzeylerinin tam ortasında yer almaktadır [76].

2.6.2 Varyans analizi (ANOVA)

ANOVA bağımsız değişkenlerin kendi aralarında nasıl etkileşime girdiklerini ve bu etkileşimlerin bağımlı değişken üzerindeki etkilerini analiz etmek için kullanılır. Çok sayıda bağımsız değişken varsa ANOVA kullanılır ve deney sonuçlarını toplu olarak yorumlanır. İstatiksel tekniklerin genel toplamı olan ANOVA analizinde deneysel uyarının başarılı olup olmadığı belirlenir fakat hangi deneylerin uygun olup olmadığını belirlenemez [77,78].

Varyans analizlerinden elde edilen önem seviyesi (anlamlılık düzeyi) yardımıyla testler sonucunda verilen kararın doğruluğunun ne kadar olasılıkla güvenli olduğu belirlenir. Genellikle α ile gösterilen bu ihtimal, çoğu zaman örneklerin alınmasından önce tayin edilir. Böylece, elde edilen sonuçların yapılan seçimden etkilenmemesi sağlanmış olur. Uygulamada daha çok 0,05 ve 0,01 önem seviyeleri kullanılır. Bir hipotez testinde örneğin 0,05 (veya % 5) önem seviyesi esas alındığında, hipotezin kabul edilebileceği halde reddedilme olasılığı yüzde 5 civarındadır. Yani test sonunda verilen kararın doğruluğu % 95 güvenli bulunabilir. Bu halde hipotezi %5 önem seviyesinde reddedildiğinden bahsedilir. Bunun anlamı, hata yapma olasılığının %5 olduğudur [69,76].

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 $F_{çizelge}$ değerleri kıyaslanarak anlaşılır. Modelin geçerli olabilmesi için $F_{hesaplanan} > F_{çizelge}$ olmalıdır [69,79].

2.6.3 Regresyon analizi

Regresyon analizi bağımlı değişken ile bir veya daha çok bağımsız değişken arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla kullanılan bir analiz yöntemidir. Bir tek bağımsız değişkenin kullanıldığı regresyon tek değişkenli regresyon analizi, birden fazla bağımsız değişkenin kullanıldığı regresyon analizi de çok değişkenli regresyon analizi olarak adlandırılır. Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasında en uygun bağlantıyı tespit etmek amacıyla en uygun deneysel tasarım seçilir. Yapılan deneylerle elde edilen veriler, regresyon analizi sonucunda matematiksel bir formül şeklinde ifade edilir [73,78].

2.6.4 Kalanların toplamı

Kalanların toplamı, seçilen modelin doğru bir model olup olmadığını gösterir. Bu toplam (residual), deneylerde gözlenen değer (y) ile model denkleminden elde edilen ($\hat{y}$) değerler arasındaki farkların toplamıdır ve bu farklar ne kadar küçükse ($r << 1$), kullandığımız model o kadar gerçeğine yakın çözüm üretmektedir. Bu nedenle de bu toplamın sıfır ya da sıfıra yakın bir değer olması gerekir [79].

Matematiksel ifadesi aşağıdaki gibidir :

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

2.6.5 Korelasyon sayısı

Korelasyon katsayısı ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkinin yönü ve büyüklüğü belirlenebilir, sebep-sonuç ilişkisi belirlenemez. Korelasyon analizinin yapılacağı değişkenler arasında etkileşime bakılırken, regresyon analizinde olduğu gibi bağımlı değişken veya bağımsız değişken olma şartı aranmaz. Korelasyon katsayısı (R), modelden elde edilen değerlerin (y), deneysel sonuçların ortalama değerinden ($\tilde{y}$) uzaklaşma derecesini verir ve aşağıdaki ifadeden bulunur [75,76].

$$R^2 = \frac{\sum (y - \tilde{y})^2}{\sum (y - \tilde{y})} \qquad (\mathbf{2.2})$$

Bu katsayı -1 ile +1 arasında bir değişmektedir. Pozitif değerler direk yönlü doğrusal ilişkiyi; negatif değerler ise ters yönlü bir doğrusal ilişkiyi belirtir. Korelasyon katsayısının 0 olması söz konusu değişkenler arasında doğrusal bir ilişkinin olmadığı anlamına gelir. Korelasyon katsayısının 0,71 üstünde olması beklenir. Genellikle, 0-0,49 arasında ise korelasyon zayıf, 0,5-0,74 arasında ise orta derecede, 0,75-1 arasında ise kuvvetli ilişki vardır [77,79].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Hammaddeler

Deneysel çalışmada Soyola marka soya yağı kullanılmıştır. KLNA içeren mahlep yağ asitleri ise İstanbul Kapalı Çarşı'dan temin edilen mahlep tohumlarından elde edilmiştir. Asidoliz reaksiyonlarında Lipozyme TL IM ticari lipaz enzimi kullanılmıştır. *Thermomyces lanuginosa* orijin ve 1,3-spesifikliği olan bu enzim Novo-Nordisk A/S (Copenhagen, Danimarka) firmasından satın alınmıştır. Reaksiyon ürünlerinin analizlerinde, yağ asitlerinin bileşimlerinin saptanması ve tanımlanmasında kullanılan tüm çözücüler ve kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiş saf ürünlerdir.

3.2 Çalışma Yöntemi

3.2.1 Mahlep yağının ekstraksiyonu

Mahlep yağı elde etmek amacıyla yaklaşık 2 kg mahlep tohumu kullanılmıştır. Mahlep tohumları tartıldıktan sonra blenderda öğütülmüştür. İçerisinde 35 gr öğütülmüş mahlep tohumu bulunan behere 500 mL hekzan ilave edilmiş ve bu karışım magnetik karıştırıcıda oda sıcaklığında güneş ışığı görmeyecek şekilde önlem alınarak 2 saat süresince karıştırılmıştır. Karışım adi süzgeç kağıdından süzülmüş ve hekzan döner buharlaştırıcılı evaporatörde uçurulmuştur. Elde edilen mahlep yağı +4 ^{o}C sıcaklık ve karanlıkta saklanmıştır.

3.2.2 Mahlep yağından serbest yağ asitlerinin hazırlanması

Sabunlaşma reaksiyonunda kullanılmak üzere 1 N KOH çözeltisi hazırlanmıştır. 9 gr mahlep yağına 90 mL KOH çözeltisi eklenmiş ve su banyosunda geri soğutucu altında 1 saat sabunlaşma reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Süre sonunda sabunlaşmış çözeltiye 90 mL distile su ilave edilmiş ve bu çözelti hekzan (2x90 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Sabunlaşmayan maddeler hekzan vasıtasıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Sabunlaşan maddeleri içeren sulu faz 3 N HCl (33,75 mL) ile asitlendirilmiştir.

Asitlendirme işleminden sonra karışım tekrar ayırma hunisine alınarak açığa çıkan serbest yağ asitleri hekzan (2x100 mL) ile ekstrakte edilmiştir. Hekzan fazı nötr olana kadar su ile (3x50 mL) yıkanır. Hekzan daha sonra döner buharlaştırıcılı evaporatörde uçurularak mahlep yağ asitleri elde edilmiştir.

3.2.3 Kullanılan hammaddelerin karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan substratların (soya ve mahlep yağı) yağ asitleri bileşimleri gaz kromatografisi (GC) ile saptanmıştır. Bu amaçla önce substratların 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, 20:0, 20:1, 22:0 yağ asitlerinden ibaret standart yağ asitlerinin metil esterleri karışımı (Sigma-Alderich) ile standart KLNA metil esterleri karışımı (Arkansas Üniversitesi, Gıda Bilimleri Bölümü, Amerika Birleşik Devletler)'nın aynı cihaz ve koşullarda yapılan analizlerinden elde edilmiş kromatogramlar kullanılmıştır. Uygulanan kromatografik analiz koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 : Gaz kromatografik analiz koşulları.

Dedektör tipi Dedektör sıcaklığı (^{o}C) Injeksiyon sıcaklığı (^{o}C)	FID [(1)] 280 250
Gaz hızları (mL/dak) Azot Hidrojen Hava Dağıtma oranı	 1,6 33 460 88:1
Fırın sıcaklığı (^{o}C)	150 ^{o}C 150-225 ^{o}C (5 ^{o}C/dak) 225 ^{o}C (10 dak)
Kolon tipi	Kapiler kolon TRB-5 ht [(2)]

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

3.2.4 Soya yağı ile mahlep yağ asitlerinin asidoliz reaksiyonunda uygulanan yöntem

Asidoliz reaksiyonları 20 mL'lik koyu renkli, kapaklı ve ısıya dayanıklı cam reaksiyon şişelerinde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon şişesine yaklaşık 1 gram substrat karışımı konulmuştur. Bu karışım belirli reaktan mol oranlarında soya yağı ve mahlep yağ asitleri (MYA)'den oluşacak şekilde hazırlanmıştır. Karışıma 5 mL hekzan ve toplam substrat miktarının ağırlıkça belli orandaki yüzdesi kadar Lipozyme TL IM enzimi ilave edilmiştir. Böylece reaksiyonun gerçekleşeceği karışım hazırlanmış ve bu karışım sıcaklığın belirlenen değerlerde sabit tutulduğu orbital çalkalayıcıya (Edmund Bühler, KS-15 Almanya) yerleştirilmiştir. Reaksiyon sırasında reaksiyon karışımı 220 rpm sabit hızla karıştırılmıştır. Karışımdan belirli zaman aralıklarında 2'şer mL'lik numuneler alınmıştır. Bu numunelerin analizleri yapılarak asidoliz reaksiyonunun ilerleyişi incelenmiş ve değerlendirmeler yapılmıştır.

