

Gamma-linolenik asit ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların üretimi

Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK*, Artemis KARAALI

İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Programı, 34469, Ayazağa, İstanbul

Özet

Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların (YY) bitkisel kaynaklı yağlardan spesifik lipaz enzimlerinin katalizlediği interesterifikasyon (asidoliz) tepkimeleri ile üretilmeleri mümkün olmaktadır. Bu çalışmada gamma-linolenik asit (GLA) ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY'ların tripalmitin, fındık yağı serbest yağ asitleri (SYA) ve hodan (boraj) yağından elde edilen GLA konsantrisi arasında gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimeleri ile üretilmesi ve tepki-yüzey yöntemi (TYY) ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır. Enzimatik asidoliz tepkimelerinde *Rhizomucor miehei*'den elde edilen ve bir sn-1,3 spesifik lipaz enzimi olan Lipozyme® RM IM kullanılmıştır. Tepki-yüzey yönteminde seçilmiş farklı faktörlerin etkilerinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla, 5 seviyeli Merkezil Bileşik Deney Tasarımı (CCD) kullanılmış ve "substrat mol oranı (Toplam yağ asitleri/Triaçilgliserol, Sr)", "reaksiyon sıcaklığı (T, °C)" ve "reaksiyon süresi (t, saat)" değişken faktörler olarak seçilmiştir. Reaksiyonlar sonucunda seçilen tepkiler [oleik asit miktarı (%) ve GLA miktarı (%)] için, "çoklu regresyon" ve "geriye dönük eleme" yöntemleri uygulanarak başarılı kuadratik modeller elde edilmiştir. Hedeflenen özellikte ürün (%10 oranında GLA, %45 oranında oleik asit içeren) elde etmek için gerekli optimum koşullar [Sr: 14.8 mol/mol, T: 55°C ve t: 24 saat] olarak bulunmuştur. Bu koşullarda modelin doğruluğu deneysel olarak da kontrol edilmiş ve çalışma sonucunda bebek beslenmesi ve sağlığı açısından önemli etkileri olan GLA ile zenginleştirilmiş ve anne sütü yağı ile benzer absorpsiyon özelliklerine ve yağ asidi kompozisyonuna sahip bir YY'nin üretimi mümkün olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Yapılandırılmış yağ, anne sütü yağı, gamma-linolenik asit, enzimatik asidoliz, tepki yüzey yöntemi.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Neşe ŞAHİN YEŞİLÇUBUK. sahinnes@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 60 43.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Programında tamamlanmış olan "Anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ üretimi" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 05.03.2007 tarihinde dergiye ulaşmış, 12.06.2007 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 01.03.2009 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Lipase-catalyzed production of Human Milk Fat Substitutes (HMFS) containing gamma-linolenic acid

Extended abstract

Breast milk is the main and most preferred source of nutrients for infants and human milk fat (HMF) is its component which supplies the highest fraction of the infant's required dietary energy. Human milks are characterized by the dominance of triacylglycerols (TAG) (more than 98% of HMF) where the saturated 16-carbon palmitic acid (C16:0) (20-30%) is in the sn-2 position (60-70%) of the glycerol backbone, the sn-1 and sn-3 positions are being taken by unsaturated fatty acids (FA). This unique structure is different from most vegetable oils and animal fats. Previous reports provided convincing information that the higher fatty acid (FA) and calcium absorption and efficient use of dietary energy was the result of this specific position of these fatty acids in triacylglycerol (TAG) moiety.

Structured lipids (SL) resembling TAGs of human milk fat can be produced by interesterification from vegetable oils, using sn-1,3 specific lipases as biocatalyst and such TAG can be used in infant food formulations.

There has also been a great interest for the supplementation of infant formulas with FA such as gamma-linolenic acid (GLA). In infant formulae, GLA-containing oil, especially borage oil is used for its health benefits and for its antagonist action on arachidonic acid (AA) metabolism. Since GLA is rapidly elongated to di-homo gamma-linolenic acid (DGLA) and subsequently $\Delta 5$ -desaturated to AA and is also cheaper and easier to produce than AA, an alternative way for supplementation of infant formulas with AA is to use GLA instead of highly active AA. Human milk fat substitutes (HMFS) containing GLA can be produced by enzymatic interesterification reactions. These formulae are also helpful where $\Delta 6$ -desaturase enzyme is insufficient.

The purpose of the present work was to synthesize SLs resembling HMF enriched with GLA by enzymatic acidolysis reactions between tripalmitin, hazelnut oil FA and GLA in n-hexane. Commercially immobilized 1,3 specific lipase, Lipozyme[®] RM IM,

obtained from *Rhizomucor miehei*, was used as the biocatalyst for the acidolysis reactions. Moreover it was aimed to model and optimize the reaction conditions via response surface methodology (RSM). For this purpose central composite design (CCD) with five levels and three factors; substrate molar ratio (Total FA/TAG, S_r), "reaction temperature (T, °C)" and "reaction time (t, hour)" were used. The reactions were optimized considering target GLA and oleic acid incorporation.

Good quadratic models were obtained for the incorporation of GLA (response 1) and oleic acid (response 2) by "multiple regression" and "backward elimination". The determination coefficient (R^2) values for the models were found to be 0.92 and 0.94. Based on the experimental results, the regression coefficients (β) and significance (P) values were calculated. Among first order parameters substrate molar ratio had negative effect on the oleic acid incorporation. Time was the most significant first order parameter followed by temperature and substrate molar ratio for GLA incorporation. For both responses, second order parameters, temperature*temperature and time*time had negative effects and were found to be significant. The predicted values obtained from the models had a linear relationship with the observed values which indicates that the generated models adequately represent the relationship between the response and reaction parameters.

The optimal conditions generated from the models for the targeted GLA (10%) and oleic acid (45%) incorporation were: 14.8 mol/mol, 55°C and 24 h for substrate molar ratio, reaction temperature and reaction time, respectively. Models were verified using the optimal conditions obtained with RSM. The SL resembling HMFS contained palmitic acid at 73.9 %, which is also close to that of HMF. In this study, a HMFS product containing GLA was successfully produced having both the associated health benefits of GLA and similar fatty acid composition as well as similar absorption characteristics with human milk fat. This SL may be an important ingredient for commercial use in infant formula and contribute to the infant's nutrition and development.

Keywords: Structured lipids, human milk fat, gamma-linolenic acid, enzymatic acidolysis, response surface methodology.

Giriş

Yapılandırılmış yağlar (YY), gliserol molekülünün yağ asitlerinin doğal pozisyonu değiştirilmiş veya uzun zincirli çoklu doymamış (ÇDYA) veya orta zincirli yağ asitleri spesifik olarak yerleştirilmek suretiyle yağ asidi profili değiştirilmiş triaçilgliserol'ler (TAG) veya yeni TAG eldesi için sentezlenen TAG'ler olarak tanımlanmaktadır (Akoh, 2002; Akoh vd., 2002).

