

Research Article

LİNOLEİK ASİDİN SAFLAŞTIRILMASINDA DÜŞÜK SICAKLIK KRİSTALİZASYON YÖNTEMİNİN ETKİNLİĞİ

Hakan Erinç^{ID}, İ. Hakkı İşler^{ID}, Fatma Salur^{ID}

Cite this article as:

Erinç, H., İşler, İ.H., Salur, F. (2019). Linoleik Asidin Saflaştırılmasında Düşük Sıcaklık Kristalizasyon Yönteminin Etkinliği. Food and Health, 5(1), 30-38. <https://doi.org/10.3153/FH19004>

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi,
Mühendislik Fakültesi, Gıda
Mühendisliği Bölümü, 51240 Niğde,
Türkiye

Submitted: 23.01.2018

Accepted: 30.03.2018

Published online: 14.08.2018

Correspondence:

Hakan ERİNÇ

E-mail: herinc@ohu.edu.tr

©Copyright 2019 by ScientificWebJournals

Available online at
<http://ifhs.scientificwebjournals.com>

ÖZ

Bu çalışmada linoleik asidin saflaştırılması amacıyla düşük sıcaklık kristalizasyon yönteminde farklı çözücülerin ve sıcaklıkların etkinliği araştırılmıştır. Bu amaçla aspir yağı sabunlaştırıldıktan sonra asitlendirilerek serbest yağ asitleri elde edilmiş, farklı çözücüler (petrol eter, izooktan, hekzan, aseton, izopropil alkol, metanol ve etanol) ve farklı sıcaklık değerleri (-40, -55 ve -70°C) kullanılarak linoleik asidin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, -70°C'de kristalleşmeyen fazın çözücü olarak aseton kullanımı ile %98.17 ±1.91 ve hekzan kullanımı ile %92.61 ±1.63 saflıkta linoleik asit içerdiği belirlenmiştir. Hekzan kullanımı ile verim %63.99 ±1.19 iken aseton kullanımında bu oran %47.60 ±1.38 olarak belirlenmiştir. Diğer çözücülerin ise aspir yağından düşük sıcaklık kristalizasyon yöntemi ile linoleik asidin saflaştırılmasında çok fazla etkin olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelime: Linoleik asit, Saflaştırma, Çözücü, Düşük sıcaklık kristalizasyon

ABSTRACT

EFFECTIVENESS OF LOW TEMPERATURE CRYSTALLIZATION METHOD FOR PURIFICATION OF LINOLEIC ACID

In this study, the efficiency of different solvents and temperatures was investigated in the low temperature crystallization method in order to purify linoleic acid. For this purpose, the safflower oil was saponified and then acidified to produce free fatty acids (FFA) solution. Purification of linoleic acids from FFA solution has been carried out by low temperature crystallization method. FFA solution in different solvents (petroleum ether, isooctane, hexane, acetone, isopropyl alcohol, methanol and ethanol) were crystallized at several temperatures (-40, -55 and -70°C). As a result of this study, it was determined that liquid phase contained 97.1 ±1.91 % linoleic acid using acetone and 92.61 ±1.63 % using hexane at -70°C. The yield was 63.99 ±1.19 % and 47.60 ±1.38 % with using hexane and acetone, respectively. Other solvents were not found to be very effective for the purification of linoleic acid by low temperature crystallization of safflower oil.

Keywords: Linoleic acid, Purification, Solvent, Low temperature crystallization

Giriş

Linoleik asit (LA) olarak adlandırılan 9,12 oktadekadienoik asit vücutta sentez edilememesinden dolayı insanlar için esansiyel yağ asitlerinden ve omega-6 (ω -6) yağ asidi olarak sınıflandırılır. LA, mısır yağı, aspir yağı, pamuk yağı ve benzeri tohum yağlarında bol miktarda bulunmaktadır. LA'dan karbon zincirinin uzaması ve çift bağ sayısının artması sonucu bir diğer esansiyel yağ asidi olan araşidonik asit meydana gelmektedir (Watkins, 1991). Diğer taraftan LA anti-kanserojen ve anti-obezite etkileri kanıtlanmış olan (Viladomia *vd.*, 2016; Fernie *vd.*, 2003; Riserus *vd.*, 2001) yine bir yağ asidi olan konjüge linoleik asit üretiminde başlangıç maddesi olarak kullanılmaktadır.

