

LIPOZYME® TL İM LİPAZI KULLANARAK  
GLA İLE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ  
ANNE SÜTÜ YAĞINA BENZER YAPILANDIRILMIŞ YAĞLARIN  
ÜRETİMİ VE REAKSİYON KOŞULLARININ OPTİMİZASYONU



GAP IV. Tarım Kongresi, ŞANLIURFA  
21-23 Eylül 2005

Neşe ŞAHİN<sup>1,2</sup> Casimîr C. AKOH<sup>2</sup> ve Artemis KARAALI<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Teknik Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü  
34469, Maslak, İstanbul

<sup>2</sup>University of Georgia, Dept. of Food Science and Technology  
30602, Athens, Georgia, ABD

## Sunu Kapsamı

- Anne sütünün yağ asitleri bileşimi ve bebek beslenmesi açısından önemi
- Gamma-linolenik asitin (GLA) sağlık üzerine etkileri ve GLA ile bebek beslenmesi
- Çalışmanın Amacı
- Materyal-Metot
- Araştırma Bulguları ve Tartışma
- Sonuçlar

# Anne Sütünün Yağ Asitleri Bileşimi

Tablo 1: Anne sütü yağı

Yağ asitleri	TAG	sn-2
8:0	0.29-0.36	-
10:0	1.6-2.5	-
12:0	4.9-7.8	5.3-6.9
14:0	6.6-9.4	11.3-15.4
16:0	22.8-27.0	44.5-57.1
16:1n-7	2.2-3.6	1.6
18:0	5.8-8.0	1.2-4.9
18:1n-9	30.5-35.1	8.1-9.2
18:2n-6	10.3-14.1	7.1-7.9
18:3n-3	0.47-1.2	-
20:3n-3	0.79	
20:4n-6	0.5-1.0	
20:5n-3 (EPA)	0.07	
22:0	0.2	
22:1n-9	0.3	
22:4n-6	0.4	
22:6n-3 (DHA)	0.26	

## Anne Sütü Yağı ve Bebek Beslenmesi için Önemi

- Vücuttaki sindirim sürecinde yağlar, lipaz etkisiyle 2-monoaçilgliseroller ve serbest yağ asitlerine dönüşür. Sn-2 pozisyonunda bulunan ve ortamda serbest y.a. şeklinde bulunan palmitik asit, ortamdaki kalsiyum ve benzeri divalent katyonlarla barsağın alkali pHsında çözünmeyen ve dolayısıyla da vücutta sindirilemeyen sabunlar (kalsiyum palmitat vb. ) oluşturur.
- Oysa palmitik asit sn-2 pozisyonunda ise çözünmeyen sabun oluşumu gerçekleştiremez, dolayısıyla ortamdaki kalsiyum daha kolay emilir.

## Anne Sütü Yağı ve Bebek Beslenmesi için Önemi

- Nitekim, yapılan birçok araştırmada, palmitik asidi yüksek miktarlarda içeren ancak pozisyonu spesifik olarak belirtilmeyen formüllerle beslenen yeni doğmuş bebeklerde kalsiyum absorpsiyonu alınan miktarın %6'sı kadar gerçekleşirken, anne sütüyle beslenen bebeklerde bu oranın %51'e kadar yükseldiği görülmektedir.
- Bu nedenle anne sütü yağının bu özgün y.a. dizilimi bebek beslenmesi ve gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır.