Lipaz enzimlerinin katalizörlüğünde gerçekleşen enzimatik interesterifikasyon modifikasyonları ile, kakao yağı ikameleri, anne sütü yağına benzer yapılandırılmış TAG'ler, kısmi açilgliseroller, zenginleştirilmiş yağlar, kalorisi azaltılmış yağlar, ve çeşitli lipit ürünlerinin üretimi mümkün olabilmektedir (Şahin vd., 2003).

Yeni doğan bebekler için anne sütü, hücreleri için gerekli olan yapısal komponentleri ve enerjiyi sağlayan tek doğal besin kaynağıdır. Bu nedenle, bebek beslenmesi ve gelişimi açısından anne sütünün son derece önemli olduğu bilinmektedir. Anne sütü yaklaşık olarak %3-5 oranında yağ içermektedir. Anne sütünün en önemli bileşeni olan yağın gliserol molekülündeki özgün yağ asidi dizilimi bitkisel ve hayvansal yağlardan oldukça farklıdır. Anne sütü bileşimi beslenme, laktasyon (emzirme) devresi, ırk, genetik özellikler ve mevsim gibi birçok faktöre bağlı olarak değişim gösterse de genel olarak oleik (%30-35), palmitik (%20-30), ve linoleik asitçe (%7-14) zengin TAG karışımıdır (Jensen, 2001). Anne sütünde bulunan TAG'ler, anne sütünün toplam yağ asitlerinin %20-25'ini oluşturan palmitik asidi (C16:0) %60-70 oranında gliserol molekülünün sn-2 pozisyonunda, uzun zincirli doymuş veya doymamış yağ asitlerini ise sn-1,3 pozisyonlarında bulundurmaktadırlar. Bu özgün yapı sadece anne sütü yağında görülmektedir. Yağların bağırsaklarda sindirimi sırasında 1,3 spesifik enzim olan pankreas enzimi rol almaktadır. Sindirim esnasında bu lipaz enzimi beslenme yoluyla alınan TAG moleküllerinin 1. ve 3. pozisyonlarında yer alan yağ asitlerini hidroliz etmekte ve bu hidroliz sonucunda 2-monoaçilgliseroller (2-MAG) ve TAG'ün 1. ve 3. pozisyonundan ayrılan yağ asitleri karışımı oluşmaktadır. Açığa çıkan yağ asitlerinin büyük

bir kısmı sütte bulunan kalsiyum iyonları ile sabun oluşturarak atılmaktadır. Bu durum bebeklerde hem enerji kaybına hem de iskelet sisteminin gelişimi için gerekli olan kalsiyum gibi minerallerin kaybına neden olmaktadır. Oysa, anne sütünde sn-2 pozisyonunda yer alan palmitik asit sindirim sırasında korunmakta ve 2-MAG olarak absorplanmakta olduğu için, anne sütü ile beslenen bebeklerde kalsiyum sabunu oluşumu hemen hiç gözlenmemektedir (Innis vd., 1995; Innis vd., 1998; López-López vd., 2001; Akoh ve Xu, 2002). Geleneksel ticari bebek mamalarında kullanılan bitkisel kaynaklı yağlarda, palmitik asidin %80'inden fazlası TAG'lerin 1. ve 3. pozisyonunda yer almakta ve bebeğin mamayı sindirimi sırasında, palmitik asit ve stearik asit gibi serbest yağ asitleri ile çözünmeyen kalsiyum sabunları oluşturmaktadır (Innis vd., 1995; Innis vd., 1998; Xu, 2000). Oysa, anne sütü ile beslenemeyen bebeklerin mamalarında kullanılan yağların yapısında, anne sütü yağına benzer şekilde, 2. pozisyonunda palmitik asit yüzdesi yüksek TAG'ler bulunması durumunda kalsiyum absorpsiyonu artmaktadır (Carnielli vd., 1996). Palmitik asidi yüksek miktarlarda içeren ve TAG molekülündeki pozisyonu spesifik olarak belirtilmeyen formüllerle beslenen yeni doğmuş bebeklerde kalsiyum absorpsiyonu alınan miktarın sadece %6'sı kadar gerçekleşirken, anne sütüyle beslenen bebeklerde bu oran %51'e yükselmiştir. Bu nedenle anne sütü yağının özgün YA dizilimi bebek beslenmesi ve gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır (López-López vd., 2001).

Gamma-linolenik asit (GLA) (18:3n-6), linoleik asidin (LA, 18:2n-6) Δ 6-desaturazla oluşturduğu ürünü olup, vücutta oluştuktan sonra hızla di-homo γ -linolenik aside (DGLA, 20:3n-6) dönüşmektedir. DGLA, prostaglandin E1 (PGE1) ve 15-OH DGLA gibi, bağışıklık sağlayan ve enflamatuar hastalıkları önleyici hormonların öncüsü olan bir yağ asididir. DGLA Δ 5-desaturaz enzimi ile araşidonik aside (AA, 20:4n-6) dönüşmektedir. GLA'in şeker hastalığı, yüksek tansiyon, kanser, sikleroz, şizofreni, osteoporoz kardiyovasküler hastalıklar, cilt hastalıkları, alerji, enflamatuar hastalıklar gibi birçok hastalık üzerine olumlu etki gösterdiği, bun-

ların yanısıra LDL kolesterolü ve serum TAG seviyesini düşürmede, HDL kolesterolü yükseltmede, plak oluşumunu önlemede olumlu etkisinin olduğu yapılan klinik çalışmalar sonucunda iddia edilmiştir (Engler vd., 1992; Elliot vd., 1998; Senanayake ve Shahidi, 1999; Clough, 2001; Lumor ve Akoh, 2005). GLA'nın, aynı zamanda beynin gri kısmında ve retinanın yapısında bulunan, hücrelerin haberleşmesinde ikinci haberci olarak görev yapan AA'nin vücutta yapımında önemli görevinin olduğu da belirtilmektedir (Wainwright vd., 2001). Bu nedenlerden dolayı, GLA içeren bitkisel yağların fiziksel olarak bebek maması formülasyonlarına eklenmesi son yıllarda önem kazanmıştır.

Bebek maması formülasyonlarında özellikle GLA'yi yüksek miktarda içeren hodan yağı sağlık üzerine iddia edilen etkileri ve AA metabolizması üzerindeki antagonist etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. GLA hızla DGLA ve ardından AA'ye dönüştüğü için ve ayrıca AA'ye göre hem daha güvenli ve ucuz, hem de üretimi daha kolay olduğu için GLA'nın AA'ye alternatif olarak bebek mamalarında kullanımı önerilmektedir (Shimada vd., 1999; Kawashima vd., 2002; Watkins ve German, 2002; Fewtrell vd., 2004; Redden vd., 1998). Lipaz katalizörlüğünde gerçekleşen enzimatik interesterifikasyon reaksiyonları ile fiziksel karışım hazırlığına gerek kalmadan, GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların üretilmeleri mümkün olmaktadır. Bu ürünler $\Delta 6$ -desaturaz enziminin yetersiz olduğu durumlarda da yararlı olmaktadır (Croizer vd., 1996).