Omega yağ asitlerinin bağışıklık sisteminin güçlenmesi, beyin gelişimi, koroner kalp hastalıklarının önlenmesi gibi fonksiyonel özellikleri vardır. Bu yağ asitlerinin yetersizliklerinde artrit, bazı deri hastalıkları, astım, büyümede gerileme ve öğrenme eksikliği görülmektedir (Lewis *vd.*, 2000). Ayrıca bu yağ asitleri doğal kan inceltici olup, kalp krizine yol açabilen kan pıhtılaşmasını önleyebildiği bildirilmektedir. Bu yağ asitleri barsak sistemi boyunca uzanan hücrelerin yapısını etkilediği, besinlerin daha iyi ve alerjenlerin daha az emilimini sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca esansiyel yağ asitlerinin hayvanlarda kanser hücrelerini bloke ettiği birçok araştırma sonucunda belirlenmiştir (Leaf & Weber, 1988).

Son yıllarda gıda artıklarının değerlendirilmesi neredeyse gıdaların üretiminden daha önemli bir duruma gelmiştir. Artıkların değerlendirilmesi ile hem gıda sanayine hem de ülke ekonomisine önemli katkılar sağlanabilmiştir. Özellikle yağların kimyasal rafinasyonu esnasında serbest yağ asitlerinin giderilmesi (nötralizasyon) aşamasında ham maddeye bağlı olarak yağ asitlerinden oluşan sabun elde edilmektedir. Ayrıca yağ sanayi artıklarından bir diğeri olan küspe yaklaşık olarak %2-5 oranında yağ içermektedir. Bu örnekler diğere gıda ürünleri sanayinden de örnekler vermek mümkündür.

Gıda sanayi artıklarının önemli bir kısmı hayvan yemi olarak değerlendirilir. Oysaki bu artıklardan uygun yöntemler kullanılarak yağ elde edilebilir ve bu yağlardan da saflaştırma yoluyla serbest yağ asitlerinin eldesi ile gıda sanayine daha değerli yan ürünler üretilebilir. Gıda endüstrisinde ilgi konusu bir ürün olan yağ asitlerinin üretiminde düşük sıcaklıkta kristalleştirme (fraksiyone kristalizasyon) yöntemi kullanılmaktadır. Bu işlem yüksek erime noktalı bileşiklerin soğutma işlemi ile katılaştırılması yoluyla gerçekleştirilir (Gunstone *vd.*, 2012).

Serbest yağ asitlerinin erime sıcaklıkları yapısal özelliklerine bağlı olarak birbirlerinden farklıdır (Gunstone *vd.*, 2012; Akoh, 2005). Bu nedenle, düşük sıcaklıklarda, yüksek erime noktasına sahip yağ asitleri (doymuş yağ asitleri) kristalleşir ve düşük derecede erime noktası olan yağ asitleri (çoklu doymamış yağ asitleri) sıvı fazda kalırlar (Wanasundara *vd.*, 2005). Birkaç fraksiyonel kristalizasyon çeşidi arasında, çözücü fraksiyone kristalizasyon en sık kullanılan yöntemdir (Cunha *vd.*, 2009; Haraldsson, 1983). Çözücülerin bireysel kristal oluşumunu teşvik ettiği (Lee & Foglia, 2001) ve kristallerin verimini ve saflığını arttırdığı bildirilmektedir (Gunstone *vd.*, 2012).

Çözücü kullanılarak gerçekleştirilen kristalleşmeyi kontrol eden başlıca değişkenler şunlardır: (i) yağ bileşimi, (ii) kristalleşme sıcaklığı, (iii) yağdaki bileşenlerin çeşitliliği (çözücü polaritesinden etkilenir), (iv) yağ: çözücü oranı ve (v) soğutma oranı (Lopez-Martínez *vd.*, 2004). Yağ bileşimi, yalnızca doymamışlığın derecesine (doymuş, çoklu doymamış, tekli doymamış) değil aynı zamanda lipitlerin sınıfına, yani triaçilgliserol, serbest yağ asidi ya da ester olması durumuna bağlıdır. Aspir yağında bulunan yağ asitleri çeşitliliği triaçilgliserollerin heterojen bir bileşimine neden olur. Dolayısıyla, triaçilgliserollerin hidrolize edilmesi ya da esterleştirilmesi, fiziksel olarak daha kolay ayrılabilen serbest yağ asitleri ya da yağ asitleri metil/etil esterlerin üretilmesi için tercih edilir (Lembke, 2013). Vazquez & Akoh (2011), stearidonik asit (C18: 4 ω -3) eldesi için serbest yağ asitlerinin kullanımının, esterlerin kullanımından daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Kristalizasyon sıcaklığı ile ilgili olarak sıcaklığın düşmesi ile sıvı fraksiyonda çoklu doymamış yağ asidi konsantrasyonunun yükseldiğini gösteren birçok çalışma yapılmıştır (Rubio-Rodríguez *vd.*, 2010; Shahidi & Wanasundara, 1998; Wanasundara, 1996).

