

Alabalık yağından çoklu doymamış yağ asitleri eldesi: Tepki yüzey metodolojisi ile optimizasyonu

Leyla KENT, Güldem ÜSTÜN*

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

Özet

ω -3 çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA), özellikle eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) insan sağlığı açısından önemlerinden dolayı artan bir ilgi görmektedir. EPA ve DHA antiinflamatuar, antitrombotik, antiaritmik, antimitojenik, hipolipemik ve vazodilatör özellikler gösterirler. Bu özellikleri ile başta koroner kalp hastalıkları olmak üzere, hipertansiyon, tip 2 diyabet, ülseratif kolit, romatoid artrit, depresyon ve kanser gibi birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel etkiye sahiptir. Bu çalışmada balık yağından gıda ve farmasötik kullanımlar için ÇDYA'ın zenginleştirilmiş ürünlerin eldesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) yağından üre fraksiyonlama yöntemine göre ÇDYA (EPA, DHA, 18:3 ω -3, 20:4 ω -3 ve 22:5 ω -3) içeriği yüksek konsantratlar üretilmiştir. Üre fraksiyonlama deneyleri 4 °C' de üç değişkenli ve üç seviye değerli yüzey merkezli küp tasarım noktalarında yapılmıştır. Bağımsız değişkenler olan üre:yağ asitleri oranı (ağ/ağ), etanol:üre oranı (hac/ağ) ve kristalizasyon zamanının (saat) elde edilen ürünlerin ÇDYA içeriğine (tepki değerine) olan etkileri incelenmiş ve reaksiyon koşulları Tepki Yüzey Metodolojisi'ne göre optimize edilmiştir. Optimum reaksiyon koşulları 3.5 üre:yağ asitleri oranı (ağ/ağ), 5.6 etanol:üre oranı (hac/ağ) ve 4.8 saat kristalizasyon zamanı olarak bulunmuştur. Bu koşullarda, alabalık yağından % 88.1 ÇDYA içeren ürün elde edilmiştir. Ayrıca değişkenlerin tepki değerine olan etkisini gösteren kuadratik polinomial model denklem oluşturulmuştur. Elde edilen model denklemin regresyon katsayısı 0.99 olarak bulunmuştur. Bu da model denklemin güvenilir olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Çoklu doymamış yağ asidi, EPA, DHA, alabalık, üre fraksiyonlama, tepki yüzey metodolojisi.

*Yazışmaların yapılacağı yazar: Güldem ÜSTÜN. ustung@itu.edu.tr; Tel: (212) 285 68 56.

Bu makale, birinci yazar tarafından İTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Programı'nda tamamlanmış olan "Çoklu doymamış yağ asitleri eldesi: Tepki yüzey metodolojisi ile optimizasyonu" adlı doktora tezinden hazırlanmıştır. Makale metni 15.01.2009 tarihinde dergiye ulaştırılmış, 23.02.2009 tarihinde basım kararı alınmıştır. Makale ile ilgili tartışmalar 30.11.2010 tarihine kadar dergiye gönderilmelidir.

Production of polyunsaturated fatty acids from rainbow trout oil: Optimization by response surface methodology

Extended abstract

The ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), alpha-linolenic acid (ALA) are attracting increasing attention because of their importance to human health. EPA is the precursor of prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes, which are effective anti aggregatory substances. DHA is a main component of membrane phospholipids of brain and retina cells. Clinical studies show that DHA is essential for the growth and development of the brain in infants and for maintenance of normal brain functions in adults. Recently it has been shown that EPA and DHA supplementation has positive health effects including attenuation of coronary heart disease risk factors (hypertension, hyperlipidemia, platelet aggregation, glucose tolerance); modulation of eicosanoid synthesis (cellular immune system, dermal integrity) and tumoricidal activity. Some studies indicated that the PUFA concentrates, devoid of more saturated fatty acid, are much better than oils themselves since they allow the daily intake of total lipid to be kept as low as possible. The PUFA concentrates can be produced by several methods, including fractional crystallization, urea fractionation, molecular distillation, supercritical fluid extraction, silver ion complexation and enzymatic hydrolysis and esterification reactions. However, the simplest and the most efficient technique for obtaining PUFA concentrates in the form of free fatty acids is urea fractionation. Initially the triacylglycerols of the oil are split into their constituent fatty acids by using alcoholic KOH and these fatty acids are then mixed with an ethanol solution of urea for complex formation. The saturated and the monounsaturated fatty acids easily complex with urea and crystallize out on cooling. The liquid or non-urea complexed fraction (extract) is enriched with PUFA.