3.2.5 Asidoliz ürünlerinin analizi

Reaksiyon karışımından alınmış numunelere önce reaksiyonu durdurmak amacı ile 5 mL etanol ilave edilmiştir. Asidoliz reaksiyonun ana ürünü, soya yağı triaçilgliserollerinden türemiş yeni bir yağ asidi profiline sahip triaçilgliseroller (TAG'lar) dır. Bu TAG'lar ortamda reaksiyona girmemiş MYA ve soya yağından açığa çıkmış yağ asitleri ile birlikte bulunurlar. Yeni oluşmuş yapılandırılmış TAG'larin en doğru şekilde analizlerinin yapılabilmesi için, ortamdaki serbest yağ asitlerinin nötralize edilerek uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla reaksiyon sonrası 5 mL etanol ilave edilmiş numunelere 5 mL hekzan eklenmiştir. Bu karışım fenolftalein indikatörlüğünde 0,02 M NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Böylece numune içerisindeki serbest yağ asitlerinden sodyum sabunları elde edilmiştir. Titrasyon işlemi tamamlanan numuneler, ekstraksiyon işlemini gerçekleştirebilmek amacı ile 500 mL'lik ayırma hunisine alınmıştır. Ayırma hunisindeki numune üzerine 25 mL destile su ve 50 mL hekzan ilave edilmiş ve iyice çalkalanmıştır. TAG'lar hekzan fazında çözünürken, su fazına ise yağ asitleri sodyum sabunları geçmiştir. Bu iki fazın birbirinden en iyi şekilde ayrılabilmesi için bir süre beklenilmiştir. Hekzan fazı tamamen nötr olana kadar su ile birkaç kez yıkanmıştır. Bu işlem tamamlandıktan sonra ayırma hunisinden alınan yapılandırılmış TAG içeren hekzan

fazı döner buharlaştırıcıda çözücüsü tamamen uçurulana kadar evapore edilmiştir. Bu şekilde saf olarak TAG ürünleri elde edilmiştir.

Elde edilmiş olan TAG fraksiyonları 0,4 M metanolik sodyum hidroksit ve BF_3 ile metil esterlerine dönüştürülmüştür. Bunun sonrasında oluşan TAG'ların yağ asidi bileşimleri gaz kromotografisinde Bölüm 3.2.1'de açıklanan analiz koşullarında belirlenmiştir. Gaz kromatogramlarının değerlendirilmesi sonucunda yapılandırılmış TAG'larin yağ asidi bileşimleri ve soya yağına katılan konjuge linolenik asit yüzdesi tespit edilmiştir.

3.2.6 Deneysel tasarımda kullanılacak değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi

Bu çalışmada, enzimatik olarak soya yağından konjuge linolenik asitçe zenginleşmiş TAG'ların eldesinde, reaksiyon parametrelerinin (değişkenlerin) ürün bileşimi üzerine olan etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacı ile deneysel tasarımdan yararlanılmıştır. Bu amaçla Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılmıştır. 2 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak asidoliz deneylerinin tasarımı yapılmıştır.

Literatür verilerine göre, yapılandırılmış yağların enzimatik yöntemle üretiminde substratın mol oranı, enzim miktarı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı en önemli değişkenler arasındadır. Optimizasyonun en verimli ve doğru şekilde uygulanabilmesi için değişkenlerin ve değişken etki aralıklarının seçimi son derece önemlidir. Bu seçim yapılırken reaksiyon sistemi dışında, ekonomiklik ve uygulanabilirlik faktörleri de göz önünde bulundurulmalıdır.

Literatürde yapılan çalışmalarda uzun reaksiyon sürelerinde ve yüksek enzim miktarlarında yüksek ürün verimi elde edildiği görülmüştür. Ancak ekonomiklik ve uygulanabilirlik açısından kısa reaksiyon süresi ve az miktarda enzimle çalışmak büyük avantaj sağlamaktadır ve bu yüzden tercih sebebi olmalıdır. Yüksek sıcaklık reaksiyon hızını arttırmakta, fakat sıcaklığın yükseltilmesi ile enzimlerin yapıları bozulabilmekte ve yarılanma süreleri kısalmaktadır. Bunun yanında yüksek substrat konsantrasyonları ile çalışıldığında ürünlerin denge verimlerinde artışlar sağlanabilir, fakat bu yüksek konsantrasyonlar enzimleri inhibe edebilir.

Enzimlerin aktivitelerini en iyi şekilde gösterebilmeleri için ortamdaki su miktarı da oldukça önemlidir. Enzimlerin üç boyutlu yapılarını korumaları açısından ortamda bir miktar suyun bulunması gerekmektedir [43,57,59,62].

Bu çalışmada sıcaklık ve substratların mol oranı değişken olarak seçilmiştir. Lipozyme TL IM enzimi yapısında % 2-3 su bulundurduğundan reaksiyon için gerekli su, enzim ile sağlanmaktadır. Bu yüzden ortamdaki suyun reaksiyona etkisi de incelemeye alınmamıştır.

3.2.7 Deneysel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu

Reaksiyon koşullarının optimizasyonu Tepki Yüzey Metodolojisine (TYM) göre yapılmıştır. Bu amaçla, 2 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak 11 asidoliz reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Deneysel sonuçların istatiksel analizleri Statistica 7.0 (Stat Soft® Ine.) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçların varyans analizleri ve tepki değerlerinin incelenen değişkenlere göre değişimlerini gösteren izdüşüm (Contour plot) ve tepki yüzey (Response surface) grafikleri değerlendirilerek reaksiyon koşulları optimize edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Literatür araştırması bölümünde de belirtildiği gibi, genel olarak KLNA'nın kanser hücreleri gelişimini azaltıcı etkisinin yanında, kandaki hepatik kolesterol seviyesini de düşürdüğü bilinmektedir.

Bu çalışmada, soya yağı bileşimine mahlep kaynaklı KLNA'yı katarak soya yağından sağlığa daha yararlı olabilecek, hızlı metabolize edilebilen, uzun zincirli konjuge linolenik asitçe zenginleştirilmiş triaçilgliserollerin, enzimatik üretimi ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında, ekstraksiyon işlemi ile mahlepten yağ çıkarılmış, soya yağı ve mahlep tohumlarının yağ asitleri bileşimleri saptanmıştır. Daha sonra Tepki Yüzey Metodolojisi'nde kullanılacak deney noktalarının tasarımı için değişkenler seçimi ve her değişken için seviye değerlerinin belirlenmesi amacıyla ön optimizasyon deneyleri yapılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, ön optimizasyon deneylerinde seçilen bağımsız değişkenler sıcaklık ve substrat mol oranları ile 3 seviye değeri (+1, 0, -1 değerleri) kullanılarak Tepki Yüzey Metodolojisine göre reaksiyon koşullarının optimizasyonu üzerinde deneyler yürütülmüştür. Elde edilen deneysel veriler Statistica 7.0 programı kullanılarak değerlendirilmiş, soya yağının mahlep kaynaklı konjuge linolenik asit ile asidoliz reaksiyonu optimize edilmiştir. Aşağıdaki bölümlerde bu çalışmalara ait sonuçlar verilmiştir.

4.1 Mahlep Yağının Ekstraksiyonu

Bölüm 3.2.1'de anlatılan Mahlep yağının eksraksiyon işleminden elde edilen yağ miktarları ve yağ içerikleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 : Mahlep tohum örneklerinin yağ içerikleri.

Tohum miktarı (g)	Yağ miktarı (g)	Yağ (ağırlıkça%)
Örnek-1: 35,0*	4,49	12,8
Örnek-2: 35,0**	5,01	14,3

* M1; % 35,4 KLNA içeren mahlep ** M2; % 40,4 KLNA içeren mahlep

4.2 Substratların Yağ Asitleri Bileşimleri

Mahlep ve soya yağına ait yağ asitleri bileşimleri Bölüm 3.2.1. de belirtilen koşullarda gaz kromatografi cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. Cihazdan elde edilen sonuçlara göre bileşim verileri Çizelge 4.2 ve 4.3'de sırasıyla gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 : Soya yağı yağ asitleri bileşimi.

Yağ asidi	Yağ asitleri bileşimi (%)
16:00	11,1
18:3+18:2	64,0
18:1	20,0
18:0	4,0
20:1	0,2
20:0	0,4
22:0	0,4
KLNA	**0**

Çizelge 4.2'den görüldüğü gibi, soya yağı yağ asitleri % 64,0 linoleik+linolenik asit, % 20,0 oleik asit, % 11,1 palmitik asit, % 4,0 stearik asit, ve az miktarlarda araşidik asit, gadoleik asit ve behenik asitlerden oluşmaktadır. Soya yağı içerisinde KLNA bulunmamaktadır.