Bu çalışmada, ülkemiz için taşıdığı ekonomik öneminin yanısıra sağlık üzerine olumlu etkilere sahip olan fındık yağı kullanılarak sn-1,3 spesifik lipaz enzimi katalizörlüğünde gerçekleştirilen enzimatik asidoliz tepkimeleri ile anne sütü yağına benzer yapıda, ve ayrıca GLA ile zenginleştirilmiş, bebekler için daha faydalı fonksiyonel özelliklerde YY'ların üretilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada ayrıca tepki-yüzey yöntemi kullanarak reaksiyon koşullarının (substrat mol oranı, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi) optimizasyonu ve modellenmesi de amaçlan-

mıştır. Ülkemiz için büyük ticari öneme sahip olmasının yanısıra sağlık açısından da önemli bileşikleri içeren fındık yağının bu çalışmada kullanılması, gerek bu alandaki çalışmaların ilmini oluşturması gerekse dünyanın önde gelen fındık üreticisi konumunda olan ülkemiz ekonomisi açısından önemlidir.

Materyal ve yöntem

Kullanılan rafine fındık yağı yerel marketlerden, tripalmitin (gliserol tripalmitat, minimum saflık % 85), hodan yağı, ve sn-2 pozisyon analizinde kullanılan pankreatik lipaz enzimi Sigma (St Louis, MO) firmasından temin edilmiştir. Immobilize 1,3 spesifik lipaz enzimi olan Lipozyme[®] RM IM Novo Nordisk A/S (Bagsvaerd, Danimarka) firmasından satın alınmıştır. Kullanılan organik çözümler ve ince tabaka kromatografisinde (TLC) kullanılan 20x20 cm boyutundaki plakalar sırasıyla J.T. Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ) ve Fisher Scientific (Norcross, GA) firmalarından satın alınmıştır. Çalışmalarda kullanılan tüm çözümler ve kimyasallar kromatografik ve/veya analitik saflıktadır.

Fındık yağı ve hodan yağından serbest yağ asitlerinin eldesi

Fındık yağı ve hodan yağından serbest yağ asitlerinin eldesinde Senanayake ve Shahidi (1999)'nin uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde göre 25 g yağ, 5.75 g KOH, 11 ml su ve 66 ml % 95'lik sulu etanol (hacim/hacim) karışımı kullanılarak 1 saat boyunca 60°C'de geri soğutucu altında sabunlaştırılmıştır. Süre sonunda karışıma 50 ml distile su eklenmiş ve ortamdaki sabunlaşmayan maddelerin uzaklaştırılması için, karışım ayırma hunisinde iki kez 100 ml hekzan ile çalkalanmıştır. Sabunlaşan kısmı içeren sulu fraksiyon 3 N HCl ile pH=1 olana dek asitlendirilmiştir. Daha sonra karışım ayırma hunisine alınmış ve açığa çıkan yağ asitleri 50 ml hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Hekzan fazı susuz sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra döner buharlaştırıcıda 40°C'deki su banyosunda uzaklaştırılmıştır. Elde edilen fındık yağı ve hodan yağı SYA kullanıma dek -85°C'deki dondurucuda saklanmıştır.

Hodan yağından “üre fraksiyonlama” yöntemi ile gamma-linolenik asit konsantresi eldesi

Hodan yağından GLA konsantresi eldesinde Spurvey ve Shahidi (2000)'nin uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde göre, hodan yağından elde edilen SYA (10 g), üre ve etanol, “yağ asidi:üre:etanol” oranı 1:3.7:20 olacak şekilde 60°C’de geri soğutucu altında karışım homojen bir hal alıncaya dek (1 saat boyunca) karıştırılmıştır. Süre sonunda karışım buzdolabında 0-4°C’de 16 saat tutularak kristallendirilmiştir. Doymuş ve tekli doymamış yağ asitleri üre kristalleri oluşturmuştur. Kristalizasyon sonrasında çoklu doymamış yağ asitlerini içeren karışım vakum uygulanarak süzülüş ve üre kristalleri 25 ml etanol ile yıkanmıştır. Filtrata eşit hacimde su eklenerek 6 N HCl ile pH 4-5 olana dek asitlendirilmiştir. Karışıma eşit hacimde hekzan eklenerek 1 saat boyunca karıştırılmış ve bir ayırma hunisine aktararak çoklu doymamış yağ asitlerini içeren hekzan fazı, üre içeren su fazından ayrılmıştır. Hekzan fazı, içinde kalabilecek üreyi ayırmak için önce distile suyla yıkanmış, sonra susuz sodyum sülfat ile kurutulmuştur. Döner buharlaştırıcı kullanarak, 40°C’de hekzanın uzaklaştırılmasının ardından örnek kullanıma dek -85°C’deki dondurucuda saklanmıştır.

İnteresterifikasyon (Asidoliz) reaksiyonu

İnteresterifikasyon için hazırlanan reaksiyon karışımları 3 ml hekzan, tripalmitin, fındık YA ve GLA konsantresinin farklı substrat mol oranlarından oluşmuştur. Fındık yağı SYA ve GLA karışımı hazırlamak için, fındık yağı SYA GLA konsantresi ile 3:1 (ağırlık/ağırlık) oranında karıştırılmıştır. Lipozyme® RM IM enzimi toplam substrat miktarının % 10’u olacak şekilde tartılarak reaksiyon karışımlarına eklenmiştir. İnkübasyon, kapaklı test tüplerinde ve çalkalama hızı 200 rpm olarak ayarlanmış çalkalamalı su banyosu (New Brunswick Scientific, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Bütün reaksiyonlar 2 paralel olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalamaları alınmıştır.

Tepki yüzey yöntemi ve deneysel tasarım

Yapılandırılmış yağların üretiminde enzimatik asidoliz reaksiyonları kullanılmış olup, bu reaksiyonların üzerinde “substrat-mol oranı”, “reak-

siyon sıcaklığı” ve “reaksiyon süresi” faktörlerinin etkisinin incelenmesi ve optimum koşulların belirlenmesi amacıyla deneysel tasarım uygulamasından yararlanılmış, bunun için Tepki-Yüzey Yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, faktör kombinasyonları, 3 faktörlü, 5 seviyeli Merkezil Bileşik Deney Tasarımı’nda Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) paket programı kullanılarak oluşturulmuştur.

Seçilen 3 faktör ve limit değerleri:

- Substrat-mol oranı (Sr, yağ asitleri/triaçilgliserol, mol/mol) [12-16],
- Reaksiyon sıcaklığı (T, °C) [55-65°C] ve
- Reaksiyon süresi (t, saat) [12-24 saat]’dir.

Merkezil Bileşik Deney tasarımında belirlenen bağımsız değişkenler ve belirlenen noktalardaki kodlara karşılık gelen değerler Tablo 1’de gösterilmektedir.

İnteresterifikasyon reaksiyonları için 3’ü merkez noktası olmak üzere toplam 17 adet deney noktası oluşturulmuş ve bütün tasarım noktalarında 2’şer paralel deney yapılmıştır (Montgomery, 1997; Myers ve Montgomery, 2002).