# Gamma-Linolenik Asit (GLA)

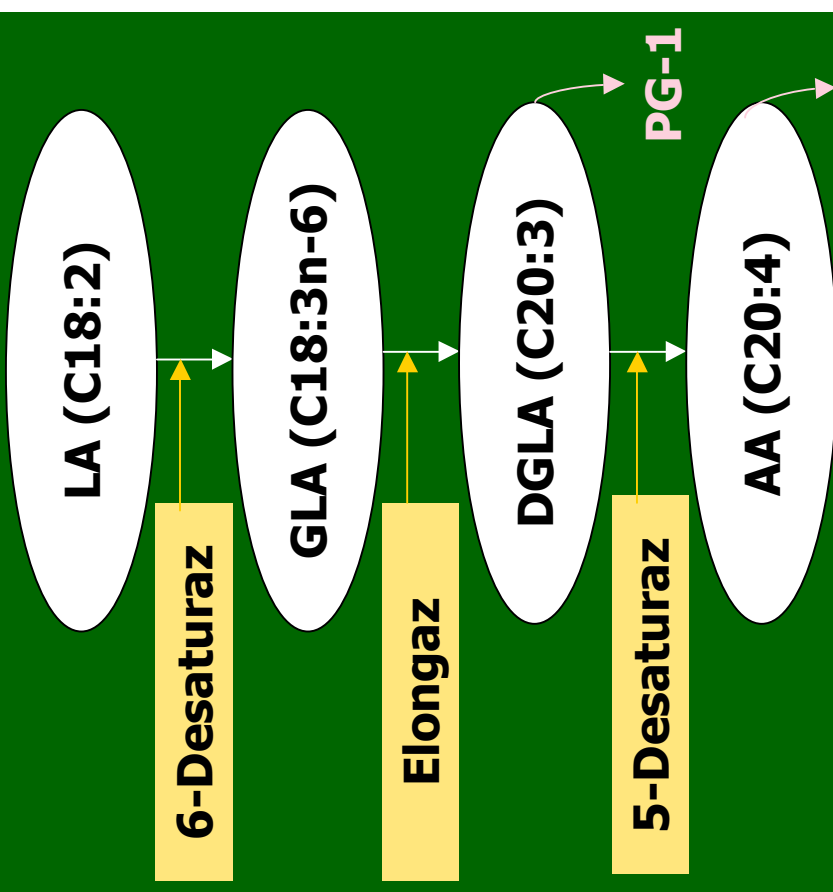
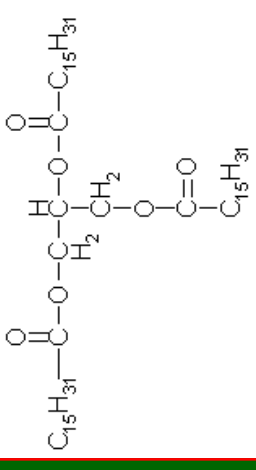
➤ GLA (18:3n-6), linoleik asid'e(LA, 18:2n-6) Δ6-desaturaz enziminin etkisiyle oluşur ve çoklu doymamış bir omega 6 y.a.'dır.

GLA vücutta hızla:

➤ Önce bazı prostaglandinler\*in (PG1) ve 15-OH DGLA)'ların öncüsü olan di-homo gamma-linolenik aside (DGLA),

➤ Ardından da yine bazı prostaglandin\*lerin (PG2) öncüsü olan araşidonik aside (AA, 20:4n-6) dönüşmektedir.

\***PG**: Bağışıklık sistemini olumlu etkileyen ve iltihaplı hastalıkları önleyen hormonlar



PG-2, Thromboksan, Lökotrien  
Şekil 1: n-6 PUFA metabolizması

Sağlıklı yetişkinlerde diyetle alınan LA vücutta GLA'ya dönüşür; ancak bu aşama  $\Delta 6$ -desaturaz (D-6-D) enziminin aktivitesine bağlıdır.

### GLA oluşumunu engelleyen veya yavaşlatan durumlar:

- Kolesterol, doymuş yağlar, trans yağlar
- İşlem görmüş yağlar
- Aşırı alkol ve şeker tüketimi
- Diyabet
- Yaşlılık, yüksek tansiyon, romatizma
- Egzema, stres, sigara
- B6 vitamini ve çinko eksikliği

## GLA'nın Sağlık Üzerine Etkileri

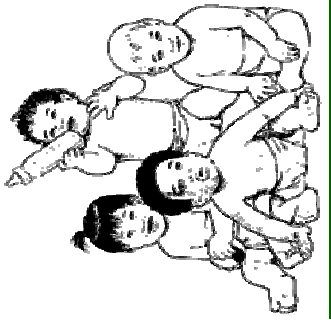


- LDL kolesterolü ve serum TG seviyesini azaltıcı, HDL kolesterolü arttırıcı
- Atherosklerotik plak oluşumunu engelleyici
- İltihabi, ateşli hastalıkları,
- Cilt hastalıklarını (dermatit) önleyici etkiler

- Şeker hastalığı
- Yüksek tansiyon
- Kanser
- Şizofreni
- Menstrüasyon öncesi sendrom
- Kardiyovasküler hastalıklar
- Alerji
- Osteoporoz

□ GLA'nın, aynı zamanda beynin gri kısmında ve retinanın yapısında bulunan, hücrelerin haberleşmesinde ikinci haberci olarak görev yapan araşidonik asidin (AA) de vücutta yapımında önemli görevi vardır.