Çizelge 4.3 : Mahlep yağ asitleri bileşimleri.

Yağ asidi	Yağ asitleri bileşimi (%)
16:0	3,5
18:2	29,1
18:1	23,9
18:0	1,6
18:3 (KLNA) α-eleostearik Punisik Katalpik β-eleostearik	**40,4** 36,4 1,1 0,8 2,1
20:1	1,1
20:0	0,3
22:0	0,1

M2 ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.3'den de görüldüğü gibi mahlep yağ asitleri % 40,4 toplam KLNA, % 36,4 α-eleostearik asit, % 29,1 linoleik asit, % 23,9 oleik asit, % 3,5 palmitik asit ve sırasıyla az miktarlarda β-eleostearik asit, stearik asit, punisik asit, gadoleik asit, katalpik asit, araşidik asit, behenik asit içermektedir.

4.3 Tepki Yüzey Metodolojisi'nde Kullanılacak Deney Noktalarının Belirlenmesi

Bu aşamada Tepki Yüzey Metadolojisi'nde kullanılacak deney noktalarının tasarımı için değişken seviye değerleri belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak asidoliz reaksiyonlarında substrat mol oranları ile reaksiyon süresinin reaksiyona olan etkisi incelenmiştir. Bu reaksiyonlarda enzim oranı substratların toplam ağırlığının % 10'u olarak alınmış ve Soya Yağı:Mahlep Yağ Asitleri (SY:MYA) mol oranları 1:3-1:7, reaksiyon süresi ise 1-5 saat aralığında değiştirilerek gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonlar 50 ºC sıcaklıkta, 220 rpm karıştırma hızında yürütülmüştür. Bu reaksiyonlardan elde edilen TAG ların yağ asitleri bileşimleri Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da görülmektedir.

Çizelge 4.4 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin SY:MYA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, % 10 enzim).

Yağ Asiti	Yağ Asitleri Bileşimi (%)						
	SY	SY:MYA, 1:3			SY:MYA, 1:4		
		1 saat	3 saat	5 saat	1 saat	3 saat	5 saat
16:00	11,1	8,4	8,0	8,1	7,5	7,5	7,9
18:3+18:2	64,0	42,3	44,3	47,7	45,4	45,8	45,9
18:01	20,0	32,8	29,3	26,1	25,9	25,2	24,9
18:00	4,0	3,3	3,1	3,3	2,9	2,9	2,9
18:3 (KLNA)	**-**	**13,2**	**14,5**	**13,9**	**17,1**	**17,5**	**17,3**
20:1	0,2	-	0,2	0,2	0,5	0,4	0,4
20:0	0,4	-	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
22:0	0,4	-	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

M1 ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.5 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin SY:MYA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, % 10 enzim).

Yağ Asiti	Yağ Asitleri Bileşimi (%)						
	SY	SY:MYA, 1:5*			SY:MYA, 1:5**		
		1 saat	3 saat	5 saat	1 saat	3 saat	5 saat
16:00	11,1	7,3	7,0	6,9	6,8	6,6	6,6
18:3+18:2	64,0	45,0	43,2	42,3	46,0	43,3	42,7
18:01	20,0	25,3	26,3	27,8	20,5	23,3	23,6
18:00	4,0	2,9	2,8	2,9	2,8	2,7	2,8
18:3 (KLNA)	**-**	**18,4**	**19,8**	**19,2**	**22,8**	**23,1**	**23,2**
20:1	0,2	0,5	0,4	0,3	0,6	0,5	0,6
20:0	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3
22:0	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

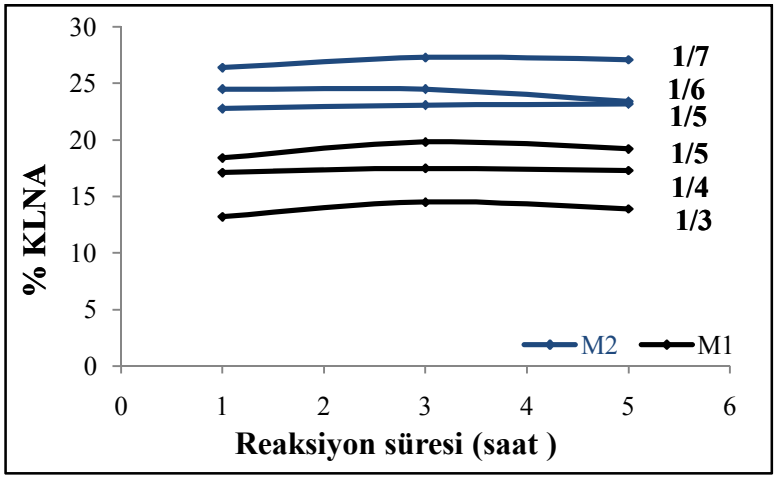
* M1 ile çalışılmıştır. ** M2 ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.6 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin SY:MYA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, % 10 enzim).

Yağ Asiti	Yağ Asitleri Bileşimi (%)						
	SY	SY:MYA, 1:6			SY:MYA, 1:7		
		1 saat	3 saat	5 saat	1 saat	3 saat	5 saat
16:00	11,1	6,4	6,4	6,4	5,9	5,9	5,9
18:3+18:2	64,0	41,9	43,2	41,2	40,2	41,7	42,5
18:01	20,0	23,7	22,0	25,2	23,9	21,4	20,9
18:00	4,0	2,7	2,7	2,7	2,4	2,5	2,4
18:3 (KLNA)	**-**	**24,5**	**24,5**	**23,4**	**26,4**	**27,3**	**27,1**
20:1	0,2	0,3	0,6	0,5	0,6	0,7	0,6
20:0	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4
22:0	0,4	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2

M2 ile çalışılmıştır.

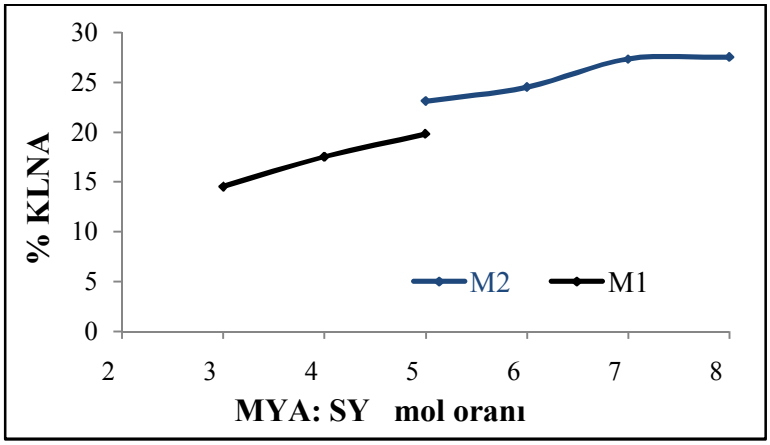
Her üç çizelgeden de görüldüğü gibi, asidoliz reaksiyonlarında zamanın çok fazla bir etkisi görülmemektedir. Buna karşılık mol oranları arttıkça KLNA katılım yüzdesi de artmaktadır. Bu değişimleri daha net bir şekilde görebilmek için Şekil 4.1 oluşturulmuştur.



Şekil 4.1 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin SY:MYA mol oranı ve reaksiyon süresi ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, enzim % 10).

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi mahlep yağ asitlerinin soya yağı ile asidolizinde KLNA yüzdesinde reaksiyon süresi artıkça belirgin bir artış söz konusu değildir. Reaksiyon

süresi 3 saat iken KLNA katılımında küçük bir artış görülmektedir ancak 5 saatlik reaksiyonlarda 3 saatliğe göre KLNA katılımında bazen değişim gözlenmezken bazen de bir düşüş görülmektedir. Bu nedenle bundan sonraki tüm reaksiyonlarda reaksiyon süresi 3 saat olarak seçilmiştir. KLNA katılımı reaksiyon süresi 3 saat iken 1:3 mol oranında % 14,5; 1:7 mol oranında % 27,3 değerindedir. Şekil 4.2'de 3 saatlik reaksiyonlarda mol oranının KLNA katılımına etkisi görülmektedir.



Şekil 4.2 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin MYA:SY mol oranı ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, enzim % 10, reaksiyon süresi 3 saat).

Şekil 4.2 oluşturulurken mol oranlarındaki değişimi daha belirgin olarak görebilmek amacıyla 1:8 mol oranında da çalışılmıştır. Mol oranı artıkça KLNA katılımında düzenli bir artış görülmekteyken, 1:7 SY:MYA mol oranından sonra KLNA katılım yüzdesi pratik olarak sabit bir değere ulaşmaktadır. 1:7 mol oranında KLNA katılımı % 27,3 ve 1:8 mol oranında % 27,5 değerindedir. Buna göre deneysel tasarımdaki -1, 0 ve +1 kodlarına karşılık gelen SY:MYA mol oranı seviye değerleri 1:3, 1:5, 1:7 olarak belirlenmiştir.