Bazı araştırmacılar (Lopez-Martínez *vd.*, 2004; Vazquez & Akoh, 2011; Wanasundara, 1996) yağ asitlerinin saflaştırılmasında organik çözücülerin (hekzan, aseton, dietil eter veya izobutanolün) etkinliğini incelemişlerdir. Vazquez & Akoh (2011) aynı zamanda hekzan ve aseton karışımlarını kullanmışlar ve yüksek konsantrasyonlara yalnızca hekzan kullanarak ulaşıldığını bildirmişlerdir. Öte yandan çözücü: yağ oranı ne kadar düşük olursa sıvı fazda düşük erime noktasına sahip fraksiyonun saflığının ve veriminin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Lopez-Martínez *vd.*, 2004; Vazquez & Akoh 2011). Bununla birlikte yüksek miktarda organik çözücü kullanımı ekonomik bir dezavantaja sahiptir. Dolayısıyla rafine yağın seçimi: çözücü oranı, sabit maliyeti ve istenen çoklu doymamış yağ asidi zenginleştirmesini dengeleyerek yapılmalıdır. Çoklu doymamış yağ asidi

konsantresi üretimi üzerinde çeşitli değişkenlerin etkisini araştırmak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların birinde çözücü ile serbest yağ asitleri arasındaki polarite farkın düşük sıcaklık kristalizasyon işlemi sırasında çok önemli olduğunu bildirmişlerdir (Vazquez & Akoh, 2011). Bu nedenle, sunulan bu çalışmada ω -6 yağ asidi olarak bilinen LA'nın saflaştırılması amacıyla düşük sıcaklık kristalizasyon yönteminde farklı polariteye sahip çözücülerin ve farklı sıcaklıkların etkinliği araştırılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma kapsamında kullanılan aspir yağı yerel bir marketten, 37 FAME (C₄-C₂₄) karışımı Supelco'dan (Bellefonte, PA, ABD) temin edilmiştir. Tüm çözücüler ve kimyasallar kromatografik saflıkta kullanılmıştır.

Aspir Yağının Hidrolizi

Yağ asitlerinin hidrolize edilmesinde Gunstone *vd.* (1976) tarafından belirtilen yöntem modifiye edildikten sonra kullanılmıştır. Bu amaçla 500 g aspir yağı 115 g potasyum hidroksit (400 mL etanolde) ve 125 mL saf su ile karıştırılmış ve 1 saat geri soğutucu altında mantolu ısıtıcıda (MTops MS-E104) kaynatılarak sabunlaştırılmıştır. 1 saat sonunda soğutma işlemi için içerisine 0,5 L buz eklenmiş, daha sonra üzerine 600 mL sülfürik asit (4 M) eklenerek pH 2-3 aralığına düşürülmüş ve ayırma hunisine alınıp faz ayrımı sağlanmıştır. Faz ayırımından sonra eter (2x100 mL) kullanılarak ekstraksiyon yapılmış olup ekstraksiyon işleminden sonra eter vakum altında rotary evaporatörde (Heidolph Hei-vap) uçurulup yine vakum altında 50°C'de 5 saat daha kalıntı eterin uçması sağlanmıştır. Bu sayede serbest yağ asitleri elde edilmiştir.

Düşük Sıcaklık Kristalizasyon Yöntemi ile Yağ Asitlerinin Saflaştırılması

Bu aşamada, Frankel *vd.* (1943) tarafından belirtilen yöntem modifiye edilerek kullanılmış olup bu amaçla hidrolize edilmiş yağ asitleri karışımı farklı polariteye sahip çözücüler (petrol eter, izooktan, hekzan, aseton, izopropil alkol, metanol ve etanol) içinde çözündürüldükten (50 g/L) sonra -40, -55 ve -70°C'deki derin dondurucuda çok yavaş şekilde karıştırılarak (24 saat) doymuş yağ asitlerinin kristalleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra kaba filtreden süzülerek elde edilen katı ve sıvı fazlar birbirlerinden ayrılmıştır. Böylece -40, -55 ve -70°C'de kristalleşen ve kristalleşmeyen yağ asitleri olmak üzere toplam 14 adet ürün elde edilmiştir. Tüm bu işlemler iki paralel olacak şekilde yürütülmüştür.

Yağ Asitlerinin Transesterifikasyonu ile Metil Esteri Eldesi

Christie (1989) tarafından bildirilen ve Kim & Liu (1999) tarafından değiştirilen yağ asitlerinin asidik ortamda transesterifikasyon yöntemi modifiye edilerek serbest yağ asitlerinin metil esterleri oluşturmuştur. Bu amaçla 2 mg örnek üzerine 0,125 mL %1'lik sülfürik asit (metanolde hazırlanmış) ilave edilmiş ve 70°C'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra üzerine %5'lik sodyum klorür çözeltisinden 0,150 mL ilave edilmiş ve 70°C'de 10 dk daha bekletildikten sonra ayırma hunisinde 15 mL hekzan ile 2 kez ekstraksiyon yapılmıştır. Hekzan fazı üzerine %4'lük 0,125 mL potasyum bikarbonat ilave edilip sodyum sülfat varlığında filtre edilerek yağ asitlerinin metil esterleri elde edilmiştir.