## GLA ve Bebek Beslenmesi

- Yeni doğan, özellikle de erken doğan bebeklerin vücut ağırlıklarının diyetlerindeki DGLA ve AA miktarı ile pozitif olarak ilişkili olduğu bulunmuştur.
- GLA içeren bebek maması ile beslenen erken doğan bebeklerle yapılan çalışmalarda, 18 aylık oldukları zeka düzeylerinde ve kilo-boy ölçülerinde kontrol gruba göre daha yüksek artışlar olduğu gözlenmiştir.

## GLA ve Bebek Beslenmesi

- Mamaalarda AA yerine onun öncüsü olan GLA'nın kullanıldığı başka bir çalışmada, özellikle de erkek bebeklerin hem vücut gelişiminde hem de sinir sistemlerinin gelişiminde daha çok fayda sağlanmıştır.
- Ayrıca AA ya kıyasla, GLA'nın üretimi hem daha ucuz hem daha kolaydır.



## Çalışmanın Amacı

Bu alışmada:

- GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer yapılandırılmış yağların üretimini:

Tripalmitin,

Fındık yağının yağ asitleri

ve Hodan yağından konsantre edilgen GLA

arasında enzimatik interesterifikasyon (asidoliz)

tepkimeleri ile gerçekleştirilmesi

ve

Tepki-yüzey metodu (TYM) ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu amaçlanmıştır.

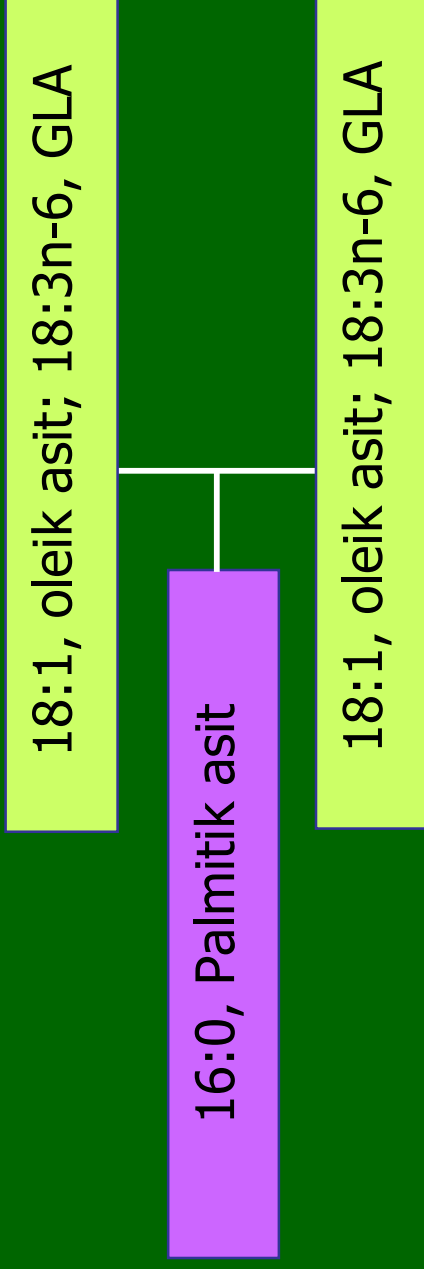


## 'Hedeflenen' Ürün

Çalışmada oluşturulacak TAG ürününün:

- sn-1,3 pozisyonlarında: %10 GLA, %45 oleik asit,
- sn-2 pozisyonunda: %70 civarında palmitik asit

bulunması hedeflenmiştir.



**Şekil 2: GLA ile zenginleştirilmiş anne sütü yağına benzer YY**

## MATERYAL

- Rafine fındık yağı (yerel marketten)
  - Tripalmitin (SIGMA, minimum saflık % 85)
  - Hodan yağı (SIGMA, bora j yağı)
  - Pankreatik Tipaz enzimi (SIGMA)
  - Immobilize 1,3 spesifik Tipaz enzimi - Lipozyme® **TL\* IM** (Novo Nordisk)
  - Organik çözenler
  - 20x20 cm boyutunda, silikajel G ile kaplı ince tabaka kromatografisi (TLC) plakaları
- \*TL IM:** *Thermomyces lanuginosis*'ten elde olunmuş ve immobilize edilmiş