In this study, urea fractionation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fatty acids was carried out to produce PUFA. Urea fractionation experiments were carried out at 4 °C according to a three-factor and three-level face-centered cube design points. The effects of independent variables such as urea-to-fatty acid ratio (w/w), ethanol-to-urea ratio (v/w) and crystallization time (h) on the PUFA content of

the obtained products (response) were investigated and reaction conditions were optimized by Response Surface Methodology (RSM). Free fatty acids (4 g) were mixed with urea in 95 % aqueous ethanol and heated at 60°C with stirring until the mixture was turned into a clear homogenous solution. The ratio of urea-to-fatty acids was changed by using different amounts of urea, and the ratio of ethanol-to-urea was changed by using different amounts of ethanol. The homogenous solution was cooled to room temperature, placed in refrigerator kept at 4 °C for different periods for further crystallization. The crystals formed (urea-fatty acid adducts, also referred to as the urea complexing fraction) were separated from the liquid (non-urea complexing fraction) by fast filtration. The liquid was diluted with an equal volume of water and acidified to pH 2-3 with 6 N HCl; an equal volume of hexane and 10 mL of saturated salt solution were subsequently added and the mixture was stirred thoroughly for 1 h, and then transferred to a separatory funnel. The hexane layer containing the liberated extract fatty acids was separated from the aqueous layer. The solvent was removed using a rotary evaporator. The obtained fatty acids were weighted and designated as 'extract' throughout this study. The fatty acid composition of the extract was determined by GC.

Before RSM was applied, an appropriate range (lower, middle, and upper points, levels) for each independent variable was determined by varying one independent variable at a time while keeping the others constant. A total of 17 experiments were carried out according to a three factor, three level face-centered cubic design points. In the urea fractionation of rainbow trout fatty acids, the range of each variable was selected as follows: urea-to-fatty acids ratio, 2-4; ethanol-to-urea ratio, 5-9; time, 1-15 h. Optimal conditions were determined to be a urea-to-fatty acids ratio of 3.5, ethanol-to-urea ratio of 5.6 and a time of 4.8 h. Experiments conducted under these optimized conditions will be yielded an product containing 88.1 % PUFA. A good quadratic model was obtained as highly significant with a satisfactory regression coefficient (R^2) found as 0.99. In conclusion, the PUFA enriched product was obtained from rainbow trout fatty acids by urea fractionation in this study. This concentrate could be used as valuable supplement for food and pharmaceutical purposes.

Keywords: PUFA, EPA, DHA, rainbow trout, urea fractionation, response surface methodology.

Giriş

Günümüzde obezite, kalp ve damar hastalıkları gibi rahatsızlıklar insanların en büyük sorunlarından biridir. Bu hastalıklarda gözlenen hızlı artış, endüstriyelleşme, şehirleşme, teknolojinin hızlı gelişimi ve gıda marketlerinin globalleşmesi sonucu insanların beslenme tarzının değişimine ve iş koşulları gereği fiziksel aktivitelerinde gözlenen azalmaya bağlanmaktadır (Anonim, 2006; 2007a). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, son yıllarda insanlar yüksek enerjili, fazla miktarda yağ, tuz, protein ve rafine karbonhidrat içeren, buna karşılık vitamin ve mineral değeri düşük gıda maddelerini daha fazla tüketmektedir. Örgüt bu hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde, öncelikle yağ, protein ve karbonhidratca dengeli gıda tüketilmesini, kompleks karbonhidratlar ve özellikle omega-3 çoklu doymamış yağ oranı yüksek yağlar kullanılmasını ve ayrıca yağlarla alınan ω -6/ ω -3 oranının 1:5-1:10 arasında olmasına dikkat edilmesini önemle tavsiye etmektedir.