Tablo 1. Merkezil Bileşik Deney tasarımında belirlenen bağımsız değişkenler ve belirlenen noktalardaki kodlara karşılık gelen değerler

| Bağımsız Değişkenler | Kullanılan Seviyeler ve Değerleri | | | | |
|----------------------|-----------------------------------|----|----|----|------|
| | - α | -1 | 0 | 1 | α |
| Sr | 10.6 | 12 | 14 | 16 | 17.4 |
| T | 51.6 | 55 | 60 | 65 | 68.4 |
| t | 7.9 | 12 | 18 | 24 | 28.1 |

Reaksiyon ürünlerinin analizi

-İnce tabaka kromatografisi ile analiz

Asidoliz reaksiyonu sonucunda reaksiyon karışımı, susuz sodyum sülfat kolondan filtre edilerek ürünün içermekte olduğu enzim ve nem uzaklaştırılmıştır. 50 µL reaksiyon ürünü Silikajel G ile kaplı TLC plakalarına (20x20 cm) uygulanmıştır. Örnekler ince tabakaya damlatıldıktan sonra petrol eteri:dietil eter:asetik asit (80:20:0.5, hacimce) çözgen sistemiyle geliştiri-

rilmiştir. Daha sonra tabakalara 2,7-diklorofloresin'in metanoldeki % 0.2'lik çözeltisi püskürtülmüş ve TAG bandı UV lambası altında görünür hale getirildikten sonra plakadan spatülle kazınarak kapaklı tüplere aktarılmıştır (Jennings ve Akoh, 1999).

-Yağ asidi metil esterlerinin hazırlanması

TAG bandlarına 3 ml metanol ile hazırlanmış %6'lık HCl çözeltisi eklenerek 70-80°C'deki etüvde 2 saat süreyle metillendirilmiş ve daha sonra yağ asitleri metil esterleri (YAME) 2 kez 2 ml hekzan ve 1 ml KCl ile ekstrakte edilmiştir. YAME susuz sodyum sülfat kolondan geçirilerek içerdiği nem uzaklaştırılmış ve hekzan miktarı 0.5 ml oluncaya dek azot kurutucuda azot gazı altında uçurulmuştur (Jennings ve Akoh, 1999).

-Yağ asitlerinin gaz kromatografisi ile analizi

Çalışmada kullanılan substratların reaksiyon ürünlerinin yağ asidi bileşimleri kapiler gaz-sıvı kromatografisi yöntemi (GSK) (Agilent Technologies 6890N) ile tespit edilmiştir. 30 m uzunluğuna ve 0.25 mm iç çapına sahip, J&W Scientific DB-225 (J&W Scientific, Folsom, CA) kolonu kullanılmıştır. Alev iyonizasyon dedektörü kullanılmış ve dağıtmasız modda çalışılmıştır. Enjektör ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 250 ve 260°C olarak ayarlanmıştır. Kolon sıcaklığı 150°C'de 3 dk daha sonra 10°C/dk sıcaklık programıyla kademeli olarak 215°C'ye kadar artırılmış ve 215°C'de 10 dk bekletilmiştir. 1 µL örnek enjekte edilmiş ve analiz sonuçları yağ asidi metil esterlerinin % mol miktarları olarak belirtilmiştir. Bunun için C17:0 iç standardı kullanılarak bilgisayar programı yardımıyla hesaplamalar yapılmıştır.

-Sn-2 pozisyonundaki yağ asitlerinin analizi

TLC plakasından kazınan TAG bandı 2 kez 2 ml dietil eter ile ekstrakte edilmiş ve dietil eter azot gazı altında uzaklaştırıldıktan sonra saf TAG elde edilmiştir. 8 mg saf pankreatik lipaz, 1 ml Tris tamponu (pH 8.0), 0.25 ml safra tuzları (% 0.05), 0.1 ml kalsiyum klorür (% 2.2) saf TAG ekstraktına eklenmiştir. Karışım 40°C'deki su banyosunda 3 dk tutulmuş, reaksiyonun son-

landırılması için 1 ml 6 M HCl ilave edilmiş, daha sonra 2 kez 1'er ml dietil eter ile ekstrakte edilmiştir. Dietil eter miktarı 200 µl olana dek azot gazı altında solvent uzaklaştırılmıştır ve tümü Silika jel G ile kaplı TLC plakalarına spotlanmıştır. Plakalar hekzan/dietil eter/asetik asit (50:50:1, v/v/v) çözgen sistemiyle geliştirilmiştir. 2-MAG bandı UV ışığı altında 2,7-diklorofloresin'in metanoldeki % 0.2'lik çözeltisi püskürtüldükten sonra teşhis edilerek TLC plakasından kazanmıştır. 2-MAG bandın TLC ile ayırımında standart olarak 2-monoolein kullanılmıştır. Daha sonra 2-MAG metillendirilerek GSK ile yağ asidi bileşimi (%mol) belirlenmiştir (Jennings ve Akoh, 1999).

İstatistiksel analiz

Deneylemlerden elde edilen sonuçlara regresyon analizi ve istatistiksel olarak önem derecesi analizi uygulanmış, tepki-yüzey izdüşüm grafiklerinin çizimi Modde 5.0 (Umetrics, İsveç) ve Statistica 6.0 (StatSoft® Inc., USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Optimum reaksiyon koşulları, "substrat mol oranı", "reaksiyon sıcaklığı" ve "reaksiyon süresi" terimleri kullanılarak, tepki-yüzey yönteminden tahminlenen eşitlik ile elde edilmiştir. İkinci derece terimlerin katsayıları regresyon analizi ve "geriye dönük eleme" yöntemiyle saptanmıştır. Modelin uygunluğu, R² model katsayısı ve varyans analizi (ANOVA) sonuçları ile değerlendirilmiştir (Shieh vd., 1995; Xu vd., 1998; Xu, 2000; Muralidhar vd., 2001; Rao vd., 2002; Naessens vd., 2003; Lumor ve Akoh, 2005). Model denklemlerin oluşturulması için 1 no'lu eşitlikte gösterilen ikinci derece-polinom denklem kullanılmıştır:

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

Eşitlikte:

Y: Tepki

β_0 : Kesişim terimi

β_i : Lineer (1.derece) regresyon katsayısı

β_{ii} : Kuadratik (2.derece) regresyon katsayısı

β_{ij} : Etkileşim regresyon katsayısı

X_i ve X_j : Bağımsız değişkenlerdir.

Deneysel çalışma sonuçları

Substratların yağ asidi bileşimi açısından karakterizasyonu

Enzimatik asidoliz reaksiyonlarında kullanılan fındık yağı SYA, tripalmitin, hodan yağı ve GLA konsantrasyonunun gaz-sıvı kromatografisi ile belirlenen yağ asidi bileşimleri Tablo 2’de verildiği gibidir.

Tablo 2. Fındık yağı SYA, tripalmitin, hodan yağının yağ asidi bileşimleri (% ağırlık)*

| Yağ Asitleri | Tripalmitin | Fındık yağı SYA | Hodan yağı |
|--------------------------|-------------|-----------------|------------|
| Miristik asit | 1.96 | - | - |
| Palmitik asit | 95.49 | 6.25 | 15.26 |
| Stearik asit | 2.55 | - | 5.53 |
| Oleik asit | - | 84.04 | 15.86 |
| Linoleik asit | - | 9.61 | 36.66 |
| Linolenik asit | - | 0.09 | - |
| γ -Linolenik asit | - | - | 23.05 |
| Ekosenoik asit | - | 0.01 | 2.66 |
| Erusik asit | - | - | 0.97 |

*:Verilen değerler ikili paralel çalışma sonuçlarının ortalamalarıdır.