## METOTLAR

### Çalışma 6 aşamada gerçekleşmiştir:

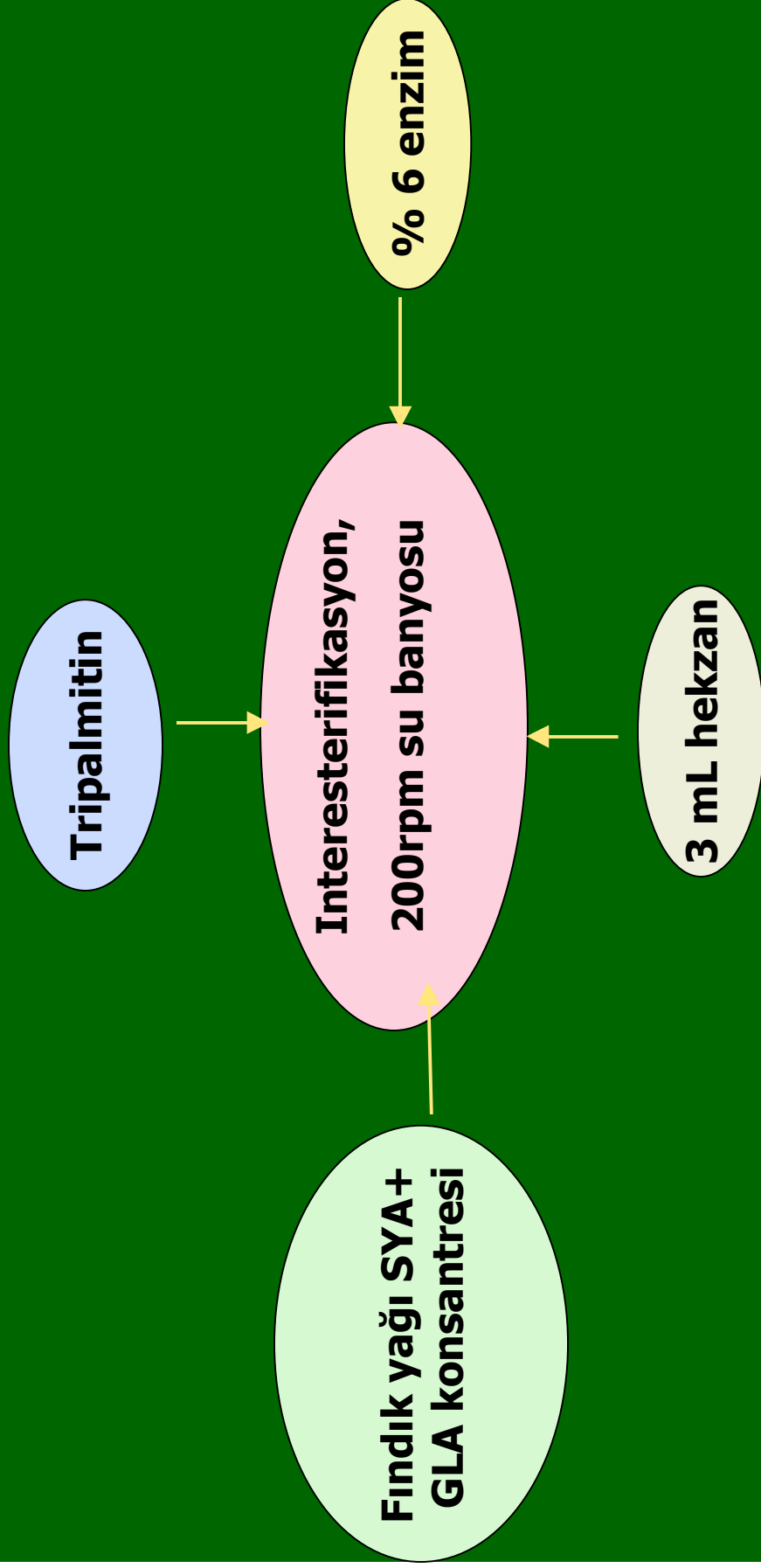
1. Fındık ve Hodan Yağından Serbest Yağ Asitlerinin Eldesi
2. "Üre Fraksiyonlama" Yöntemi ile GLA Konsantrasyonunun Eldesi
3. İnteresterifikasyon Reaksiyonu
4. Tepki Yüzey Yöntemi-Deney Tasarımı
5. Ürün Analizleri
6. İstatistiksel Analiz

## METOTLAR

### Çalışma aşamaları

1. Fındık ve hodan yağından enzimatik hidrolizle serbest yağ asitlerinin eldesi (Senanayek ve Shahidi,1999'a göre) gerçekleştirilmiştir.
2. GLA konsantresi, hodan yağından "üre ile kompleks oluşturarak kristalizasyon" yöntemiyle (Spurvey ve Shahidi, 2000'e göre) elde edilmiş ve kullanana dek -85°C'de muhafaza edilmiştir.