Yağ Asitlerinin Miktar ve İzomer Analizi

Hidrolize aspir yağının ve düşük sıcaklık kristalizasyonunda elde edilen ürünlerin metil esterleri elde edildikten sonra gaz kromatografi (Shimadzu GC-2010) cihazında DB-23 kapiler kolon (60 m uzunluk x 0,25mm iç çap, 0,25 µm film kalınlığı) kullanılarak yağ asidi bileşimleri belirlenmiştir. Kolon fırını, enjeksiyon bloğu ve dedektör (Alev iyonlaştırılmalı dedektör) sıcaklıkları sırasıyla 190, 230 and 240 °C olarak belirlenmiştir. Split oranı 80:1 olup taşıyıcı gaz olarak 1,0 mL/dk akış hızında helyum kullanılmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) paket programı kullanılmış olup ANOVA analizi uygulanmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Eksi 40°C'de gerçekleştirilen kristalizasyon işleminin sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur. Tablodan da görüldüğü üzere çözücü olarak petrol eter kullanıldığında -40°C'de yağ asitlerinin %15.24 ±0.76'sının katıldığı, %84.76 ±1.23'ünün katılmadığı gözlenmiştir. Katılan yağ asitlerinin ise diğer çözücülere oranla daha yüksek oranda palmitik asit (%40.53 ±2.03), stearik asit (%15.73 ±0,78) ve araşidik asit (%2.02 ±0.10) içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca katılmayan yağ asitlerinin %76.05 ±1.83 oranında LA'dan oluştuğu gözlenmiştir.

Petrol eter ile benzer polariteye sahip olan izooktan ve hekzan kullanımında da polaritesi yüksek çözücülere oranla -40°C'de katılmanın daha az olduğu (%22.96 ±1.14 ve %30.61 ±0.53) belirlenmiştir. Hekzanın çözücü olarak kullanımında -40°C'de katılan fazın diğerlerine oranla yüksek miktarda oleik asit (%57.07 ±1.85) içerdiği, katılmayan fazın ise %69.39 ±1.47 verimle %90.74 ±1.53 LA içeriğine sahip olduğu görülmektedir. İzooktan kullanımında ise katılmayan fazın ise %77.04 ±1.85 verimle %84.23

± 1.21 LA içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan petrol eter, izooktan ve hekzan'dan daha yüksek oranda polariteye sahip olan aseton kullanımında $\%59.33 \pm 1.96$ verimle $\%90.37 \pm 1.51$ saflıkta LA eldesi sağlanabilmiştir (Tablo 1).

Eksi 40°C 'de yağ asitlerinin en fazla katılma gösterdiği çözücü metanol olarak belirlenmiş olup, $\%51.18 \pm 1.55$ oranında kristal oluşumu gözlenmiştir. Katılan bu yağ asitlerinin yüksek oranda ($\%60.30 \pm 1.01$) LA içerdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde etanol kullanımında da yüksek oranda ($\%58.99 \pm 1.94$) LA içeren yağ asitlerinin $\%47.43 \pm 1.37$ verimle katıldığı belirlenmiştir. Etanol ve metanole benzer şekilde yüksek polariteye sahip izopropil alkol kullanımında da yağ asitlerinin neredeyse yarısının kristalleştiği ve yüksek oranda ($\%52.41 \pm 1.62$) LA içerdiği belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 2'den görüldüğü üzere çözücü olarak petrol eter kullanıldığında -55°C 'de yağ asitlerinin $\%19.92 \pm 0.99$, izooktan kullanıldığında ise $\%28.81 \pm 1.44$ oranında katıldığı gözlenmiştir. Katılan yağ asitlerinin ise diğer çözücülere oranla daha yüksek oranda doymuş yağ asitlerini içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca katılmayan yağ asitlerinin sırasıyla $\%76.80 \pm 1.84$ ve $\%83.28 \pm 1.16$ oranında LA'dan oluştuğu gözlenmiştir. Bu çözücülerle benzer polariteye sahip olan hekzan kullanımında da polaritesi yüksek çözücülere oranla -55°C 'de katılmanın az olduğu ($\%33.33 \pm 0.66$) ve katılmayan fazın $\%66.67 \pm 1.33$ verimle $\%91.14 \pm 1.55$ LA içeriğine sahip olduğu görülmektedir. Polaritesi nispeten yüksek olan aseton kullanımında ise $\%54.53 \pm 1.72$ verimle $\%92.44 \pm 1.62$ saflıkta LA eldesi sağlanabilmiştir. Bu sıcaklıkta en fazla katılma gösteren çözücü metanol olarak belirlenmiş olup -55°C 'de yağ asitlerinin $\%61.76 \pm 1.08$ oranında kristalleştiği gözlenmiştir. Katılan bu yağ asitlerinin yüksek oranda ($\%61.42 \pm 1.07$) LA içerdiği, benzer şekilde etanol kullanımında da yüksek oranda ($\%61.21 \pm 1.06$) LA içeren yağ asitlerinin $\%60.75 \pm 1.03$ verimle katıldığı belirlenmiştir. Etanol ve metanole benzer şekilde yüksek polariteye sahip izopropil alkol kullanımında da yağ asitlerinin neredeyse yarısının kristalleştiği ve $\%56.40 \pm 1.82$ oranında LA içerdiği gözlenmiştir. Bu sıcaklıkta gerçekleştirilen kristalizasyon işleminde araşidik asidin tüm çözücülerde kristalleştiği, palmitik ve stearik asidin ise petrol eter, izooktan, hekzan ve aseton kullanımında kristal oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Diğer sıcaklıklarda olduğu şekilde -70°C 'de en fazla kristalizasyon çözücü olarak polarite indeksi diğer çözücülere oranla daha yüksek olan metanol ($\%63.38 \pm 2.27$) ve etanol ($\%62.94 \pm 2.65$) kullanımında gerçekleşirken en düşük kristalizasyon ise polarite indeksi düşük olan petrol eter