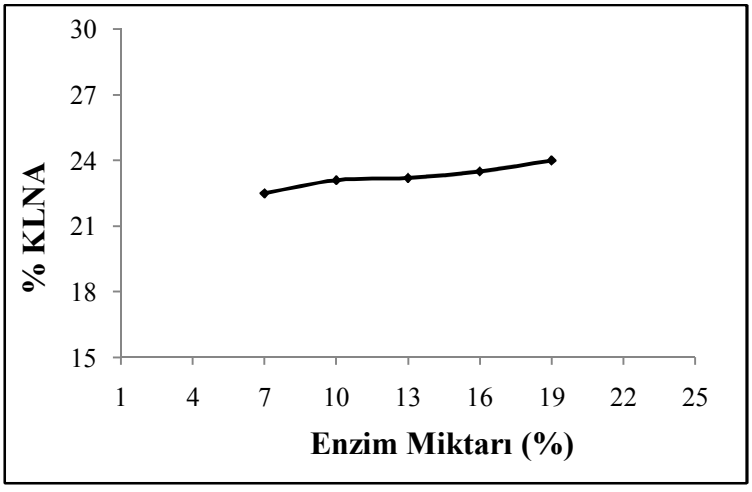
Mol oranı için belirlenen değişken seviyelerinin saptanmasından sonra enzim miktarındaki değişim incelenmiştir. Bu asidoliz reaksiyonlarında sıcaklık 50 ºC ,reaksiyon süresi 3 saat, mol oranı 1:5 olarak alınmış ve enzim miktarları % 7-19 arasında değiştirilmiştir. Asidoliz Ürünü TAG ların gaz kromotografisi ile belirlenen yağ asidi bileşimleri Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin enzim miktarı (E) ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, reaksiyon süresi 3 saat, SY:MYA mol oranı 1:5).

Yağ Asiti	Yağ Asitleri Bileşimi (%)					
	SY	% 7 E	% 10 E	% 13 E	% 16 E	% 19 E
16:00	11,1	7,2	6,6	6,8	6,6	6,7
18:3+18:2	64,0	40,3	43,3	48,9	46,2	42,2
18:01	20,0	22,2	23,3	17,6	19,9	23,8
18:00	4,0	7,1	2,7	2,7	2,8	2,6
18:3 (KLNA)	**-**	**22,5**	**23,1**	**23,2**	**23,5**	**24,0**
20:1	0,2	0,2	0,5	0,3	0,5	0,2
20:0	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
22:0	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

M2 ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.7'de görüldüğü üzere, asidoliz reaksiyonlarında enzim miktarındaki artışa bağlı olarak KLNA katılım yüzdesi belirgin bir şekilde değişmemektedir. Enzim miktarı ile % KLNA değişimi aynı zamanda Şekil 4.3'de de görülmektedir.



Şekil 4.3 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin enzim miktarı ile değişimi (sıcaklık 50 ºC, reaksiyon süresi 3 saat, SY:MYA mol oranı 1:5).

Şekil 4.3'de görüldüğü gibi enzim miktarı soya yağına mahlep kaynaklı KLNA katılımda büyük bir rol oynamamaktadır. Bu nedenle deney tasarımında kullanılacak enzim miktarı % 10 olarak seçilmiştir.

Enzim miktarının da etkisi incelendikten sonra sıcaklığın etkisine bakılmıştır. Bu reaksiyonlar % 10 enzim miktarı, 1:5 SY:MYA mol oranında 3 saatlik reaksiyon süresinde yürütülmüştür. Sıcaklıklar 35-60 ºC arasında değiştirilmiştir. Asidoliz reaksiyonlarından elde edilen ürün bileşimleri Çizelge 4.8'de verilmiştir.

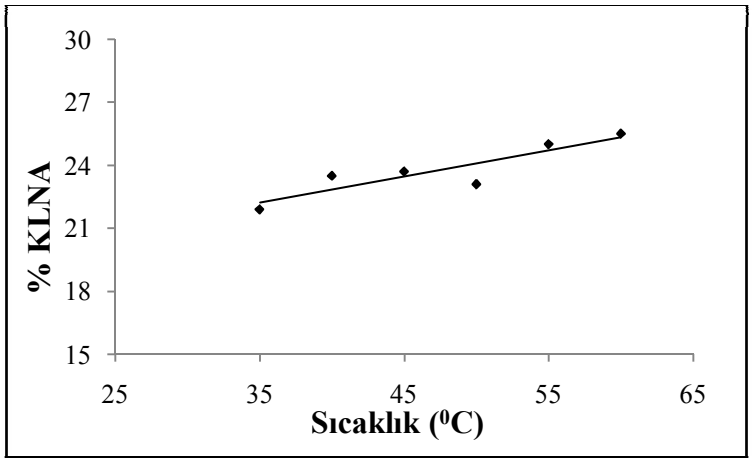
Çizelge 4.8 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin sıcaklık ile değişimi (enzim miktarı % 10, reaksiyon süresi 3 saat, SY:MYA mol oranı 1:5).

Yağ Asiti	Yağ Asitleri Bileşimi (%)						
	SY	35 ºC	40 ºC	45 ºC	50 ºC	55 ºC	60 ºC
16:00	11,1	6,8	6,8	6,7	6,6	6,5	6,5
18:3+18:2	64,0	40,3	41	46,0	43,3	41,8	38,8
18:01	20,0	27,6	25,2	20,2	23,3	22,9	26,2
18:00	4,0	2,7	2,8	2,7	2,7	3,2	2,4
18:3 (KLNA)	**-**	**21,9**	**23,5**	**23,7**	**23,1**	**25,0**	**25,5**
20:1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,2
20:0	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
22:0	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1

M2 ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi KLNA katılımı, sıcaklık artışı ile enzim miktarındaki artışa oranla daha fazla değişmektedir. KLNA katılımı 35 ºC'de % 21,9 iken 60 ºC'de % 25,5 değerine ulaşmaktadır. Bu da soya yağına mahlep kaynaklı KLNA asidoliz reaksiyonunda sıcaklığın enzime oranla daha önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.8'deki sonuçlar kullanılarak Şekil 4.4 oluşturulmuştur.

Şekil 4.4'de sıcaklığın etkisi daha net bir şekilde görülmektedir. Buna göre deneysel tasarımdaki -1, 0 ve +1 kodlarına karşılık gelen sıcaklık seviye değerleri 35 ºC, 45 ºC, 55 ºC olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, ürün triaçilgliserollerinin yağ asitleri bileşimlerinin sıcaklık ile değişimi (enzim miktarı % 10, reaksiyon süresi 3 saat, SY:MYA mol oranı 1:5).

4.4 Tepki Yüzey Metodolojisi'ne Göre Deneysel Tasarım ve Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Reaksiyon parametrelerinin (bağımsız değişkenlerin) soya yağı ile mahlep kaynaklı KLNA asidoliz reaksiyonuna etkileri Tepki Yüzey Metodolojisi (TYM) ile incelenmiştir. Bu çalışmada 2 değişkenli, 3 seviyeli ve 11 özel tasarım noktası içeren Merkezi Bileşik Yüzey Merkezli Küp Tasarımı esaslarına uygun çalışılmıştır. Optimizasyon için deneylerin tasarımında seçilen değişkenler ve onların belirlenen seviye değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 : Asidoliz ile soya yağından konjuge linolenik asit (KLNA) ile zenginleştirilmiş lipidlerin eldesinde, yüzey merkezli küp tasarımında kullanılan bağımsız değişkenler ve bu değişkenler için kodlanan seviye değerleri.

Bağımsız değişkenler	**Kodlanan değişken seviyeleri**		
	-1	0	+1
MYA:SY oranı (mol/mol)	3	5	7
Sıcaklık (°C)	35	45	55

Yüzey merkezli küp deney tasarımına göre belirlenen 2 değişkenli ve 3 seviyeli deney tasarımının noktaları, kodları ve değerleri Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.10 : Yüzey merkezli küp deney tasarımında belirlenen deney tasarım noktaları (reaksiyon süresi: 3 saat, enzim miktarı: %10).

Deney No	MYA:SY oranı (mol/mol)		Sıcaklık (ºC)	
	Kod	Değer	Kod	Değer
1	-1	3	-1	35
2	-1	3	+1	55
3	+1	7	-1	35
4	+1	7	+1	55
5	-1	3	0	45
6	+1	7	0	45
7	0	5	-1	35
8	0	5	+1	55
9	0	5	0	45
10	0	5	0	45
11	0	5	0	45

Çizelge 4.10'da belirlenen koşullarda yürütülen 11 asidoliz reaksiyonu sonunda elde edilen TAG ürünlerinin yağ asitleri Çizelge 4.11- 4.12'de gruplar halinde verilmiştir.

Çizelge 4.11 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri (reaksiyon süresi: 3 saat, enzim miktarı: % 10) (deney no : 1-6 sonuçları).