### 3. İnteresterifikasyon Reaksiyonu





## 4. Tepki Yüzey Metodu için Deneysel Tasarım

-3 *faktör*lü, 5 seviyeli Merkezi Bileşik Deneysel Tasarımda faktör kombinasyonları Modde 5.0 (Umetrics, Sweden) paket programı kullanılarak oluşturulmuştur.

### *Faktörler:*

- Substrat molar oranı ( $S_r$ , toplam YA/tripalmitin) [12-16mol/mol]
- Reaksiyon sıcaklığı (T, °C) [55-65°C]
- Reaksiyon süresi (t, saat) [12-24 h]

# Merkezi1 Bi1eşik Dene1 tasarımında belirlenen bağımsız değişkenler ve seviyeleri

Bağımsız Değişkenler ve sembollerini	Seviyeler				
	- $\alpha$	-1	0	1	$\alpha$
$S_r$ :Substrat molar oranı (mol/mol)	10,6	12	14	16	17,3
T:Reaksiyon sıcaklığı (°C)	51.6	55	60	65	68.4
t:Reaksiyon süresi (saat)	7.9	12	18	24	28.1

## 5. Ürün Analizleri

- 5.1. İnce Tabaka Kromatografisi\*
  - Silika jel G plakaları
  - Petrol eteri/etil eter/asetik asit (80:20:0.5, hacmen)
- 5.2. Metil Esterlerinin Hazırlanması\*
  - TLC plakalarından kazınan TAG'ler 75°C'de 2 saat süre ile metillendirilmiştir.

\* (Jennings ve Akoh, 1999).

## 5. Ürün Analizleri (devam)

### 5.3. Yağ Asitlerinin Gaz Kromatografisi ile Kompozisyonel Analizi

- GC cihazı: Agilent Technologies, 6890N model
- Kolon: J&W Scientific DB-225, 30 mx0.25 mm
- Dedektör: FID-Alev İyonizasyon Dedektörü
- Enjektör ve dedektör sıcaklıkları: 250 ve 260° C
- Sıcaklık programı:
  - 150°C'de 3 dk; sonra 10° C/dk; 215° Cye gelince 10 dk
- Örnek miktarı: 1 µL
- Hesaplama: C17:0 internal (dahili) standardı kullanılarak, % mol olarak hesaplanmıştır.

## 5. Ürün Analizleri (devam)

**5.4.** Pankreatik Lipaz KatalizörLüğünde Gerçekleştiren sn-2 Pozisyonundaki Yağ Asitlerinin Kompozisyonel Analizi:

- a. 2-MAG'ların eldesinde Jennings ve Akoh (1999)'un uyguladığı yöntem kullanılmıştır.
- b. 2-MAG metitlendirilerek YA kompozisyonu **5.2 ve 5.3 deki** gibi belirlenmiştir.

## 6. İstatistiksel Analiz

- Regresyon analizi,
  - Önem dereceleri,
  - Tepki-yüzey izdüşüm grafikleri
  - Modde 5.0 (Umetrics, Sweden)
  - ve STATISTICA 6.0 (Statsoft® Inc., USA)
- programları kullanılarak yapılmıştır.

## ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Tablo 2: Substratların YA kompozisyonu (% mol)

Yağ asidi	Fındık yağı SYA	GLA konsantrəsi
C16:0	8.9	-
C18:1	81.5	-
C18:2	9.6	-
C18:3n-6 (GLA)		99.4
C20:1n-9		0.6

**Tablo 3: Deneysel noktaları için gözlenen tepkiler**

No	Bağımsız Değişkenler			Tepkiler (katılım, % mol)	
	$S_r$ (mol/mol)	T (°C)	t (saat)	GLA	oleik asit
1	12	55	12	4.9	35.8
2	16	55	12	6.7	40.6
3	12	65	12	5.9	36.9
4	16	65	12	7.1	38.6
5	12	55	24	9	41.3
6	16	55	24	11.4	43.5
7	12	65	24	7.4	41.6
8	16	65	24	10.1	44
9	10.64	60	18	7	39.3
10	17.36	60	18	8.1	42.5
11	14	51.6	18	9.4	41.3
12	14	68.4	18	6.8	41.4
13	14	60	7.9	3.9	30.9
14	14	60	28.1	10.3	46
15	14	60	18	8.1	41
16	14	60	18	7.3	41.5
17	14	60	18	7.3	43.3



## ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

- Bağımsız değişkenler ve bağımlı değişkenler arasındaki iliŐkiye bağlı olarak, lineer ve kuadratik modellerde, etkiyelerin regresyon katsayıları ve önem dereceleri hesaplanmıŐ, varyans analizi de yapılarak bunların detaylı sonuçları bildiri metninde detaylı olarak sunulmuŐtur.