($\%24.59 \pm 0.83$), izooktan ($\%31.49 \pm 1.07$) ve hekzan ($\%36.01 \pm 0.80$) kullanımı ile gerçekleşmiştir. Kristalleşmeyen sıvı fazın ise en yüksek LA içeriği çözücü olarak aseton kullanımı ile gerçekleşmiş olup saflık değeri $\%98.17 \pm 1.91$ olarak belirlenmiştir. Yüksek polariteye sahip olan izopropil alkol, etanol ve metanol kullanımında ise sırasıyla $\%80.95 \pm 1.07$, $\%79.34 \pm 1.86$ ve $\%80.30 \pm 1.22$ saflık değerlerinde ancak düşük verimde ($\%41.19 \pm 1.06$, $\%36.62 \pm 0.73$ ve $\%37.06 \pm 0.85$) LA eldesi sağlanmıştır. Kullanılan çözücülerin polaritesinin özellikle doymuş yağ asitlerinin kristalizasyonundan önemli bir etken olduğu, polarite farkının artmasıyla kristalize olan yağ asitleri miktarının arttığı belirlenmiştir. Nitekim Vazquez & Akoh (2011) çözücü ile serbest yağ asitleri arasındaki polarite farkının düşük sıcaklık kristalizasyon işlemi sırasında çok önemli olduğunu, çok düşük polariteli bir çözücü kullanımı ile doymuş yağ asitlerinin sıvı fraksiyonda çözünürlüğünün azaldığını ve işlemin seçiciliğinin arttığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan -70°C 'de gerçekleştirilen kristalizasyon işleminde doymuş yağ asitlerinin tamamı kristalleşmiş olup sıvı fazda tespit edilememiştir (Tablo 3). Bu durum düşük sıcaklık kristalizasyon işleminde sıcaklığın en önemli etkenlerden olduğunu ortaya koymaktadır ($P < 0.05$).

Çalışma kapsamında elde edilen veriler üzerinden yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, çözücü olarak kullanılan kimyasalların polarite indeks değerlerinin ve düşük sıcaklık kristalizasyon işleminde kullanılan sıcaklık değerlerinin istatistiksel olarak $P < 0.05$ düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir.

Literatürde bulunan bir araştırma sonucunda üre kristalizasyon yöntemi ile ayçiçek yağından $\%87.80$ oranında LA içeren ürün elde edilebileceği belirlenmiştir (Wu *vd.*, 2008). $\%76.4$ LA içeren aspir yağı kullanılarak üre kristalizasyon yöntemi ile LA eldesi sağlanan bir diğer çalışmada ise $\%95$ 'in üzerinde saflık değerine sahip ürün elde edilebildiği gözlenmiş olup LA konsantrasyonu yaklaşık olarak $\%25$ oranında artırılmıştır (Ma *vd.*, 1999). 1937'de yapılan bir çalışmada ise pamuk yağından $\%85$ 'in üzerinde saflık değerine sahip LA'nın, düşük sıcaklık kristalizasyon yöntemi ile çözücü olarak aseton ve -60°C sıcaklığa maruz bırakılması ile elde edildiği bildirilmiştir (Brown & Stoner, 1937). Sunulan bu çalışma sonuçlarından görüldüğü üzere düşük sıcaklık kristalizasyon yöntemi ile aspir yağından elde edilen yağ asitlerinin LA içeriği yaklaşık olarak $\%40-45$ oranında artırılarak $\%67,30$ LA içeren aspir yağından önceki çalışmalara oranla daha yüksek saflıkta ($\%98$) LA içeren bir ürün yaklaşık $\%47$ verimle elde edilmiştir.