Son yıllarda yapılan bilimsel ve klinik çalışmalarla ω -3 çoklu doymamış yağ asitlerinin insan sağlığı üzerinde pek çok olumlu etkisinin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri olan alfa-linolenik asit (ALA), eikosapentaenoik asit (EPA) ve dokosaheksaenoik asit (DHA) antiinflamatuvar, antitrombotik, antiaritmik, antimitojenik, hipolipemik ve vazodilatör özellikler gösterirler. Bu özellikleri ile başta koroner kalp hastalıkları olmak üzere, hipertansiyon, tip 2 diyabet, astım, alzheimer, ülseratif kolit, romatoid artrit, depresyon ve kanser gibi birçok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde potansiyel etkiye sahiptir. Ayrıca görme, motor sinir sistemi gelişimi, duygusal ve davranış gelişimi üzerinde yapısal ve fonksiyonel olarak etkin olduğu bilinen ω -3 yağ asitleri özellikle DHA'nın, beyin gelişmesini, öğrenmeyi, hafızayı ve görsel fonksiyonları geliştirdiği de saptanmıştır (Lauritzen vd., 2001, SanGiovanni, 2000). Omega-3 yağ asitleri trombosit agregasyonu ve reaktivitesini ve de plazma viskozitesini azaltırken pıhtılaşma zamanını arttırır. İnflamatuvar eikosanoidlerin üretimini azaltır. Damarlarda plak oluşumunu önler (Brown 2000).

Literatürde EPA ve DHA içeren yağlardan bu asitlerin konsantrite edilmesi üzerine yapılmış çalışmalarda, fraksiyonlu kristalizasyon, üre fraksiyonlama, kromatografik ayırım, enzimatik hidroliz ve esterleşme ve süperkritik CO₂ ekstraksiyon yöntemi gibi yöntemlerin denendiği görülmektedir. Üre fraksiyonlama yöntemi 1940 senesinden beri yağ asitlerinin, esterlerinin, alkollerinin ve diğer türevlerinin birbirlerinden, yağlardan ve diğer katılma yapmayan maddelerden ayrılması için geliştirilmiş uygulaması en basit ve verimli çalışan bir yöntemdir. Burada karbon zincir uzunluğu, moleküldeki doymamışlığın varlığı ve derecesi önemlidir. Üre fraksiyonlama yöntemi diğerlerine göre basitliği, çabuk sonuç verebilmesi ve uygulama maliyetinin düşüklüğü açısından endüstriyel ölçekte uygulamalar için daha elverişli olan bir yöntemdir (Hayes, 2002).

Oluşan üre bileşiğindeki yağ asitleri minimal olarak hava ile temas ettiğinden doymamış yağ asitlerinin stabilitesi artar ve arzu edilen yağ asitleri yüksek saflıkta elde edilir (Luthria, 2001).

Bu çalışmada, alabalık yağ asitlerinden çoklu doymamış yağ asitler (ÇDYA) ile zenginleşmiş ürünlerin eldesinde, reaksiyon parametrelerinin (değişkenlerin) ürün bileşimi üzerine olan etkisi ve optimum koşulların belirlenmesinde deneysel tasarımdan yararlanılmıştır. Bu amaçla Tepki Yüzey Metodolojisi (TMY) kullanılmıştır. TYM istatistiksel ve matematiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir yöntemdir. 3 değişkenli ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun olarak üre fraksiyonlama deneylerinin tasarımı yapılmıştır (Myers ve Montgomery, 2002; Neter vd., 1999; Bektaş, 2006).

Çalışmalarımızda ÇDYA eldesinde alabalık yağı kullanılmıştır. Türkiye'de üretimi en yüksek olan kültür balıklarından biri olan alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) Salmonidae familyasının en tanınmış mensubudur ve somon balığı ile yakın akrabadır. Ülkemizde deniz ve tatlı su alabalığı olmak üzere birçok türü bulunur. Türkiye'nin neredeyse her yerinde alabalık üretilen küçük veya büyük çiftliklere rastlamak mümkündür (Anonim, 2007b).