Tablo 2’den görüleceği gibi, substrat olarak kullanılan tripalmitin %95.6 oranında palmitik asit içermektedir. Kullanılan fındık yağının YA bileşimi ise hem daha önce çeşitli araştırmacılar tarafından tespit edilen değerlere hem de Türk Gıda Kodeksi, Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliği’nde Ek-1’deki Tabloda belirtilen aralık değerlerine uygun bulunmuştur (Özdemir vd., 2001; Anon., 2003a; Anon., 2003b; Alaşalvar vd., 2003; Bada vd., 2004; Balta vd., 2006).

Üre fraksiyonlama yöntemi, hodan yağından doymuş ve tekli doymamış yağ asitlerinin elimine edilerek GLA’nın zenginleştirilmesi için sıkça uygulanan bir yöntemdir (Wanasundara ve Shahidi, 1999; Spurvey ve Shahidi, 2000). GLA konsantrasyonu bu yöntemle %23.05’den %99.29’a artmıştır. Spurvey ve Shahidi (2000)’nin hodan yağından üre fraksiyonlama yöntemi ile GLA konsantrasyonu elde ettikleri ve reaksiyon koşullarını optimize ettikleri çalış-

mada optimum koşullar altında (reaksiyon süresi: 16 saat, reaksiyon sıcaklığı: -7°C ve üre: YA oranı (ağırlık/ağırlık): 3.7) GLA miktarı %21.6’dan %91.5’e çıkarılmıştır. Ancak bu çalışmada uygulanan koşullarda (reaksiyon süresi: 16 saat, reaksiyon sıcaklığı: 0-4°C ve üre:YA oranı (ağırlık/ağırlık): 3.70) GLA miktarı Spurvey ve Shahidi (2000)’nin elde ettiği GLA miktarından da daha yüksek bulunmuştur. Bu sonucun hem sıcaklıkta yapılan modifikasyondan hem de başlangıçtaki hodan yağının YA bileşiminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Farklı reaksiyon koşullarının GLA ve oleik asit katılımı üzerindeki etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirmeleri

GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY’ların üretimi için oluşturulan 3 faktörlü, 5 seviyeli Merkezli Bileşik Deney Tasarımı ve 17 adet deney noktasında gözlenen tepkiler (Tepki 1: GLA katılımı, % mol; Tepki 2: Oleik asit katılımı, % mol) Tablo 3’de gösterilmektedir.

Tepkiler için çoklu regresyon ve “geriye dönük eleme” yöntemi uygulanarak kuadratik modeller elde edilmiştir. Bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde etkilerin regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P) hesaplanmış ve Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4’den görüleceği üzere, birinci derece terimlerden substrat mol oranının GLA katılımına etkisi negatif yönde olmuştur. GLA katılımı için süre en önemli 1. derece terim olurken, bunu sırasıyla sıcaklık ve substrat mol oranı izlemiştir. Oleik asit katılımı için ise sürenin etkisi en önemli olurken, bunu substrat mol oranı ve sıcaklık izlemiştir.

Tepkiler için oluşturulan modellerin katsayıları (R^2) ve düzeltilmiş katsayıları ($R^2_{düz.}$), GLA katılımı için sırasıyla 0.92 ve 0.88, oleik asit katılımı için ise sırasıyla 0.88 ve 0.83 olarak bulunmuştur. Çalışmaların sonunda modellerden tahminlenen değerler ile deneyler sonucu gözle-

nen değerler arasında lineer ilişkinin olduğu, diğer bir deyişle ölçülen tepkilerin reaksiyon parametrelerinin birbiriyle ilişkisini başarılı bir şekilde temsil ettiği görülmüştür (Muralidhar vd., 2001; Rao vd., 2002; Naessens vd., 2003; Lumor ve Akoh, 2005).

Tablo 3. Deney noktalarında gözlenen tepkiler (GLA katılımı ve oleik asit katılımı, %mol)

| No | Bağımsız Değişkenler | | | Tepkiler | |
|----|----------------------|-------|-------|--------------|---------------------|
| | S _r | T | t | GLA katılımı | Oleik asit katılımı |
| 1 | 12 | 55 | 12 | 6.2 | 35.5 |
| 2 | 16 | 55 | 12 | 6.9 | 38 |
| 3 | 12 | 65 | 12 | 7.1 | 37.1 |
| 4 | 16 | 65 | 12 | 7.2 | 40 |
| 5 | 12 | 55 | 24 | 11 | 39.9 |
| 6 | 16 | 55 | 24 | 10.4 | 44.3 |
| 7 | 12 | 65 | 24 | 11.3 | 41.1 |
| 8 | 16 | 65 | 24 | 11 | 46.3 |
| 9 | 10.64 | 60 | 18 | 9.9 | 39.6 |
| 10 | 17.36 | 60 | 18 | 9.9 | 44.4 |
| 11 | 14 | 51.59 | 18 | 7.9 | 38.8 |
| 12 | 14 | 68.41 | 18 | 10.4 | 43.7 |
| 13 | 14 | 60 | 7.91 | 5.4 | 33.6 |
| 14 | 14 | 60 | 28.09 | 9.8 | 45.9 |
| 15 | 14 | 60 | 18 | 11.3 | 41.3 |
| 16 | 14 | 60 | 18 | 10.4 | 40.3 |
| 17 | 14 | 60 | 18 | 11.4 | 40.3 |

Kısaltmalar: S_r, substrat mol oranı (mol/mol); T, reaksiyon süresi (°C); t, reaksiyon süresi (saat).

Tablo 4. Reaksiyonlar için elde edilen regresyon katsayıları (β) ve önem dereceleri (P-değeri)

| Bağımsız Değişkenler | GLA katılımı | | Oleik asit katılımı | |
|----------------------|--------------|----------|---------------------|----------|
| | β | P-değeri | β | P-değeri |
| Kesişim | 10.55 | <0.0001 | 41.09 | <0.0001 |
| S _r | -0.001 | 0.969 | 1.69 | <0.0001 |
| T | 0.46 | 0.031 | 1.10 | 0.002 |
| t | 1.74 | <0.0001 | 3.05 | <0.0001 |
| T*T | -0.53 | 0.021 | -0.04 | 0.889 |
| t*t | -1.07 | 0.0002 | -0.57 | 0.074 |

Lipozyme® RM IM enzimi ile katalizlenen reaksiyonlar için varyans analizi yapılmıştır. ANOVA analizine göre, F değerleri (F_{model}) (25.0, 36.0) F_{TABLO} (F_{5,11}) (3.20) değerinden büyük olduğu için (p<0.05), modellerin tahminleme için uygun olduğu, ayrıca her iki tepki için oluşturulan modellerde model yetersizliğinin (model hatasının) p-değeri>0.05 olduğu için, modellerin elde edilen verilere uygun olduğu görülmektedir (Shieh vd., 1995; Xu vd., 1998; Muralidhar vd., 2001; Rao vd., 2002; Naessens vd., 2003; Lumor ve Akoh, 2005).