Tablo 1. Eksi 40°C’de gerçekleştirilen kristalizasyon sonuçları**Table 1.** Crystallization results at -40 °C

Çözücü Solvent	Polarite İndeksi Polarity Index	Yağ asitleri Fatty Acids Aspir Yağı Safflower Oil	Palmitik Asit (%) Palmitic Acid	Stearik Asit (%) Stearic Acid	Oleik Asit (%) Oleic Acid	Linoleik Asit (%) Linoleic Acid	Linolenik Asit (%) Linolenic Acid	Araşidik Asit (%) Arachidic Acid	Verim (%) Yield
		Katı faz Solid phase	6.30±0.15	2.41±0.22	23.54±1.12	67.30±1.25	0.12±0.01	0.33±0.01	
Petrol eter Petroleum ether	0.01	Sıvı faz Liquid phase	40.53±2.03	15.73±0.78	26.39±1.32	15.29±0.76	0.05±0.00	2.02±0.10	15.24±0.76
		Katı faz Solid phase	0.15±0.01	0.01±0.00	23.03±1.15	76.05±1.83	0.13±0.07	0.03±0.00	84.76±1.23
İzooktan Isooctane	0.01	Sıvı faz Liquid phase	27.39±1.37	10.46±0.53	50.38±1.51	10.49±0.52	0.03±0.00	1.25±0.06	22.96±1.14
		Katı faz Solid phase	0.02±0.00	0.01±0.00	15.54±0.77	84.23±1.21	0.15±0.00	0.06±0.00	77.04±1.85
Hekzan Hexane	0.01	Sıvı faz Liquid phase	20.22±1.01	7.50±0.37	57.07±1.85	14.15±0.70	0.03±0.00	1.03±0.05	30.61±0.53
		Katı faz Solid phase	0.16±0.01	0.17±0.01	8.75±0.43	90.74±1.53	0.16±0.01	0.02±0.00	69.39±1.47
Aseton Acetone	3.55	Sıvı faz Liquid phase	15.31±0.77	5.84±0.29	44.41±1.22	33.64±1.68	0.02±0.01	0.77±0.03	40.67±1.03
		Katı faz Solid phase	0.12±0.01	0.06±0.00	9.23±0.46	90.37±1.51	0.19±0.01	0.01±0.00	59.33±1.96
İzopropil alkol Isopropyl alcohol	5.46	Sıvı faz Liquid phase	15.34±0.77	5.49±0.27	26.69±1.33	52.41±1.62	0.01±0.00	0.01±0.00	48.36±1.01
		Katı faz Solid phase	0.18±0.01	0.33±0.01	21.41±1.07	77.38±1.86	0.19±0.01	0.51±0.02	51.64±1.98
Etanol Ethanol	6.54	Sıvı faz Liquid phase	13.04±0.65	4.49±0.22	22.73±1.13	58.99±1.94	0.10±0.01	0.65±0.03	47.43±1.37
		Katı faz Solid phase	0.22±0.01	0.53±0.027	24.27±1.21	74.80±1.74	0.14±0.00	0.04±0.00	52.57±1.62
Metanol Methanol	7.62	Sıvı faz Liquid phase	12.10±0.61	4.63±0.23	22.30±1.11	60.30±1.01	0.04±0.00	0.63±0.03	51.18±1.55
		Katı faz Solid phase	0.22±0.01	0.09±0.00	24.84±1.24	74.64±1.73	0.21±0.01	0.01±0.00	48.82±1.44

TE, tespit edilemedi, Not detected

Tablo 2. Eksi 55°C’de gerçekleştirilen kristalizasyon sonuçları**Table 1.** Crystallization results at -55 °C