Yağ Asiti	Yağ Asitleri Bileşimi (%)						
	SY	SY:MYA, 1:3			SY:MYA, 1:7		
		35 ºC	45 ºC	55 ºC	35 ºC	45 ºC	55 ºC
16:00	11,1	7,8	7,5	7,8	5,9	5,9	5,8
18:3+18:2	64,0	47,9	44,9	42,9	41,9	41,7	36,9
18:01	20,0	22,9	25,8	25,8	22,8	21,4	25,4
18:00	4,0	3,1	3,1	2,7	2,7	2,5	2,1
18:3 (KLNA)	**-**	**17,3**	**18,0**	**20,4**	**26,1**	**27,3**	**29,4**
20:1	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2	0,2	0,7
20:0	0,4	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3
22:0	0,4	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2

M2 ile çalışılmıştır.

Çizelge 4.12 : Soya yağının mahlep yağ asitleri ile asidolizinde, TAG ürünlerinin yağ asitleri bileşimleri (reaksiyon süresi: 3 saat, enzim miktarı: % 10) (deney no : 7-11 sonuçları).

Yağ Asiti	Yağ Asitleri Bileşimi (%)					
	SY	SY:MYA, 1:5				
		35 ºC	45 ºC	45 ºC	45 ºC	55 ºC
16:00	11,1	6,3	6,5	6,5	6,5	5,9
18:3+18:2	64,0	36,4	38,9	40,7	38,8	37,9
18:01	20,0	29,0	25,8	24,8	25,6	25,5
18:00	4,0	2,3	2,5	2,4	2,5	2,3
18:3 (KLNA)	**-**	**25,7**	**25,8**	**25,1**	**26,1**	**28,0**
20:1	0,2	-	0,2	0,2	0,2	0,1
20:0	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
22:0	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

M2 ile çalışılmıştır.

Asidoliz ile soya yağından mahlep kaynaklı konjuge linolenik asitçe zenginleştirilmiş lipidlerdeki KLNA yüzdeleri tepki değeri olarak Çizelge 4.13'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13 : Yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak yürütülmüş asidoliz deneyleri sonucunda elde edilen ürünlerin tepki değerleri (% KLNA).

Deney No	**Değişken seviyeleri**		**Tepki değerleri**
	MYA:SY oranı (mol/mol), X_1	Sıcaklık (ºC), X_2	KLNA (%), Y
1	3	35	17,3
2	3	55	20,4
3	7	35	26,1
4	7	55	29,4
5	3	45	18,0
6	7	45	27,3
7	5	35	25,7
8	5	55	28,0
9	5	45	25,8
10	5	45	25,1
11	5	45	26,1

4.5 Farklı Reaksiyon Koşullarının Soya Yağı ile Mahlep Kaynaklı Konjuge Linolenik Asitin Asidoliz Reaksiyonuna Etkilerinin İstatiksel Açıdan Değerlendirilmesi

Çizelge 4.13'de verilen bağımsız değişken değerlerine karşılık olarak elde edilen tepki değerlerinin istatiksel analizlerinde Stasistica 7.0 (Stat Soft® Inc.) paket programı kullanılmıştır. Değerlendirmeye ''Varyans Analizi'' ile başlanmıştır.

2 değişken, 3 seviye yüzey merkezli deneysel tasarımda elde edilen tepkilerin değerlendirilmesinde aşağıda verilen 2. dereceden polinom eşitliği kullanılmıştır.

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

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

Bağımsız değişkenlerle bağımlı değişkelnler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerinin tahminleri ve katsayıları programdan elde edilmiştir. Bu değerler Çizelge 4.14'de ve varyans analiz sonuçları ise Çizelge 4.15'de belirtilmiştir.

Çizelge 4.14 : Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları.

	Etki	**Standart hata**	**t**	**p**	**Katsayı**
Ortalama/Intercept	25,77895	0,232792	110,7382	0,000000	**25,77895**
(1) MYA:SY Mol Oranı (L)	9,03333	0,370522	24,3800	0,000002	**4,51667**
MYA:SY Mol Oranı (Q)	-6,59474	0,570221	-11,5652	0,000085	**-3,29737**
(2) Sıcaklık (L)	2,90000	0,370522	7,8268	0,000546	**1,45000**
Sıcaklık (Q)	1,80526	0,570221	3,1659	0,024929	**0,90263**
(1)Mol Oranı*(2)Sıcaklık	0,10000	0,453795	0,2204	0,834303	**0,05000**

L: Lineer Q:Kuadratik

(4.1)'deki polinom eşitliğinden yararlanılarak (4.2) eşitliğindeki model denklemi oluşturulmuştur. Bu denklemde ''M'' MYA:SY mol oranını, ''T'' sıcaklığı ifade etmektedir.

$$\%\ \text{KLNA katılımı} = 25{,}778 + 4{,}516 * \mathrm{M} - 3{,}297 * \mathrm{M}^2 + 1{,}450 * \mathrm{T} + 0{,}05\mathrm{M} * \mathrm{T} \qquad (\mathbf{4.2})$$

Çizelge 4.15 : Varyans analizi sonuçları.

Faktör	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	f değeri	p değeri
(1)MYA:SY Mol Oranı (L)	122,4017	1	122,4017	594,3853	**0,000002**
MYA:SY Mol Oranı (Q)	27,5440	1	27,5440	133,7544	**0,000085**
(2) Sıcaklık (L)	12,6150	1	12,6150	61,2587	**0,000546**
Sıcaklık (Q)	2,0640	1	2,0640	10,0229	**0,024929**
(1)Mol Oranı *(2)Sıcaklık	0,0100	1	0,0100	0,0486	**0,834303**
Hata	1,0296	5	0,2059		
Kareler Toplamı	163,6018	10			

L: Lineer Q:Kuadratik

Varyans analizinin sonuçları incelendiğinde mol oranı*sıcaklık lineer etkileşimi haricinde diğer tüm terimler % 99 güven aralığında anlamlıdır. Bu durum oluşturulan model denklemin katsayılarının istatistikî olarak % 99 doğru olduğunu gösterir. Çizelgede gösterilen p değeri anlamlılık testi için gerekli bir değerdir. Bu değer Statistica 7.0 programı aracılığıyla Bölüm 2.6.2'de anlatılan $F_{çizelge}$ değerinin $F_{hesaplanan}$ değeri ile kıyaslanması ile bulunmuştur. Çizelge 4.15'de gösterilen p değerlerinin 0,01'den düşük olması katsayıların % 99 güven aralığında doğru (anlamlı) olduğunu gösterir.

Soya yağına katılan konjuge linolenik asit için oluşturulan model denklemin korelasyon katsayısı (R^2) 0,99 olarak bulunmuştur. Ayrıca deneysel değerler ve tahmin edilen değerler arasındaki kalanlar toplamı 0,2 olarak bulunmuştur. Bölüm

2.6.4 ve Bölüm 2.6.5'de anlatıldığı gibi korelasyon sayısının 1'e yakın olması ve kalanlar toplamının neredeyse 0 olması oluşturulan model denklemin uygunluğunu destekler.

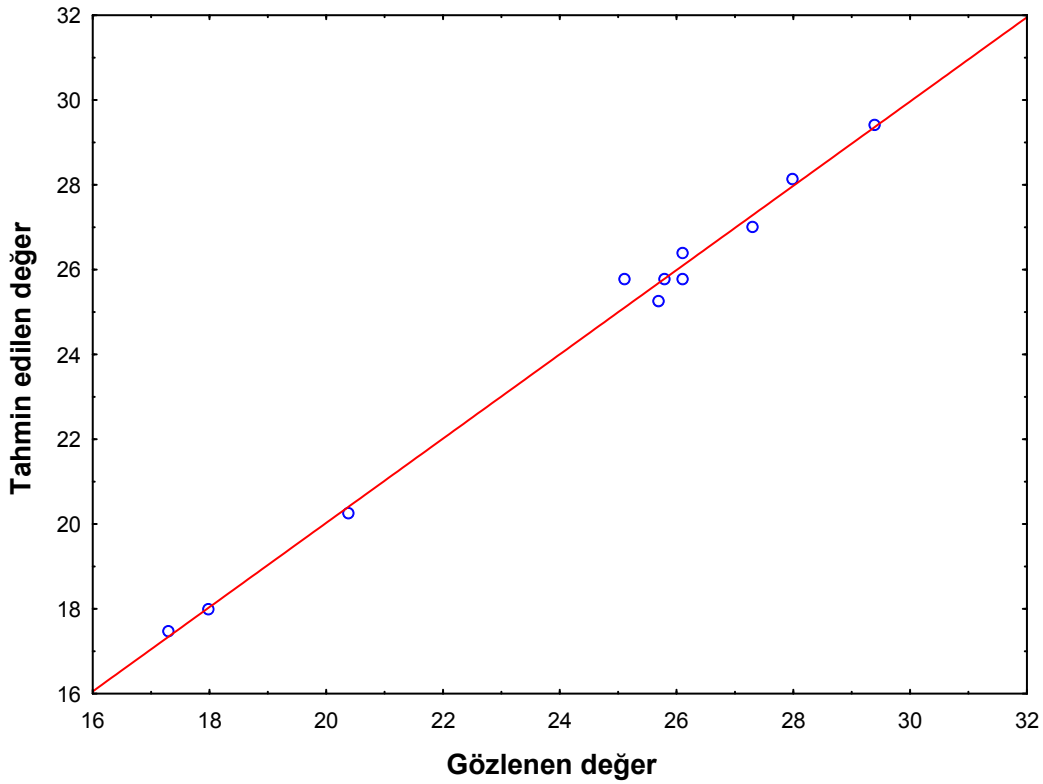
Oluşturulan Tepki-Yüzey modelinde, sıcaklık ve SY:MYA mol oranı olmak üzere 2 farklı bağımsız değişken için gözlenen minimum ve maksimum değerler ile kritik değerler Çizelge 4.16'de görülmektedir.