Literatürde üre fraksiyonlaması yöntemine göre ton balığı ve ayıbalığı yağlarından EPA ve DHA'ca zengin ürünler eldesi üzerine iki çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak optimizasyon koşullar belirlenmiştir. Buna karşılık üre fraksiyonlama yöntemi kullanılarak alabalık yağından çoklu doymamış yağ asitlerinin zenginleştirilmesi ile ilgili dünyada ve Türkiye'de yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Liu ve arkadaşlarının yürüttükleri çalışmada (Liu vd., 2006), ton yağından DHA ve EPA'nın üre fraksiyonlama yöntemine göre eldesi optimize edilmiştir. Bu çalışmada üç değişkenli üç seviyeli tasarım yöntemine göre üre:yağ asidi oranı, kristalizasyon sıcaklığı ve kristalizasyon zamanının tepki değerlerine olan etkileri incelenmiştir. Üre katılım reaksiyonu üzerinde üre:yağ asidi oranı ve kristalizasyon sıcaklığının çok büyük etkisinin olduğu belirlenmiştir. Çalışmada optimum koşullar: üre:yağ asidi oranı 3 (g/g), kristalizasyon sıcaklığı -5 °C ve kristalizasyon zamanı 20 saat olarak tespit edilmiş olup bu koşullarda elde edilmiş konsantre ürünün DHA ve EPA toplamı % 85.02, ürün verimi % 25.1 olarak saptanmıştır.

Wanasundara ve Shahidi tarafından yapılan diğer çalışmada ise, ayıbalığı yağından üre fraksiyonlama yöntemi ile Tepki Yüzey Metodolojisi kullanılarak EPA ve DHA'ca zenginleştirilmiş ürün elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada optimum koşullar: üre:yağ asidi oranı 4.5 (g/g), kristalizasyon sıcaklığı -10°C ve kristalizasyon zamanı 24 saat'dir. Bu koşullarda ürünün DHA ve EPA toplamı %88 olarak bulunmuştur (Wanasundara ve Shahidi, 1999).

Materyal ve yöntem

Bu çalışmada kullanılan alabalık yağı Kardelen Tarım Ürünleri Ltd. Şirketinden temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan tüm çözücüler ve kimyasallar Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiş saf ürünlerdir.

Alabalık yağından serbest yağ asitlerinin eldesi

Çalışmada kullanılan alabalık yağından serbest yağ asitlerin eldesinde Senanayake ve Shahi-

di'nin kullandığı yöntem kullanılmıştır (Senanayake ve Shahidi, 2000). 250 mL'lik cam balona 20 g yağ ve 100 mL 1N etanolü NaOH çözeltisi konulmuş ve karışım geri soğutucu altında 2 saat sabunlaştırma işlemine tabi tutulmuştur. Süre sonunda reaksiyon karışımına 100 mL su ilave edilmiştir. Reaksiyon ortamından sabunlaşmayan maddelerin uzaklaştırılması için, karışım ayırma hunisinde 2 kez 100 mL hekzan ile çalkalanmıştır. Sabunlaşmayan maddeler hekzan fazında çözünmüş ve yağ asitleri sodyum sabunları ise sulu fazda kalmıştır. Sabunlaşan maddeleri içeren sulu faza 3N HCl pH 1,0 olana kadar damla damla ilave edilmiş ve yağ asitlerinin serbest hale geçmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu yağ asitleri 100 mL hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Hekzan fazı 2 kez 50 mL su ile yıkanmış, sodyum sülfat ile kurutulduktan sonra döner buharlaştırıcıda hekzanın uçurulması sağlanmıştır. Bu şekilde elde edilen yağ asitleri kapalı kaplara alınmış ve kullanılabilece kadar derin soğutucuda muhafaza edilmiştir.

Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağı yağ asitlerinden çoklu doymamış yağ asitlerince zengin ürünlerin eldesi