Çözücü Solvent	Polarite İndeksi Polarity Index	Yağ asitleri Fatty Acids Aspir Yağı Safflower Oil	Palmitik Asit (%) Palmitic Acid	Stearik Asit (%) Stearic Acid	Oleik Asit (%) Oleic Acid	Linoleik Asit (%) Linoleic Acid	Linolenik Asit (%) Linolenic Acid	Araşidik Asit (%) Arachidic Acid	Verim (%) Yield
		Katı faz Solid phase	6.30±0.15	2.41±0.22	23.54±1.12	67.30±1.25	0.12±0.01	0.33±0.01	
Petrol eter Petroleum ether	0.01	Sıvı faz Liquid phase	31.50±1.57	12.07±0.60	25.64±1.28	29.10±1.45	0.15±0.01	1.55±0.07	19.92±0.99
		Katı faz Solid phase	TE	TE	23.02±1.15	76.80±1.84	0.11±0.00	TE	80.08±1.00
İzooktan Isooctane	0.01	Sıvı faz Liquid phase	21.86±1.09	8.36±0.41	40.87±1.04	27.82±1.39	0.03±0.00	1.06±0.05	28.81±1.44
		Katı faz Solid phase	TE	TE	16.53±0.82	83.28±1.16	0.16±0.01	TE	71.19±3.56
Hekzan Hexane	0.01	Sıvı faz Liquid phase	18.62±0.93	6.91±0.36	53.85±1.69	19.62±0.98	0.03±0.00	0.97±0.04	33.33±0.66
		Katı faz Solid phase	TE	TE	8.39±0.41	91.14±1.55	0.16±0.01	TE	66.67±1.33
Aseton Acetone	3.55	Sıvı faz Liquid phase	13.78±0.69	5.30±0.26	43.00±1.15	37.15±1.85	0.07±0.00	0.70±0.03	45.47±1.27
		Katı faz Solid phase	TE	TE	7.31±0.36	92.44±1.62	0.16±0.01	TE	54.53±1.72
İzopropil alkol Isopropyl alcohol	5.46	Sıvı faz Liquid phase	12.48±0.62	4.58±0.22	26.43±1.32	56.40±1.82	0.02±0.00	0.61±0.04	50.28±1.51
		Katı faz Solid phase	0.05±0.00	0.21±0.01	20.62±1.03	78.32±1.91	0.22±0.01	TE	49.72±1.48
Etanol Ethanol	6.54	Sıvı faz Liquid phase	10.29±0.51	3.65±0.18	24.22±1.21	61.21±1.06	0.09±0.00	0.54±0.02	60.75±1.03
		Katı faz Solid phase	0.13±0.00	0.48±0.02	22.48±1.12	76.73±1.83	0.17±0.01	TE	39.25±0.96
Metanol Methanol	7.62	Sıvı faz Liquid phase	10.20±0.51	3.89±0.19	23.92±1.19	61.42±1.07	0.04±0.00	0.53±0.02	61.76±1.08
		Katı faz Solid phase	0.11±0.00	0.03±0.00	22.92±1.14	76.79±1.84	0.25±0.01	TE	38.24±0.91

TE, tespit edilemedi, Not detected

Tablo 3. Eksi 70°C’de gerçekleştirilen kristalizasyon sonuçları**Table 1.** Crystallization results at -70 °C

Çözücü <i>Solvent</i>	Polarite İndeksi <i>Polarity Index</i>	Yağ asitleri <i>Fatty Acids</i> Aspir Yağı <i>Safflower Oil</i>	Palmitik Asit (%) <i>Palmitic Acid</i>	Stearik Asit (%) <i>Stearic Acid</i>	Oleik Asit (%) <i>Oleic Acid</i>	Linoleik Asit (%) <i>Linoleic Acid</i>	Linolenik Asit (%) <i>Linolenic Acid</i>	Araşidik Asit (%) <i>Arachidic Acid</i>	Verim (%) <i>Yield</i>
Petrol eter <i>Petroleum ether</i>	0.01	Katı faz <i>Solid phase</i>	25.62±1.28	9.78±0.49	30.46±1.52	32.65±1.63	0.22±0.01	0.84±0.00	24.59±0.83
		Sıvı faz <i>Liquid phase</i>	TE	TE	21.28±1.06	78.60±1.93	0.09±0.01	TE	75.41±1.77
İzooktan <i>Isooctane</i>	0.01	Katı faz <i>Solid phase</i>	15.17±0.79	5.81±0.29	35.01±1.75	42.66±1.13	0.04±0.00	0.79±0.04	31.49±1.07
		Sıvı faz <i>Liquid phase</i>	TE	TE	16.41±0.77	82.77±1.24	0.18±0.01	TE	68.51±2.92
Hekzan <i>Hexane</i>	0.01	Katı faz <i>Solid phase</i>	17.46±0.87	6.69±0.34	51.99±1.60	22.33±1.11	0.03±0.00	0.91±0.05	36.01±0.80
		Sıvı faz <i>Liquid phase</i>	TE	TE	7.53±0.37	92.61±1.63	0.17±0.01	TE	63.99±1.19
Aseton <i>Acetone</i>	3.55	Katı faz <i>Solid phase</i>	12.01±0.61	4.60±0.23	42.91±1.15	39.26±0.96	0.09±0.01	0.61±0.03	52.40±1.62
		Sıvı faz <i>Liquid phase</i>	TE	TE	1.78±0.11	98.17±1.91	0.16±0.01	TE	47.60±1.38
İzopropil alkol <i>Isopropyl alcohol</i>	5.46	Katı faz <i>Solid phase</i>	10.69±0.55	4.05±0.20	27.39±1.37	57.74±1.88	0.02±0.00	0.57±0.01	58.81±1.94
		Sıvı faz <i>Liquid phase</i>	TE	TE	18.04±0.90	80.95±1.07	0.26±0.01	TE	41.19±1.06
Etanol <i>Ethanol</i>	6.54	Katı faz <i>Solid phase</i>	9.63±0.48	3.68±0.18	23.75±1.18	60.98±1.09	0.09±0.00	0.49±0.02	63.38±2.27
		Sıvı faz <i>Liquid phase</i>	TE	TE	23.15±1.15	79.34±1.86	0.18±0.01	TE	36.62±0.73
Metanol <i>Methanol</i>	7.62	Katı faz <i>Solid phase</i>	8.64±0.43	3.29±0.16	26.15±1.31	60.99±1.05	0.04±0.00	0.45±0.02	62.94±2.65
		Sıvı faz <i>Liquid phase</i>	TE	TE	19.49±0.82	80.30±1.22	0.31±0.02	TE	37.06±0.85