GLA ve oleik asit katılımı için istatistiksel olarak önemli olan terimler ile oluşturulan model denklemleri aşağıdaki gibidir:

$$Y_1 = 10.55 - 0.001S_r + 0.46T + 1.74t - 0.53T^2 - 1.07t^2 \quad (2)$$

$$Y_2 = 41.09 + 1.69S_r + 1.10T + 3.05t - 0.04T^2 - 0.57t^2 \quad (3)$$

Y₁ : Tepki (GLA katılımı, %mol)

Y₂ : Tepki (Oleik asit katılımı, %mol)

S_r : Substrat mol oranı

T : Reaksiyon sıcaklığı

t : Reaksiyon süresi

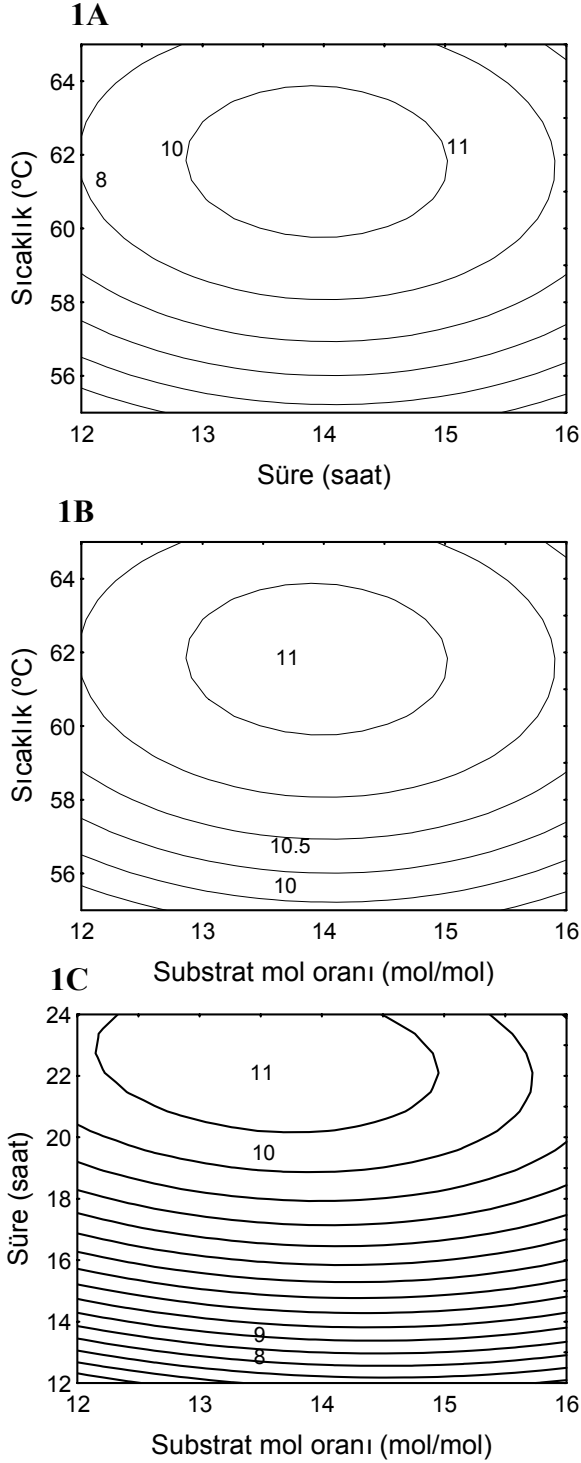
Sonuçların tepki-yüzey izdüşüm grafikleri ile yorumlanması

Elde edilen ürünün GLA ve oleik asit içeriğinin, bağımsız değişkenlerin etkileşimine göre değişimini gösteren tepki-yüzey izdüşüm grafikleri Şekil 1 ve Şekil 2’de gösterilmektedir.

Şekil 1’deki izdüşüm grafikleri “maksimum tepki” grafiği olarak da adlandırılmaktadır (Montgomery, 1997).

Reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresi arasındaki ilişkinin görüldüğü Şekil 1A’da, reaksiyon sıcaklığı ve reaksiyon süresinin artmasıyla GLA katılımının da arttığı görülmektedir.

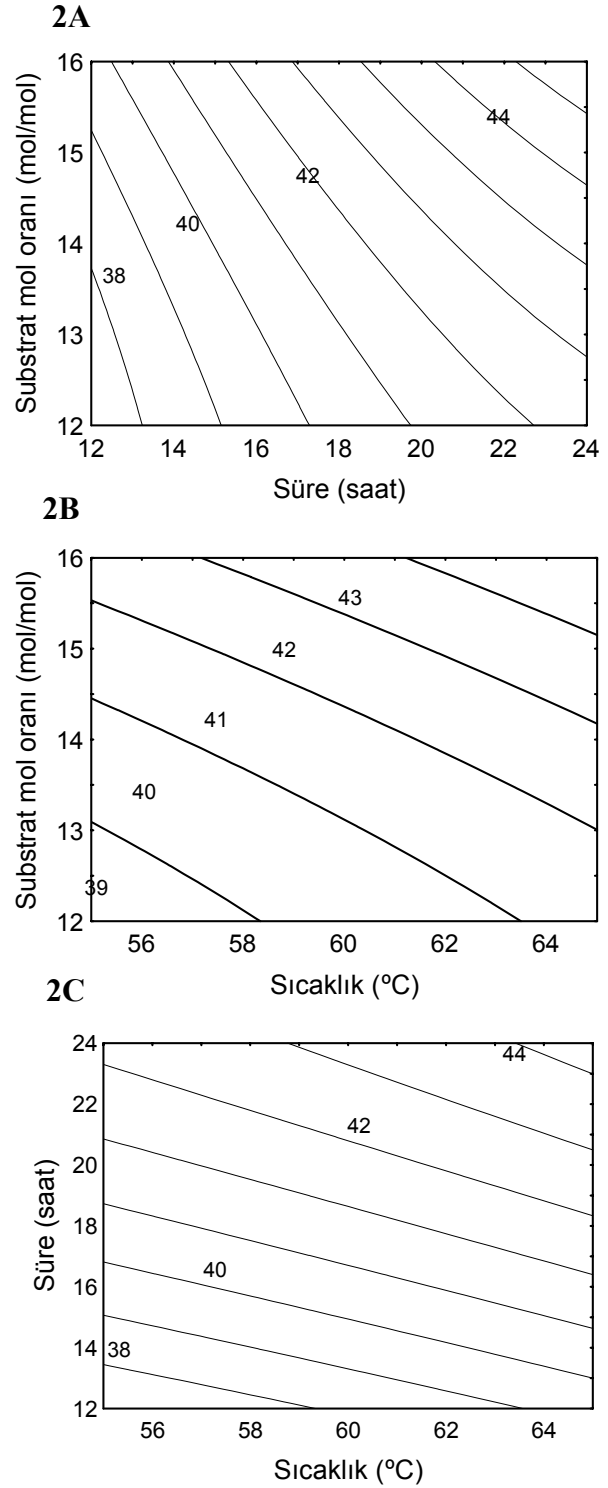
Reaksiyon sıcaklığı ve substrat mol oranı arasındaki ilişkinin verildiği Şekil 1B’de ise GLA katılımının orta noktadan uzaklaştıkça azaldığı görülmektedir.