Üre fraksiyonlama yöntemine göre alabalık yağından EPA ve DHA ile zengin konsantre ürünlerin edilmesinde Wanasundara ve Shahidi'nin çalışma prosedürü uygulanmıştır (Wanasundara ve Shahidi, 1999). Bu yöntemde göre, 400 mL'lik behere 4 gram yağ asitleri ve %96'luk etanolde çözülmüş üre çözeltisi konulduktan sonra, karışım 60 °C da tamamen berrak çözelti elde edilene kadar karıştırılmıştır. Deneylerde, yağ asidi:üre (ağırlık/ağırlık) oranı 1:2.0-5.0 ve üre:etanol (ağırlık/hacim) oranı ise 1:5-10 arasında değiştirilmiştir. Berrak çözelti elde edildikten sonra, karışım oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve buzdolabında +4 °C da 1-16 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde, beher içeriği nuçe erlenine aktarılmış ve vakum uygulanarak derhal süzümüştür. Süzüntüye hacmi kadar sıcak su (60 °C) eklendikten sonra 6N HCl ile pH 2 olana kadar asitlendirilmiştir. Filtrata daha sonra eşit hacimde hekzan ve 10 mL doymuş tuz çözeltisi ilave edilmiş, 1 saat karıştırıldıktan sonra karışım bir ayırma hunisine aktarılmıştır. Üre ile kompleks oluşturmayan yağ asitlerini içeren hekzan fazı, üreli sulu fazdan ayrılmıştır.

Hekzan fazı üre kalmayana kadar birkaç kez su ile yıkanmış ve susuz sodyum sülfat ile kurutulmuştur. Hekzan fazı daha sonra darası belli balona alınmış ve döner buharlaştırıcıda hekzanın tamamen uçurulması sağlanmıştır. Balonda kalan bakiye daha sonra tartılmıştır. Üre ile kompleks yapmayan yağ asitlerini içeren bu fraksiyon çalışmada “Ekstrat” olarak adlandırılmıştır.

Nüçe başlığında kalan kristaller ise içerisinde 100 mL sıcak su (60 °C) bulunan behere aktarıldıktan sonra, çözelti 6N HCl ile pH 2 olana kadar asitlendirilmiştir. Açığa çıkan bu yağ asitleri çözüldüğü ekstrat yağ asitlerinin eldesinde açıklanan işlemler uygulanarak geri kazanılmıştır. Üre ile kompleks yapan yağ asitlerini içeren bu fraksiyon çalışmada “Rafinat” olarak adlandırılmıştır.

Deneyel tasarımda kullanılan değişkenlerin ve değişken seviye değerlerinin belirlenmesi

Literatür verilerine göre, yağ asitlerinin üre fraksiyonlama yöntemi ile fraksiyonlanmasında; yağ asitleri:üre oranı, çözücü cinsi (etanol, metanol), üre:çözücü oranı, reaksiyon süresi ve reaksiyon sıcaklığı en önemli değişkenler arasındadır. Optimizasyonun en verimli ve doğru şekilde uygulanabilmesi için değişkenlerin ve değişken etki aralıklarının seçimi son derece önemlidir. Bu seçim yapılırken reaksiyon sistemi dışında, ekonomiklik ve uygulanabilirlik faktörleri de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çalışmada yağ asitleri:üre (ağırlık/ağırlık) oranı, üre:çözücü (ağırlık/hacim) oranı ve reaksiyon süresi (saat) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Elde edilen ekstratların % ÇDYA içerikleri tepki değerleridir. Çözücü olarak etanol (%96'lık) ve çalışma sıcaklığı +4 °C seçilmiş ve sıcaklık parametre olarak incelenmemiştir. Seçilen değişkenlerin seviye değerlerinin belirlenmesi için üç seri ön üre fraksiyonlama deneyleri yürütülmüştür. Herbir seride, 2 parametre sabit tutularak 3. parametrenin farklı değerlerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Yürütülen 3 seri ön üre fraksiyonlama deneyi sonucunda, yağ asidi:üre oranının, üre:etanol oranının ve kristalizasyon süresinin değişimine göre ekstrat ürünlerinin çoklu doymamış yağ asitleri içeriklerinin

değişimi incelenmiştir. Değişim eğrilerinden, herbir parametre için etkin çalışma aralığı yani yüksek çoklu doymamış yağ asidi içerikli ekstratların elde edilebileceği aralıklar belirlenmiş ve bu aralıkta herbir parametre için 3 seviye değeri (-1, 0, +1 değerleri) saptanmıştır.

Deneyel tasarım ve reaksiyon koşullarının optimizasyonu

Tepki Yüzey Metodolojisine göre reaksiyon koşullarının optimizasyonu için, bağımsız değişkenler için belirlenmiş 9 seviye değeri kullanılarak, 3 değişken ve 3 seviyeli yüzey merkezli küp tasarımına uygun 17 üre fraksiyonlama deneyi gerçekleştirilmiştir.