İstatistiksel olarak önemli bulunan  
1. Derece ve 2.derece etkileşim  
terimleriyle oluşturulan  
Model Denklemleri

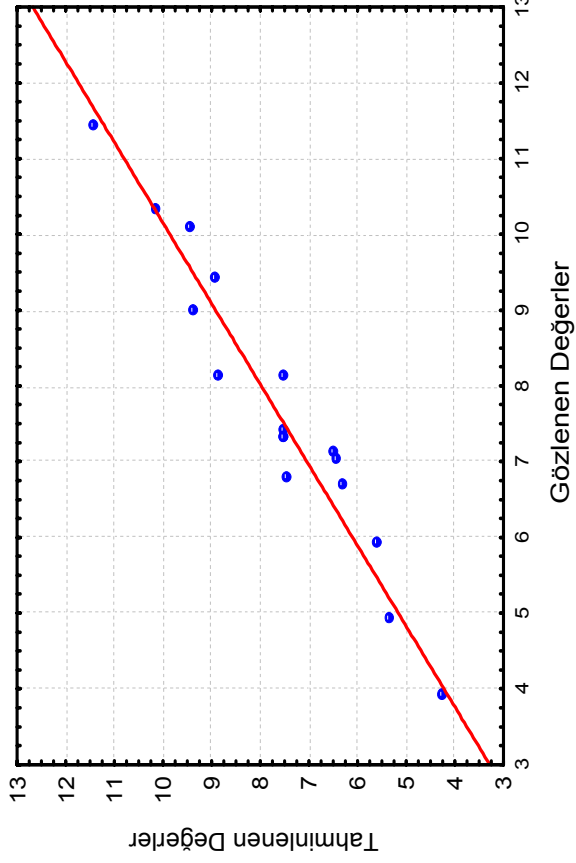
### GLA katılımı için:

$$GLA\%mol = 7.83 + 0.73S_r - 0.43T + 1.76t - 0.18t^2 - 0.54T * t$$

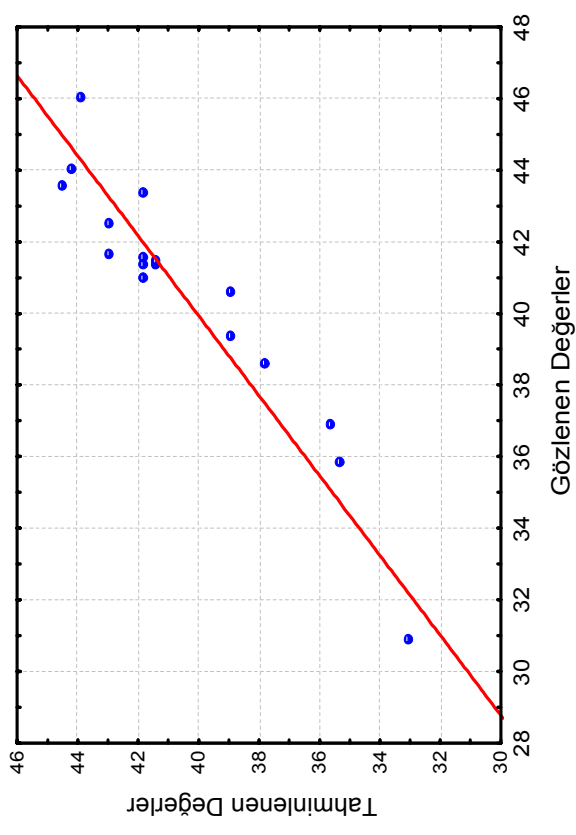
### Oleik asit katılımı için:

$$Oleik\%mol = 41.43 + 1.21S_r + 0.01T + 3.21t - 1.08t^2 + 0.21T * t$$

# Gözlenen değerlere karşılık modelden tahminlenen değerler arasındaki ilişki



Şekil 3: (A) GLA katılımı



(B) Oleik asit katılımı

## Model'in uygunluğu

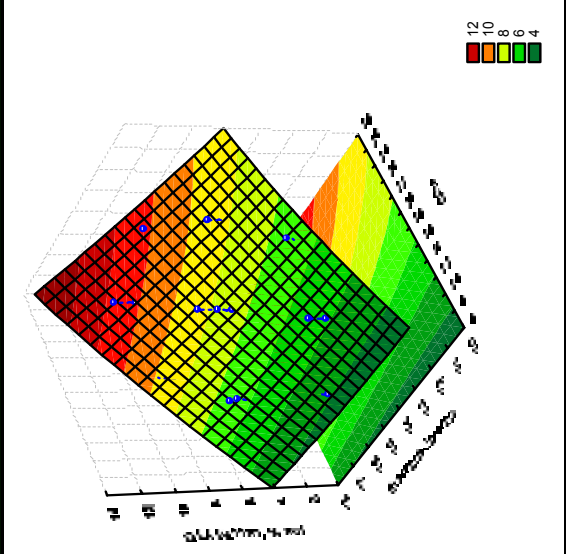
Her iki tepki için de modellerden tahminlenen değerler ile deneyler sonucu gözlenen değerler arasında lineer bir ilişkinin olduğu gözlenmiştir (Şekil 3).

Modellerin katsayıları ( $R^2$ ) ve düzeltilmiş katsayıları ( $R^2_{\text{Düzeltilen}}$ ), sırasıyla :

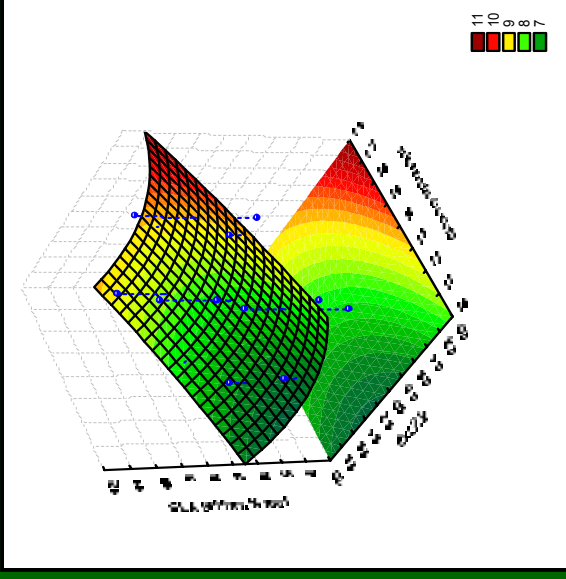
- GLA katılımı için: 0.92 ve 0.88
- Oleik asit katılımı için: 0.88 ve 0.83

Modellerin gözlenen değerlere oldukça uygun olduğu kanıtlanmıştır.

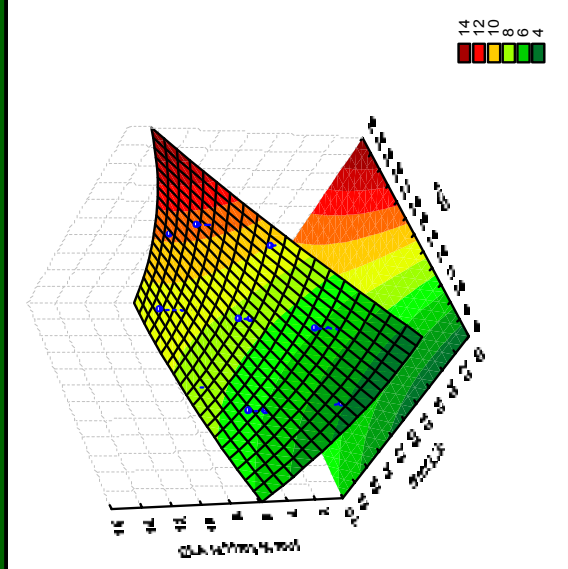
## Şekil 4a: GLA katılımı için tepki-yüzey grafikleri



A (Sr-t)



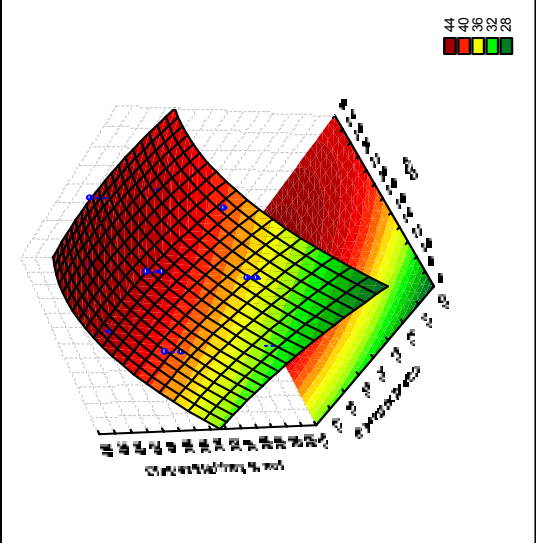
B (T-Sr)