Çizelge 4.16 : Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri.

	Gözlenen minimum değer	**Kritik değer**	**Gözlenen maksimum değer**
MYA:SY (mol/mol)	3	6,4	7
Sıcaklık (ºC)	35	36,8	55

Tepki yüzey metodolojisine göre, elde edilen kritik tepki değeri % 26,7 olarak bulunmuştur.

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

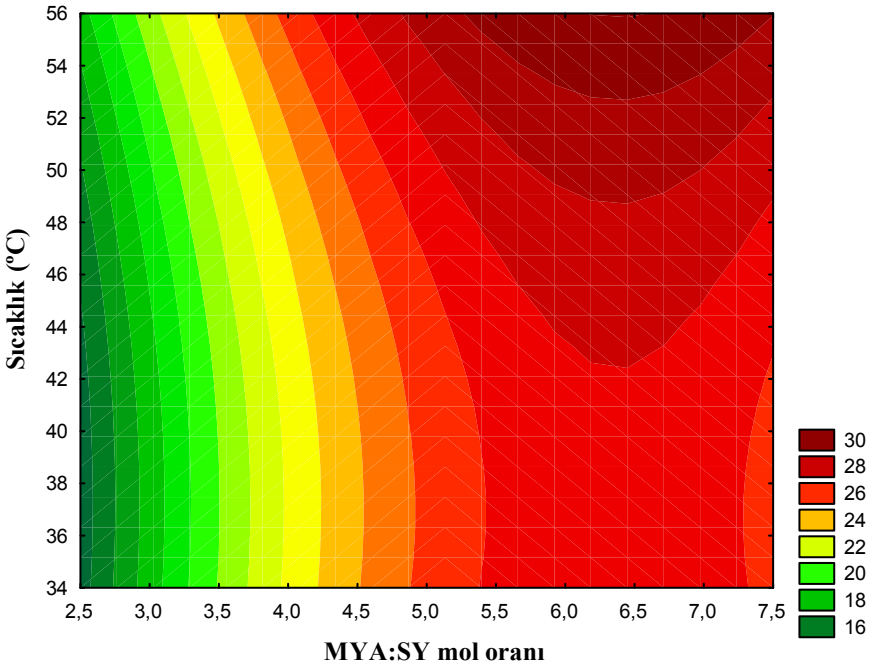


Şekil 4.5 : Gözlenen değerlere karşılık tahmin edilen değerler arasındaki ilişki.

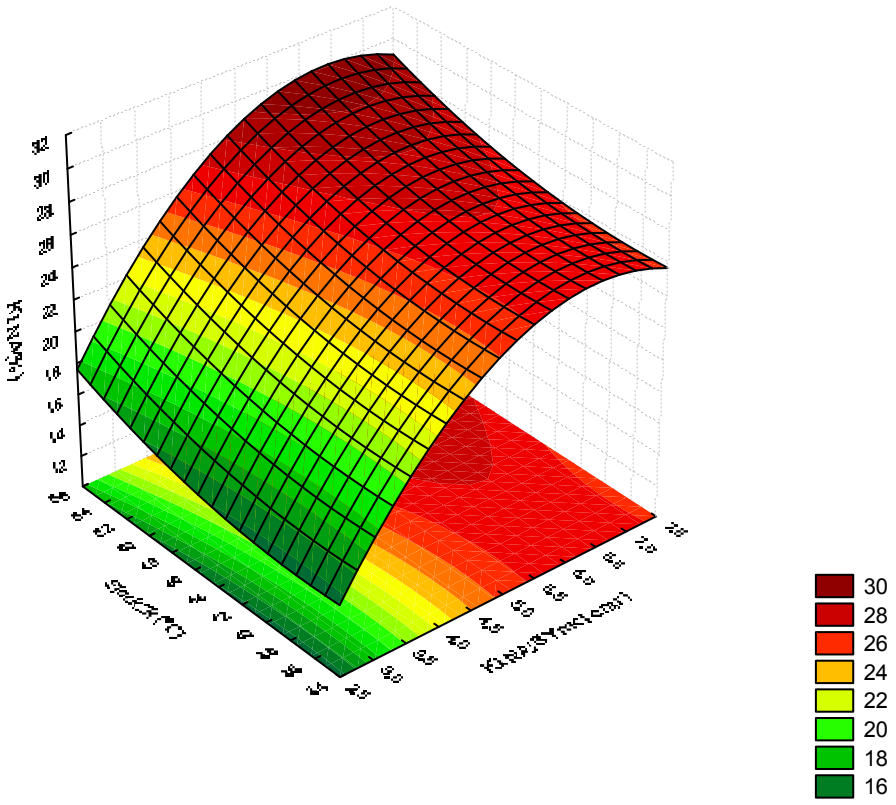
Faktörlerin model denklemde yerine konması ile elde edilen ürünün metil ester içeriği ile (tahmin edilen değer), deney sonucunda elde edilen veriler (gözlenen değerler) arasındaki ilişki büyük oranda lineerlik göstermektedir. Grafikten de görüldüğü gibi korelasyon sayısının 0,99 olması da bu durumu doğrulamaktadır. Bu durum oluşturulan modelin reaksiyon parametreleri arasındaki gerçek ilişkileri gösterdiğini doğrulamaktadır.

4.6 Tepki Yüzey ve İzdüşüm Grafiklerinin Yorumlanması

Soya yağına katılan KLNA yüzdelerinin sıcaklık ve mol oranı parametrelerine göre değişimi izdüşüm (Counter Plot) ve tepki yüzey (Response Surface) grafikleri ile incelenmiştir. İzdüşüm grafiklerinde denemeler neticesinde elde edilen tepki değerlerine ait eğriler bir düzlem üzerinde gösterilir. Bu düzleme ait koordinatlar ise bağımsız değişkenlerin seviyelerini göstermektedir. Her bir izdüşüm eğrisi, bağımsız değişkenlere ait seviyelerin bir bileşimi olarak ifade edilen bir düzlemle yüzey arasındaki yüksekliği temsil eden özel bir değere sahiptir [73]. Soya yağına katılan KLNA yüzdesinin sıcaklık ve mol oranına göre değişimini gösteren izdüşüm ve tepki yüzey grafikleri Şekil 4.6.a ve Şekil 4.6.b'de gösterilmektedir. Sıcaklık ve mol oranının % KLNA katılımı üzerine etkileşimleri sonucunda literatürde ''Sırt Noktası'' (Saddle Point Response) olarak tanımlanan izdüşüm grafiği elde edilmiştir [73]. Bu etkileşimler incelendiğinde mol oranı arttıkça sıcaklıktan bağımsız olarak yüzde katılımın arttığı görülmektedir. Ayrıca soya yağında KLNA içeriğinin en yüksek olacağı mol oranının 5-7,5; sıcaklığın da 45-55 ºC olduğu görülmektedir.



Şekil 4.6.a : Soya yağına mahlep kaynaklı % KLNA katılımının mol oranı ve sıcaklık ile değişiminin izdüşüm grafiği.



Şekil 4.6.b : Soya yağına mahlep kaynaklı % KLNA katılımının mol oranı ve sıcaklık ile değişiminin tepki yüzey grafiği.

5. GENEL SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yağlar insan ve hayvanların temel besinleri arasındadır. Günlük diyetle alınan yağ miktarı ve kompozisyonunun kalp hastalıkları ve kanser ile ilişkilendirildiği mevcut araştırma sonuçlarına dayanarak, diyetle daha az yağ tüketimiyle birlikte kullanılan yağın kalitesinin de iyileştirilmesi önem kazanmıştır. Bu nedenle yapılandırılmış yağlar zengin besin içerikleri ve sağlığa olumlu etkileri ile tüketiciye yeni alternatifler sunmaktadır.

Binlerce yıldır Asya ülkelerinin en değerli besin kaynağı olan soyanın, bir çok hastalığa karşı, insan beslenmesinde önemli bir yeri vardır. Gelişmiş ülkelerin tıp çevreleri kendi insanlarını, soyayı özellikle kalp ve kanser hastalıklarına karşı koruyucu olarak tüketmek üzere sürekli bilgilendirmektedir. Besin değeri, mineraller ve vitaminler açısından oldukça zengin bir bitki olan soyanın 400'den fazla endüstriyel ürün yapımında kullanılması ve bilimsel olarak kanıtlanmış yararları nedeniyle soya tarımsal ürünler arasında önemli bir yere gelmektedir.