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

Tepkilerin değerlendirilmesinde aşağıda verilen 2. dereceden polinom eşitliğinden yararlanılmıştır.

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

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

Deneyel çalışma sonuçları

Alabalık yağı yağ asitleri bileşimi

Çalışmada kullanılan alabalık yağı yağ asitlerinin önce metil esterleri hazırlanmış ve bileşimi gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. 30 m uzunluğuna, 0.25 mm iç çapına sahip, 0.1 µm film kalınlığında %5 difenil ve %95 dimetil polisiloksan içeren kapiler kolonda çalışılmıştır. Alev iyonizasyon detektörü kullanılmıştır. Enjektör ve detektör sıcaklıkları sırasıyla 250 ve 280 °C olarak ayarlanmıştır. Kolon sıcaklığı 150 °C'de 5 dak bekletildikten sonra 5 °C/dak sıcaklık programıyla kademeli olarak 275 °C ye kadar artırılmış ve 275 °C'de 10 dak daha

bekletilmiştir. 1 µL örnek enjekte edilmiş ve analiz sonuçları yağ asidi metil esterlerinin % ağırlık miktarları olarak verilmiştir. Sonuçlar Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Alabalık yağı yağ asitleri bileşimi

Yağ asidi	Bileşim (%)
14:0	7.6
16:1	10.5
16:0	21.2
18:3	2.2
18:2	3.8
18:1	17.4
18:0	4.1
20:5 (EPA)	11.1
20:4	0.8
20:1	1.7
20:0	0.6
22:6 (DHA)	15.9
22:5	1.0
22:1	1.9
22:0	0.2
ÇDYA	31.0

ÇDYA: EPA, DHA, 18:3ω-3, 20:4 ω-3 ve 22:5 ω-3

Değişkenlerin seviye değerlerinin belirlenmesi deneylerinin sonucunda, her değişken için uygun çalışma aralığı [-1 (düşük), 0 (orta) ve +1 (yüksek) seviye değerleri] belirlenmiştir. Belirlenen -1, 0 ve +1 seviye değerleri: üre:yağ asitleri oranı için 2, 3 ve 4; etanol:üre oranı için 5, 7 ve 9 ve zaman için 1, 8 ve 15 saat’dir.

Yüzey merkezli küp tasarımına göre belirlenen üç değişkenli ve üç seviye değerli deney tasarım noktaları ve bu koşullarda yürütülmüş 17 deney sonucunda ekstratlardan elde edilen tepki değerleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tepki yüzey metodolojisine göre bağımsız değişkenler için belirlenen kritik (optimum) değerler Tablo 3’te görülmektedir.

Tepki yüzey metodolojisine göre bu kritik koşullarda elde edilecek maksimum tepki değeri (ÇDYA) % 88.1 olarak bulunmuştur.

Tablo 2. Yüzey merkezli tasarım noktalarında yürütülmüş deneyler sonucunda elde edilen tepki değerleri

Deney No	Değişken seviyeleri			Tepkiler Y
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	2	5	1	74.6
2	2	5	15	76.9
3	2	9	1	64.0
4	2	9	15	65.9
5	4	5	1	86.9
6	4	5	15	87.2
7	4	9	1	82.3
8	4	9	15	84.0
9	2	7	8	71.7
10	4	7	8	86.5
11	3	5	8	86.4
12	3	9	8	79.8
13	3	7	1	84.9
14	3	7	15	86.2
15	3	7	8	85.1
15	3	7	8	84.7
17	3	7	8	84.9

X₁: Üre:yağ asitleri oranı, ağırlık/ağırlık

X₂: Etanol:üre oranı, hacim/ağırlık

X₃: Zaman, saat

Y: % ÇDYA

Tablo 3. Bağımsız değişkenlerin kritik değerleri

Değişkenler	Minimum değer	Kritik değer	Maksimum değer
X ₁	2	3.5	4
X ₂	5	5.6	9
X ₃	1	4.8	15