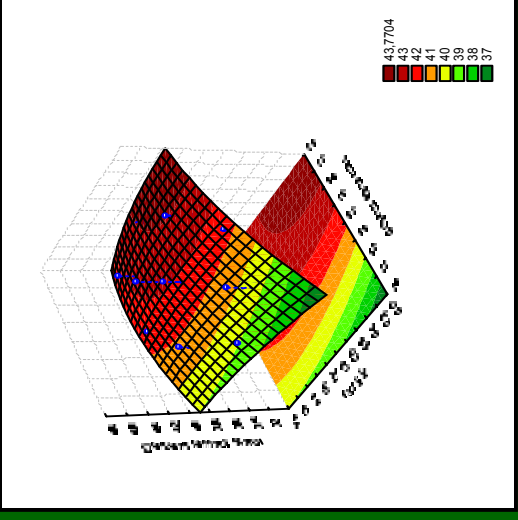
C (T-t)

- GLA katılımı düşük sıcaklıklarda ve yüksek substrat oranlarında daha yüksek olmuştur.
- Substrat molar oranı ve reaksiyon süresi arttıkça GLA miktarı da artmıştır.
- Hedeflenen GLA katılımı (%10), reaksiyon süresi 22-24 saat ve reaksiyon sıcaklığı 55-57°C'de olduğunda gerçekleşmiştir.
- Ayrıca, düşük sıcaklıklarda reaksiyon süresinin arttırılması ile GLA katılımı da artmıştır.

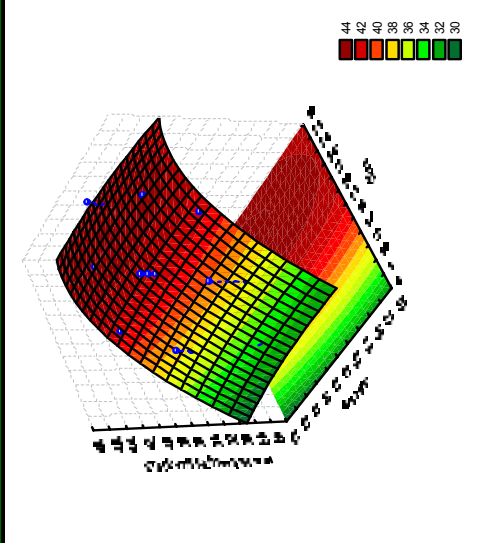
## Şekil 4b: Oleik asit katılımı için tepki-yüzey grafikleri



D(Sr-t)



E ( T-Sr)



F(T-t)

- Hedeflenen oleik asit katılımı, yüksek substrat molar oranlarında sıcaklıktan bağımsız olarak gerçekleşmiştir.
- Substrat molar oranı ve reaksiyon süresi arttıkça oleik asit katılımı da artmıştır.
- Yine hedeflenen oleik asit katılımı yüksek reaksiyon sürelerinde sıcaklıktan bağımsız olarak artmıştır.

## Optimum koşullar

🌱 Hedeflenen GLA (%10) ve oleik asit (%45) katılımları için optimum koşullar yine Modde 5.0 (Umetrics, Sweden) programı ile şu şekilde saptanmıştır:

🌱 Optimum koşullar:

❖ Sr: 14 mol/mol

❖ T: 55°C

❖ t: 24 saat

❖ Modelden tahminlenen katılım oranları:  
GLA: %10.4 , oleik asit: %43.3

# Model'in Doğrulaması

(Doğrulama: Optimum koşullarda interesterifikasyon reaksiyonları gerçekleştirildiğinde GLA ve oleik asit katılımlarının modelden tahminlenen değerlere yakınlığının ispatı)

Tablo 4: Optimum koşullarda elde edilen ürünün toplam y.a. ve sn-2 pozisyonundaki y.a. kompozisyonu

Yağ asidi	Üründe Toplam y.a. (% mol)	Üründe sn-2 pozisyonundaki y.a. (% mol)
16:0	40.9	73.9
18:1	43.8 (M:43.3)	19.7
18:2	5.5	2.2
18:3n-6	9.8	1.4



## SONUÇ



❖ Bu alışma ile, hem GLA ile zenginleştirilmiş, hem de palmitik asidi ve doymamış yağ asitlerini anne sütü yağındaki miktar ve pozisyonlarda içeren, doलयıstyla bebek maması formülasyonlarında etkin bir şekilde kullanılabilecek yeni bir YY'ın üretimi gerçekleştirilmiş ve böyle bir ürün için optimum üretim koşulları saptanmıştır.