(B) Sıcaklık-substrat mol oranı
(C) Süre-substrat mol oranı etkisini gösteren izdüşüm grafikleri

Şekil 1C’de ise GLA katılımının 22 saat reaksiyon süresinin altında ve üzerinde substrat mol oranından bağımsız bir şekilde azaldığı görülmektedir.

Şekil 2’de oleik asit katılıma substrat mol oranı-süre, substrat mol oranı-sıcaklık ve süre-sıcaklık arasındaki ilişki gösterilmektedir.



Şekil 2. Oleik asit katılıma (A) Substrat mol oranı-Süre (B) Substrat mol oranı- Sıcaklık (C) Süre-Sıcaklık etkisini gösteren izdüşüm grafikleri

Şekil 2A'da ise substrat mol oranı ve süre etkileşimleri sonucunda literatürde "sırt noktası" olarak tanımlanan izdüşüm grafikleri elde edilmiştir (Montgomery, 1997). Reaksiyon süresinin 8-12 saat olduğu durumda oleik asit katılıma substrat mol oranının etkisi olmamaktadır.

Şekil 2B'de oleik asit katılıma substrat mol oranı ve sıcaklığın etkisinin görüldüğü grafiklerde, substrat mol oranı ve sıcaklığın artırılması ile oleik asit katılımının da arttığı görülmektedir.

Şekil 2C'den, reaksiyon süresinin 17-30 saat olduğu durumlarda, reaksiyon süresindeki ve sıcaklıktaki artış ile birlikte oleik asit katılımının da arttığı görülmektedir.

Hedeflenen özellikte ürün (%10 oranında GLA, %45 oranında oleik asit içeren) eldesi için Modde 5.0 (Umetrics, Sweden) programı yardımıyla belirlenen optimum optimum koşullar: Substrat mol oranı (14.8 mol/mol), reaksiyon sıcaklığı (55°C), reaksiyon süresi (24 saat) olarak bulunmuştur. Bu koşullarda modelden tahminlenen değerler GLA katılımı için %10.2, oleik asit katılımı için %43.1 olmuştur.

Modelin doğrulanması

TYE ile elde olunan modellerin doğruluğunun araştırılması için, interesterifikasyon reaksiyonları optimum koşullarda yeniden test tüplerinde gerçekleştirilmiş ve elde edilen YY'ın YA bileşimi ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları belirlenmiştir. Yapılan analizlere ait sonuçlar Tablo 5'te belirtilmektedir.

Tablo 5. Optimum koşullarda elde edilen YY'ın YA kompozisyonu (% mol) ve sn-2 pozisyonundaki YA oranları (% mol)

| YA | YA (% mol) | sn-2 pozisyonu YA (% mol) |
|---------|------------|------------------------------|
| 16:0 | 41.6 | 74.9 |
| 18:1 | 43.3 | 18.1 |
| 18:2 | 5.4 | 2.1 |
| 18:3n-6 | 9.7 | 2.0 |

Tablo 5'den görüleceği gibi, ürünlerdeki GLA ve oleik asit miktarlarının (sırasıyla, %9.7 ve %43.3) modelden tahminlenen değerlere (%10.2

ve %43.1) oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Asidoliz reaksiyonları sonucunda elde edilen GLA ile zenginleştirilmiş YY %43.3 oleik asit, %41.6 palmitik asit, %5.4 linoleik asit ve %9.7 GLA içermiş ve palmitik asidin %74.9'unun da TAG'ün sn-2 pozisyonunda bulunduğu belirlenmiştir.

Sonuçlar

Elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağ eldesinde, enzimatik asidoliz reaksiyon koşulları optimize edilerek model denklemleri oluşturulmuştur.
- YY'ların sn-2 pozisyonundaki YA bileşimi anne sütü yağının sn-2 pozisyonundaki YA kompozisyonuna oldukça yakın bulunmuştur.
- GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY'lar hem GLA'nın bebek sağlığı ve gelişmesindeki olumlu etkilerini hem de anne sütünün absorpsiyon karakteristikleri/YA bileşimini ürüne kazandırmak için başarıyla üretilmiştir.
- Bu ürünlerin endüstriyel ölçekte üretimleri, ticari bebek mamalarının formülasyonlarında çok değerli ingrediyeentler olarak kullanılmalara olanak sağlayacaktır.

Kaynaklar

- Akoh, C.C., (2002). *Structured lipids* in Akoh, C.C. ve Min, D.B., eds, *Food Lipids*, Marcel Dekker Inc., 877-908, New York.
- Akoh, C.C. ve Xu, X., (2002). in *Enzymatic production of Betapol and other specialty fats* in Kuo, T.M. ve Gardner, H.W., eds, *Lipid Biotechnology*, Marcel Dekker Inc., 461-478, New York.
- Akoh, C.C., Sellappan, S., Fomuso, L.B., Yankah, V.V., (2002). *Enzymatic synthesis of structured lipids* in Kuo, T.M. ve Gardner, H.W., eds, *Lipid Biotechnology*, Marcel Dekker Inc., 433-460, New York.
- Alaşalvar, C., Shahidi, F., Ohshima, T., Wanasundara, U., Yurttaş, H.C., Liyanapathirana, C.M. ve Rodrigues, F.B., (2003). Turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana L.*) 2. Lipid characteristics and oxidative stability, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 3797-3805.