X₁: Üre:yağ asitleri oranı, ağırlık/ağırlık

X₂: Etanol:üre oranı, hacim/ağırlık

X₃: Zaman, saat

Farklı reaksiyon koşullarının alabalık yağ asitlerinden ÇDYA’ince zengin ürün eldesi üzerindeki etkilerinin istatistiksel açıdan değerlendirilmesi

Deneysel tasarımdan elde edilen tepkilerin değerlendirilmesinde kullanılan 2. dereceden polinom eşitliğinde; ortalama etki, değişkenlerin lineer, kuadratik ve etkileşimleri için belirlenen regresyon katsayıları ve bağımsız değişkenlere ait katsayılar Tablo 4’te görülmektedir.

Tablo 4. Alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'ce zengin ürün eldesinde, bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiye bağlı olarak lineer ve kuadratik modellerde etkilerin tahminleri ve katsayıları

	Etki	p değeri	Katsayı
Kesişim	84.9507	0.000000 ^a	84.95070
Lineer			
X ₁	14.7600	0.000000 ^a	7.38000
X ₂	-7.2000	0.000000 ^a	-3.60000
X ₃	1.5000	0.000173 ^a	0.75000
Kuadratik			
X ₁₁	-11.7775	0.000000 ^a	-5.88873
X ₂₂	-3.7775	0.000032 ^a	-1.88873
X ₃₃	1.1225	0.026491 ^b	0.56127
Etkileşim			
X ₁₂	3.4500	0.000000 ^a	1.72500
X ₁₃	-0.5500	0.049507 ^b	-0.27500
X ₂₃	0.2500	0.316820	0.12500

X₁= Üre:YA oranı (ağ/ağ)

X₂= Etanol:Üre oranı (hacim/ağ)

X₃= Zaman (saat)

X₁₁= Üre:YA oranı* Üre:YA oranı

X₂₂= Etanol:Üre oranı* Etanol:Üre oranı

X₃₃= Zaman*Zaman

X₁₂= Üre:YA oranı*Etanol:Üre oranı

X₁₃= Üre:YA oranı*Zaman

X₂₃= Etanol:Üre oranı*Zaman

^a p < 0.01 düzeyinde anlamlı

^b p < 0.05 düzeyinde anlamlı

Tablo 4 incelendiğinde, ekstratların ÇDYA içeriğine 1. derece terimler arasında etanol:üre oranının etkisinin negatif olduğu görülmekte ve % ÇDYA değerine 1. derece terimlerden üre:yağ asitleri oranının etkisinin en yüksek olduğu, zamanın ise en az etki gösterdiği anlaşılmaktadır. Benzer şekilde 2. derece terimler için üre:yağ asitleri oranı en yüksek etkiyi göstermektedir.

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

$$\% \text{ ÇDYA} = 84.950 + 7.380 \cdot X_1 - 5.889 \cdot X_1^2 - 3.600 \cdot X_2 - 1.889 \cdot X_2^2 + 0.750 \cdot X_3 + 0.561 \cdot X_3^2 + 1.725 \cdot X_1 \cdot X_2 - 0.275 \cdot X_1 \cdot X_3 + 0.125 \cdot X_2 \cdot X_3$$

Tabloda gösterilen p değeri anlamlılık testi için gerekli bir değerdir. Bu değer Statistica 7.0 programı aracılığı ile F_{tablo} değerinin F_{hesaplanan} değeri ile kıyaslanması sonucunda bulunmuştur. Tabloda gösterilen p değerlerinin 0.01'den ve 0.05'den düşük olması katsayıların %99 ve %95 güven aralığında doğru (anlamlı) olduğunu göstermektedir.

Alabalık yağ asitlerinden ÇDYA'in eldesi için oluşturulan model denklemin korelasyon katsayısı (R²) 0.99 olarak bulunmuştur. Ayrıca deneysel değerler ve tahmin edilen değer arasındaki kalanlar toplamı 0.1076 olarak bulunmuştur. Korelasyon katsayısının 1'e yakın olması ve kalanlar toplamının neredeyse 0 olması oluşturulan model denklemin uygunluğunu desteklemektedir.