Konjuge linolenik asit (KLNA), omega-6 olarak bilinen esansiyel yağ asitleri ailesinin bir üyesidir. Bu çalışmada kullanılan KLNA mahlep tohumlarından ekstraksiyon yöntemi ile çıkarılan yağdan elde edilmiştir. KLNA'nın sağlık ve biyolojik açıdan faydalı etkileri vardır.

Literatürde soya yağının yapılandırılmış yağ ile ilgili çalışmaları olduğu halde soya yağının KLNA ile zenginleştirilmesine yönelik çalışmalar bulunmamaktadır. Bu çalışmada soya yağı ile mahlep kaynaklı KLNA arasındaki enzimatik asidoliz reaksiyonları incelenmiş ve Tepki Yüzey Metodolojisine göre optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmada *Thermomyces lanuginosa* orijinli Lipozyme TL IM lipaz enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon süresi, sıcaklık, enzim miktarı, substrat mol oranının reaksiyon verimine etkileri araştırılarak reaksiyon süresinin KLNA katılımını etkilemediği görülmüştür. Bunun yanında enzim miktarındaki değişiklik de reaksiyon verimini büyük ölçüde etkilememektedir.

Optimizasyon çalışmasında reaksiyon koşulları 2 değişken (sıcaklık ve mol oranı) ve 3 seviyeli modele uygun olarak optimize edilerek istatiksel değerlendirme sonucunda optimum koşullar 36,8 ºC ve 1:6,4 SY:MYA mol oranı olarak belirlenmiştir. Tepki yüzey metodolojisine göre, elde edilen kritik tepki değeri %26,7 olarak bulunmuştur. Belirlenen optimum koşullarda çalışıldığında %26,8 KLNA içeren TAG ürünü elde edilmiştir. Böylelikle bu sonuçla oluşturulan model denklemin doğruluğu da deneysel olarak ispatlanmıştır.

İzdüşüm grafiklerinde düşük mol oranlarında sıcaklığın fazla bir etkisinin olmadığı, mol oranının arttıkça en fazla KLNA katılımının yüksek sıcaklıklarda gerçekleştiği saptanmıştır.

Bu çalışmada soya yağından sağlıklı gıda formülasyonlarında kullanılabilecek mahlep yağı kaynaklı KLNA ile enzimatik asidoliz sonucu modifiye lipidlerin üretimi ilk kez gerçekleştirilmiştir. Dünya sağlık örgütü tarafından lipidlere katılması gereken KLNA miktarı henüz belirlenmemiştir. Bu açıdan örgütün tavsiye edeceği KLNA miktarına göre yapılandırılmış lipidlere katılması gereken KLNA miktarı daha düşük de olabilir. Çıkacak yönetmeliğe göre ilerki çalışmalarda istenilen KLNA miktarı ayarlanması üzerine çalışmalar yürütülebilir.

KAYNAKLAR

[1] **Liu, K.S.,** 1999. Soybeans : Chemistry, Technology and Utilization, pp. 4-6, Aspen Publications, Gaithersburg, Maryland.

[2] **Liu, K.S.,** 2004. Soybeans as Functional Foods and Ingredients, pp.1-51, AOCS Press, Champaign, IL.

[3] **Demirkol, S.,** 2005. Soya yağının enzimatik alkolizi ile yağ asidi metil esterleri üretiminin optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.

[4] **Anaç, H. and Ertürk, Y.E.,** 2003. Soya fasulyesi*, T.E.A.E.-Bakış*, **2**, 1-4.

[5] **Url-1** <*http://www.petrol-is.org.tr*>, alındığı tarih 29.03.2009.

[6] **Öner, T.,** 2006. Soya sektör raporu, İstanbul Ticaret Odası, İstatistik Şubesi, pp. 4-12.

[7]**Url-2** <*http://usda.mannlib.cornell.edu/fas/oilseed-trade/2000s/oilseed-trade*>, alındığı tarih 03.12.2009.

[8] **Nazlıcan, A.N.,** 1998. Çukurova'nın üreyen altını soya ilgisizlik kurbanı, *Cine-Tarım Dergisi,* **10,** 1-4.

[9] **Öz M. and Karasu, A.,** 2007. Farklı gelişme dönemlerinde hasat edilen soya tohumlarına ait bazı özelliklerin incelenmesi, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **21,** 81-91.

[10] **Eripek, S.,** 2001. *Tarla Bitkileri*, Anadolu Üniversitesi, pp. 218-222.

[11] **Tayyar, Ş. and Gül, M.K.,** 2007. Bazı soya fasulyesi (*Glycine max* (L.)) Merr. genotiplerinin ana ürün olarak Biga şartlarındaki performansları, *Tarım Bilimleri Dergisi,* **17,** 55-59.

[12] **Aydın, C., Öğüt H. and Konak M.,** 2002. Some physical properties of Turkish mahaleb, *Biosystems Engineering*, **82,** 231–234.

[13] **Url-3 <***http://www.uni-graz.at/~katzer/engl/Prun_mah.html*>*,* alındığı tarih 24.03.2009.

[14] **Url-4 <***http://www.demirci-bld.gov.tr*>, alındığı tarih 24.03.2009.

[15] **Kalyoncu İ. H., Ersoy, N. And Aydın, M.,** 2008. Mahlep (*Prunus mahaleb* L.) yeşil uç çeliklerinin köklenmesi üzerine farklı hormon ve nispi nem uygulamalarının etkisi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,* **3,** 32-41.

[16] **Url-5 <***http://members.lycos.co.uk/kozlu/mahlep.htm*>, alındığı tarih 15.04.2009.

[17] **Url-6 <***http://www.sifalibitkiler.us/bitkiler/mahlep*>, alındığı tarih 13.04.2009.

[18] **Aksu, T.,** 1987. Mahlep yağının incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü.

[19] **Gerçekçioğlu, R. and Çekiç, Ç.,** 1999. Mahlep *(Prunus mahaleb L.)* tohumlarının çimlenmesi üzerine bazı uygulamaların etkileri, *Journal of Agriculture and Forestry,* **1,** 145-150.

[20] **Ercisli, S. and Orhan, E.,** 2008. Fatty acid composition of seeds of yellow, red, and black colored *Prunus mahaleb* fruits in Turkey, *Chemistry of Natural Compounds,* **44,** 87-89.

[21] **Akev, N., Can, A. and Sütlüpınar, N.,** 1991. Effect of Prunus Mahaleb Seeds on Blood Glucose Level, *IX. B_HAT. Bildiriler,* Ed: Baser KHC, Anadolu Üniversitesi Yayınları, No: 641, 16-19 Mayıs, Eskişehir, pp. 33-39.

[22] **Mastelic, J., Jerkovic, I. and Mesic, M.,** 2006. Volatile constituents from flowers, leaves, bark and wood of *Prunus mahaleb* L., *Flavour and Fragrance Journal*, **21,** 306-313.

[23] **Özgül-Yücel, S.,** 2005. Determination of conjugated linolenic acid content of selected oil seeds grown in Turkey, *Journal of the American Oil Chemists Society*, **82,** 893-897.

[24] **Destaillats, F.,Trottier, J. P, Galvez, J. M. G. and Angers, P.,** 2005. Analysis of α-linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids, *Journal of Dairy Science*, **88,** 3231–3239.

[25] **Url-7 <***www.thepaleodiet.com/nutritional_tools/fats.shtml*>, alındığı tarih 13.03.2009.

[26] **Url-8 <***http://www.cyberlipid.org/fa/acid0003.htm#1c*>, alındığı tarih 14.03.2009.

[27] **Iqbal, S., Halem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M. and Akbar, J.,** 2007. Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions, *Food Research International*, 194-200.

[28] **Arao, K., Wang, Y., Inoue, N., Hirata, J., Cha, J., Nagao, K. and Yanagita, T.,** 2004. Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese hyperlipidemic OLETF rats, *Lipids in Health and Disease*, **3.**

[29] **Yamasaki, M., Kitagawa, T., Koyanagi, N., Chujo, H., Maeda, H., Kohno-Murase, J., Imamura, J., Tachibana, H. and Yamada, K.,** 2006. Dietary effect of pomegranate seed oil on immune function and lipid metabolism in mice, *Nutrition*, **22,** 54-59.

[30] **Suzuki, R., R. Nogushi, T. Ota, A. Masayuki, K. Miyashita, and T. Kawada,** 2001. Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and monocytic leukemia cells, *Lipids*, **36,** 477–482.

[31] **Igarashi, M., and T. Miyazawa,** 2005. Preparation and fractionation of conjugated trienes from α-linolenic acid and their growth inhibitory effects on human tumor cells and fibroblasts, *Lipids,* **40,** 109–113.

[32] **Kohno, H.,Suzuki, R., Yasui, Y., Hosokawa, ,M., Miyashita, K. and Tanaka, T.,** 2004. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats, *Cancer Science*, **95,** 481–486.

[33] **Kohno, H., Yasui, Y., Suzuki, R., Hosokawa, M., Miyashita, K. and Tanaka, T.,** 2004. Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-ınduced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPARgamma expression and alteration of lipid composition, *International Journal of Cancer,* **20,** 896–901.