- Anon., (2003a). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar ve Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2001/29) Resmi Gazete Sayı: 24452, 13.10.2001, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
- Anon., (2003b.), Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Bitki Adı ile Anılan Yemeklik Yağlar Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2003/19) Resmi Gazete Sayı: 25150, 26.06.2003, Başbakanlık Basımevi, Ankara.
- Bada, J.C., León-Camacho, M., Prieto, M. ve Alonso, L., (2004). Characterization of oils of hazelnuts from Asturias, Spain, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **106**, 294–300.
- Balta, M.F., Yarılgaç, T., Aşkın, M.A., Kuçuk, M., Balta F. ve Özrenk, K., (2006). Determination of fatty acid compositions, oil contents and some quality traits of hazelnut genetic resources grown in eastern Anatolia of Turkey, *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 681-686 .
- Carnielli, V.P., Luijendijk, I.H., van Goudoever, J.B., Johannes, B., Sulkers, E.J., Boerlage, A.A., Degenhart, H.J. ve Sauer, P.J., (1996). Structural position and amount of palmitic acid in infant formulas: effects on fat, fatty acid, and mineral balance, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **23**, 5, 553-560.
- Clough, P.M., (2001). *Specialty vegetable oils containing gamma-linolenic acid and steridionic acid* in Gunstone, F.D., eds, *Structured and Modified Lipids*, Marcel Dekker Inc., 75-117, New York.
- Croizer, G. L., Fleith, M., ve Secretin, M-C. (1996). *Gamma-linolenic acid in infant formula* in Huang, Y-S. ve Milles, D. E., eds., *Gamma-Linolenic Acid Metabolism and Its Roles in Nutrition and Medicine*, AOCS Press, 246-251, Illinois.
- Elliot, M.L., de Antueno, R.J., Bai, M., Horrobin, D.F., (1998). *Effect of dietary oils enriched in dilinoleoyl-mono- γ -linolenin (DLMG) on the total lipid n-6 fatty acid composition of human tumors grown in nude mice* in Christophe, A.B., ed, *Structural and Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use*, AOCS Press, 129-138, Illinois.
- Engler, M.M., Engler, M.B., Erickson, S.K. ve Paul, S.M., (1992). Dietary gamma-linolenic acid lowers blood pressure and alters aortic reactivity and cholesterol metabolism in hypertension, *Journal of Hypertension*, **10**, 1197-1204.
- Fewtrell, M.S., Abbott, R.A., Kennedy, K., Singhal, A., Morley, R., Caine, E., Jamieson, C., Cockburn, F. ve Lucas, A., (2004). Randomized, double-blind trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation with fish oil and borage oil in preterm infants, *The Journal of Pediatrics*, **4**, 471-479.
- Innis, S.M., Dyer, R., Quinlan, P. ve Diersen-Schade, D., (1995). Palmitic acid is absorbed as sn-2 monopalmitin from milk and formula with rearranged triacylglycerols and results in increased plasma triglyceride sn-2 and cholesteryl ester palmitate in piglets, *Journal of Nutrition*, **125**, 73-81.
- Innis, SM, Quinlan, P.T. ve Nelson, CM., (1998). *Structured triacylglycerols in infant nutrition and metabolism* in Huang Y.S., Sinclair, A.J., eds, *Lipids in Infant Nutrition*, AOCS Press, 268-281 Illinois.
- Jennings, B.H. ve Akoh, C.C., (1999). Enzymatic modification of triacylglycerol of high eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids content to produce structured lipids, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **76**, 1133-1137.
- Jensen, R.G., (2001). *Infant formulas* in Gunstone, F.D., ed, *Structured and Modified Lipids*, Marcel Dekker, 455-464, New York.
- Kawashima, A., Shimada, Y., Nagao, T., Ohara, A., Matsuhisa, T., Sugihara, A. ve Tominaga, Y., (2002). Production of structured TAG rich in 1,3-dicapryloyl-2- γ -linolenoyl glycerol from borage oil, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **79**, 2, 871-877.
- López-López, A., Castellote-Bargalló, A.I., Campoy-Folgoso, C., Rivero-Urgel, M., Tormo-Carnicé, R., Infante-Pina, D. ve López-Sabater, M.C., (2001). The influence of dietary palmitic acid triacylglyceride position on the fatty acid, calcium and magnesium contents of at term newborn faeces, *Early Human Development*, **6**, 83-94.
- Lumor, S.E. ve Akoh, C.C., (2005). Enzymatic incorporation of stearic acid into a blend of palm olein and palm kernel oil: Optimization by response surface methodology, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **82**, 421-426.
- Montgomery, D.C., (1997). *Design and Analysis of Experiments, 4th Edition*, 575–625, John Wiley & Sons Inc., New York.
- Muralidhar, R.V., Chirumamila, R.R., Marchant, R. ve Nigam, P., (2001). A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources, *Biochemical Engineering Journal*, **9**, 17–23.

- Myers, R.H. ve Montgomery, D.C., (2002). *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley & Sons Inc., New York.
- Naessens, M., Vercauteren, R. ve Vandamme, E.J., (2003). Three-factor response surface optimization of the production of intracellular dextran dextrinase by *Gluconobacter oxydans*, *Process Biochemistry*, **39**, 10, 1299-1304.
- Özdemir, M., Açıkturk, F., Kaplan, M., Yıldız, M., Löker, M., Gürcan, T., Biringen, G., Okay, A. ve Seyhan, F.G., (2001). Evaluation of new Turkish hybrid hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties: fatty acid composition, α -tocopherol content, mineral composition and stability, *Food Chemistry*, **73**, 4, 411-415.
- Rao, R. B., Manohar, Sambaiah, K. ve Lokesh, B.R., (2002). Enzymatic acidolysis in hexane to produce n-3 or n-6 FA-enriched structured lipids from coconut oil: optimization of reactions by response surface methodology, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **79**, 9: 885-890.
- Redden, P.R., Lin, X. ve Horrobin, D.F., (1998). *Di-linoleoyl-mono-gamma-linolenin (DLMG) and Di-gamma-linolenoyl-mono-linolein (DGML); naturally occurring structured triacylglycerols in evening primrose oil* in Christophe, A.E., ed, *Structural Modified Food Fats: Synthesis, Biochemistry, and Use*, AOCS Press, 121-128, Champaign Illinois.
- Senanayake, S.P.J. ve Shahidi, F., (1999). Enzymatic incorporation of docosahexaenoic acid into borage oil, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **76**, 9, 1009-1015.
- Shimada, Y., Suenaga, M., Sugihara, A., Nakai, S. ve Tominaga, Y., (1999). Continuous production of structured lipid containing γ -linoleic and caprylic acids by immobilized *Rhizopus delemar* lipase, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **76**, 2, 189-193.
- Shieh, C-J., Akoh, C.C. ve Koehler, P.E., (1995). Four-factor response surface optimization of the enzymatic modification of triolein to structured lipids, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **72**, 6, 619-623.
- Spurvey, S.A. ve Shahidi, F., (2000). Concentration of gamma linolenic acid (GLA) from borage oil by urea complexation: optimization of reaction conditions, *Journal of Food Lipids*, **7**, 163-173.
- Şahin, N., Özçelik, B. ve Karaali, A., (2003). Yapılandırılmış yağlar ve üretimlerinde lipaz enzimlerinin kullanımı, *Gıda*, **8**, 72-77.
- Watkins, S.M. ve German, J.B., (2002). *Unsaturated fatty acids* in Akoh, C.C. ve Min, D.B., eds, *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Second Edition, Revised and Expanded*, Marcel Dekker Inc., 559- 588, New York.
- Wainwright, P.E., Huang, Y. ve Ward, G.R., (2001). *Effects of supplementation of formula with docosahexaenoic acid, arachidonic acid, and gamma-linolenic acid on brain fatty acid composition in artificially reared rat pups* in Huang, Y.S., Ziboh, V.A., eds, *Gamma-Linolenic Acid: Recent Advances in Biotechnology and Clinical Applications*, AOCS Press, 180-190, Illinois.
- Xu, X., Skands, A.R.H., Hoy, C.E., Mu, H., Balchen, S. ve Nissen, J.A., (1998). Production of specific-structured lipids by enzymatic inter-esterification: elucidation of acyl migration by response surface design, *Journal of American Oil Chemists' Society*, **75**, 9, 1179-1186.
- Xu X., (2000). Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: A review, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **102**, 4, 287-303 (2000).
- Wanasundara, U.N. ve Shahidi, F., (1999). Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions, *Food Chemistry*, **65**, 41- 49.