Sonuçlar

Yurdumuzda üretim potansiyeli büyük olan alabalık yağından üre fraksiyonlama yöntemi ile ÇDYA'ince zenginleştirilmiş ürün eldesinin koşulları optimize edilmiştir. Optimum koşullar olarak üre:yağ asitleri oranı 3.5, etanol:üre oranı 5.6 ve zaman 4.8 saat olarak belirlenmiştir. Bu optimum koşullarda içerisinde % 88.1 ÇDYA bulunan ürün elde edilebilecektir.

Belirlenen optimum koşulların literatürde yer alan benzer çalışmaların optimum sonuçları ile karşılaştırılması Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Elde edilen optimum koşulların literatürde yer alan benzer çalışmaların optimum değerleri ile karşılaştırılması

Değişkenler	I	II	III
Üre:YA oranı, ağ/ağ	3.5	3.0	4.5
Sıcaklık, °C	+4	-5	-10
Zaman, saat	4.8	20	24
ÇDYA, %	88.1	85.0	88.0

I: Alabalık yağ asitleri ile yapılan çalışma

II: Ton balığı yağ asitleri ile Liu ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışma

III: Ayıbalığı yağ asitleri ile Wanasundara ve Shahidi'nin (1999) yaptığı çalışma

Tablo 5'ten alabalık yağından diğer yağlardan elde edilen ürünlerin ÇDYA içerikleri seviye-

sinde ürünün çok daha kısa zamanda ve +4 °C’ de elde edilebileceği görülmektedir.

Bu çalışma ile alabalık yağı yağ asitlerinden gıda ve farmasötik amaçlar için sağlık değeri daha yüksek destek maddesi olarak kullanılabilir. ÇDYA’ce zengin ürün elde edilmiştir.

Kaynaklar

- Bektaş, İ., (2006). Tripalmitinin kaprik asit ile enzimatik asidolizi: Tepki yüzey metodolojisi ile reaksiyon koşullarının optimizasyonu, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Brown, A., (2000). Understanding food, fish and shellfish, *Wadsworth/Thomson Learning, USA*, 299-318.
- Hayes, D.G., (2002). Free fatty acid fractionation via urea inclusion compounds, *Inform*, **13**, 832-834.
- Lauritzen, L., Hansen, H. S., Jorgensen, M. H. ve Michaelsen K.F., (2001). The essentiality brain and retina, *Progress in Lipid Research*, **40**, 1-94.
- Liu, S., Zhang, C., Hong, P. ve Ji, H., (2006). Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: Optimization of process parameters, *Journal of Food Engineering*, **73**, 203-209.
- Luthria, D.L., (2001). Process for making an enriched mixture of polyunsaturated fatty acid esters, *European Patent Office*, Publication number WO/2001/051598
- Myers, R.H. ve Montgomery, D.C., (2002). *Response surface methodology process and product optimization using designed experiments*, John Wiley& Sons; Inc. Newyork.
- Neter, J Wassermann, W ve Whitmore, G.A., (1999). *Applied statistics*, Allyn and Bacon, Newyork.
- SanGiovanni, J.P., Parra-Cabrera, S., Colditz, G.A., Berkey, C.S., Dwyer, J.T., (2000). Meta-analysis of dietary essential fatty acids and long chain polyunsaturated fatty acids as they relate visual resolution acuity in healthy preterm infants, *Pediatrics*, **105**, 1292-1298.
- SanGiovanni, J.P., Berkey, C.S., Dwyer, J.T., Colditz, G.A., (2000). Dietary essential fatty acids, long chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: A systematic review, *Early Human Development*, **57**, 165-188.
- Senanayake, N.S.P.J. ve Shahidi, F., (2000). Concentration of docosahexaenoic acid from algal oil via urea complexation, *Journal of Food Lipids*, **7**, 51-61.
- Wanasundura, U.N. ve Shahidi, F., (1999). Concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions conditions, *Food Chemistry*, **65**, 41-49.
-
- Anonim, (2006). Obesity and overweight, World Health Organization. <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs311/en/print.html>.
- Anonim, (2007a). Cardiovascular diseases, World Health Organization. <http://www.who.int/mediacenter/factsheets/fs317/en/print.html>.
- Anonim, (2007b). Su ürünleri üretimini geliştirme projesi. <http://www.tugem.gov.tr>.