[34] **Dhar, P., S. Ghosh, and D.K. Bhattacharyya,** 1999. Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9*cis*, 11*trans*, 13*trans*) levels on blood lipids and nonenzymatic *in vitro* lipid peroxidation in rats, *Lipids ,* **34,** 109–114.

[35] **Dhar, P., Chattopadhyay, K., Bhattacharyya, D., Roychoudhurry, A., Biswas, A. and Ghosh, S.,** 2007. Antioxidative effect of conjugated linolenic acid in diabetic and non-diabetic blood: an *in vitro* study, *Journal of Oleo Science*, **56,** 19-24.

[36] **Tsuzuki, T., Tokuyama, Y., Igarashi, M. and Miyazawa, T.,** 2004. Tumor growth suppression by alphaeleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation, *Carcinogenesis,* **25,** 1417–1425.

[37] **Koba, K., Akahoshi, A., Yamasaki, M., Tanaka, K., Yamada, K., Iwata, T., Kamegai, T., Tsutsumi, K. and Sugano, M.,** 2002. Dietary conjugated linolenic acid in relation to cla differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats, *Lipids,* **37,** 330–343.

[38] **Yasui, Y., Hosokawa, M., Kohno, H., Tanaka, T. and Miyashita, K.,** 2006. Growth ınhibition and apoptosis ınduction by all-trans-conjugated linolenic acids on human colon cancer cells, *Anticancer research*, **26,** 1855–60.

[39] **Nas, S., Gökalp H.Y. and Ünsal, M.,** 2001. Bitkisel Yağ Teknolojisi, pp. 10-180, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Kitapları Yayınları.

[40] **Kayahan, M.,** 2002. Yağ tüketimi ve sağlık, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **12,** 39-47.

[41] **Yemişçioğlu, F. and Gümüşkesen, A. S.,** 2006. Enzimatik interesterifikasyon işleminin yağın bazı özellikleri üzerine etkisi, *Dünya Gıda Dergisi*, **8,** 62-65.

[42] **Iwasaki, Y. and Yamane, T.,** 2000. Enzymatic synthesis of structured lipids, *Journal of Molecular Catalsis B: Enzymatic*, **10,** 129-140.

[43] **Willis, W. M. and Marangoni, A. G.,** 2002. Enzymatic Interesterification, in *Food Lipids: Chemsitry, Nutrition and Biology*, pp.839-875, Ed. Akoh, C. C. and Min, D. B., Marcel Dekker Inc., Newyork.

[44] **Akoh, C.C.,** 2002. *Structured Lipids, in Food Lipids: Chemsitry, Nutrition and Biology*, pp.877-907, Ed. Akoh, C. C. and Min, D. B., Marcel Dekker Inc., Newyork.

[45] **Bell, S.J. and Bistrian, B.R.,** 1998. Structured Triglycerids and Their Medical Applications, in *Structured Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, pp.189-194, Ed. Christope, A. B., AOCS Press, America.

[46] **Mu, H. and Porsgaard, T.,** 2005. The metabolism of structured triacylglycerols, *Progress in Lipid Research*, **44,** 430-448.

[47] **Lee, K.T. and Akoh, C.C.,** 1998. Structured lipids: synthesis and application, *Food Research International*, **14,** 17-34.

[48] **Gültekin, M. and Karaali, A.,** 2006. Yemeklik yağ sanayinde yenilikler, *Gıda Teknoloji Dergisi*, **10,** 46-48.

[49] **Fu, X. and Parkin, K. L.,** 2004. Selectivity of fatty acids incorporation into acylglycerols in esterification reactions using *Rhizomucor miehei* and *Burkholderia cepacia* lipases, *Food Research International*, **37,** 651-657.

[50] **Xu, X.,** 2000. Production of spesific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review, *Europen Journal of Lipid Science Technology*, **12,** 287-303.

[51] **Gunstone, F.D.,** 2001. Structured and Modified Lipids, pp. 217-229, Marcel Dekker Inc., Newyork.

[52] **Demirci, F.,** 2005. Trioleinin enzimatik asidolizi ile düşük kalorili yapılandırılmış lipidlerin üretimi, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[53] **Bakır, N.,** 2005. Fındık yağının enzimatik olarak konjuge linoleik asit ile zenginleştirilmesi ve fonksiyonel (yapılandırılmış) yağ eldesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[54] **Esen, A.,** 2003. Fındık yağı-metanol enzimatik alkoliz reaksiyonunun incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[55] **Senanayake, S.P.J. and Shahidi, F.,** 2002. Lipase-catalyzed incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into borage oil: optimization using response surface methodology, *Food Chemistry*, **77,** 115-123.

[56] **Yamane, T., 2000.** Lipase-catalyzed syntehesis of structured triacyglycrols containing polyunsaturated fatty acids: monitoring the reaction and ıncreasing the yield, in *Enzymes in Lipid Modification*, pp. 148-169, Ed. Bornscheuer, Wiley&Sons, Newyork.

[57] **Camp, J.V., Huyghebaert, A. and Goeman, P.,** 1998. Enzymatic synthesis of structured modified fats, in *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, pp. 20-42, Ed. Christope, A. B., AOCS Press, America.

[58] **Öztürk, B.,** 2002. Lipaz enzimi: yapısal özellikleri ve uygulama alanları, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **12,** 20-38.

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

[60] **Lai, O.M., Low, C.T. and Akoh, C.C.,** 2005. Lipase-catalyzed acidolysis of palm olein and caprylic acid in a continuous bench-scale packed bed bioreactor, *Food Chemistry*, **92,** 527-533.

[61] **Gandhi, N. N. and Mukherjee, K. D.,** 2001. Synthesis of designer lipids using papaya (Carica papaya) latex lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **11,** 271-277.

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

[63] **Greyt, W. D. and Huyghebaert, A.,** 1998. Chemical and pyhsicochmeical modification of lipids, in *Structural Modified Foods Fats: Synthesis, Biochemistry and Use*, pp. 1-77, Ed. Christope, A. B., AOCS Press, America.

[64] **Gümüşkesen A. S. And Yemişçioğlu, F.,** 2000. Katı ve sıvı yağların enzimatik interesterifikasyonu, *Gıda Mühendisliği Dergisi*, **6,** 7-10.

[65] **Özdoğan, B., Bilaloğlu, B. and Başhöyük, D**., 2008. Soya yağından nar konjuge linolenik asit (KLNA) ile modifiye lipid üretimi, *Bitirme Ödevi*, İTÜ, Kimya Metalurji Fakültesi.

[66] **Öztürk, İ. and Ergün, G.,** 2007. The production of modified lipid with conjugated trienoic fatty acids, *Bitirme Ödevi*, İTÜ, Kimya Metalurji Fakültesi.

[67] **Demiröz, E.,** 2007. Kanola yağı esaslı yapılandırılmış yağ üretimi, *Bitirme Ödevi*, İTÜ, Kimya Metalurji Fakültesi.

[68] **Kızılkurt, K.,** 2007. Kanola yağından konjuge linoleik asit (KLA) ile yapılandırılmış yağ üretimi, *Bitirme Ödevi*, İTÜ, Kimya Metalurji Fakültesi.

[69] **Şeleci, D.,** 2007. zeytinyağından konjuge linoleik asit ile yapılandırılmış yağ üretimi ve optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü.

[70] **Baykar, P.,** 2006. Çörek otu yağından konjuge linoleik asit (KLA) ile modifiye lipid üretimi, *Bitirme Ödevi*, İTÜ, Kimya Metalurji Fakültesi.

[71] **Ortega, J., Lopez-Hernandez, A., Garcia, H.S. and Hill, C.G.,** 2004. Lipase-mediated acidolysis of fully hydrogenated soybean oil with conjugated linoleic acid, *Journal of Food Science*, **69,** 1-6.

[72] **Ryan, T.P.,** 2007. Modern Experimental Design, pp. 360-375, John Wiley & Sons; Inc.,Newyork.

[73] **Myers, R.H. and Montgomery, D.C.,** 2002. Response Surface Methodology Process and Product Optimization Using Designed Experiments, pp. 235-377, John Wiley & Sons; Inc.,Newyork.

[74] **Khuri, A.,** 2006. Response Surface Methodology and Related Topics, pp. 19-46,World Scientific Publishing.

[75] **Cornell, J.A., Khuri, A.,** 1996. Response Surfaces: Designs and Analyses, pp. 30-203, CRC Press, Marcel Dekker Inc., Newyork.

[76] **Collins, C.A. and Seeney, F.M.,** 1999. Statistical Experiment Design and Interpretation: an Introduction with Agriculture Examples, Wiley, Chichester.

[77] **Url-9** <*http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/pri/section3/pri3361.htm*>, alındığı tarih 05.04.2009.

[78] **Url-10** <*http://www.doe.soton.ac.uk/elearning/section2.18.jsp*>, alındığı tarih 10.04.2009.

[79] **Vuchkov, I. N. and Boyadjieva, L. N.,** 2001. Quality Improvement with Design of Experiments: a Response Surface Approach, pp. 14-76, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Hüma Özlem Elden

Doğum Yeri ve Tarihi: Istanbul, 1983

Adres: Acıbadem, Istanbul

Lisans Üniversite: Kocaeli Üniversitesi