TE, tespit edilemedi, Not detected

Sonuç

Tüm bu sonuçlardan görüldüğü üzere çözücünün polaritesinin artmasına bağlı olarak tüm sıcaklıklarda kristalleşme daha yüksek oranlarda gerçekleşmekte ve sıvı fazın miktarı azalmaktadır. Diğer taraftan benzer polariteye sahip çözücüler (petrol eter, izooktan ve hekzan) kullanılarak farklı verimlerde ve farklı saflıkta LA eldesi sağlanmıştır. Bu durum kristalizasyon işleminde çözücünün polaritesinin en önemli etken olduğunu gösterse de sadece polarite farklılığı ile açıklanamamıştır. Ancak çözücünün polaritesinin artması ile yağ asitlerinin ortamda daha az çözüldüğü anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, nispeten yüksek polariteye sahip olan aseton ve apolar özellikli hekzan kullanımında yüksek saflıkta LA elde edilmiştir. Ancak son ürün verimi aseton kullanımında düşük, hekzan kullanımında ise yüksek bulunmuştur. Bu durum LA'nın saflaştırılmasında hekzanın oldukça etkin bir çözücü olduğunu göstermektedir. Sunulan bu çalışma sonucunda LA saflaştırılmasında çözücü olarak hekzan (50 g/L) ve sıcaklık olarak -70°C kullanımının yüksek saflıkta ve yüksek verimde ürün eldesine uygun olduğu tespit edilmiştir.

Etik Standart ile Uyumluluk

Çıkar çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal destek: Bu çalışma TÜBİTAK (Proje no: TOVAG 213O129) tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

Akoh, C.C. (2005.) Handbook of functional lipids, CRC Press, ISBN 10: 0-8493-2162-X.

Brown, J.B., Stoner G.G. (1937). Studies on the chemistry of the fatty acids. I. The purification of linoleic acid by crystallization methods. Journal of the American Chemical Society, 59, 3-6.

Christie, W.W. (1989). Gas chromatography and lipids, a practical guide, p. 65-68. Oily Press, Scotland, ISBN 0-9514171-0-X.

Cunha, D.C., Crexi, V.T., Pinto, L.A., De, A. (2009). Winterização de óleo de pescado via solvent. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 29, 207-213.

Fernie, C.E. (2003). Conjugated linoleic acid. In F. D. Gunstone (Ed), Lipids for functional food and nutraceuticals (p 291-318), U.K., The Oily Press, ISBN 9780857097965.

Frankel, J.S., Stoneburner, W., Brown, J.B. (1943). Studies on the chemistry of the fatty acids. XI. The isolation of linoleic acid from vegetable oils by low temperature crystallization. Journal of the American Oil Chemists' Society, 65 (2), 259-262.

Gunstone, F.D. Mclaughlan, J., Scrimgeour, C.M., Watson, A.P. (1976). Improved procedures for the isolation of pure oleic, linoleic, and linolenic acids or their methyl esters from natural sources. Journal of the Science of Food and Agriculture, 27, 675-680.

Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.J. (2012). The lipid handbook with CD-ROM, third ed. CRC Press, ISBN 9780849396885.

Haraldsson, G. (1983). Separation of saturated/unsaturated fatty acids. Journal of the American Oil Chemists' Society, 61, 219-222.

Kim, Y.J., Liu, R.H. (1999). Selective increase in conjugated linoleic acid in milk fat by crystallization. Journal of Food Science, 64, 792-795.

Leaf, A., Weber, P.C. (1988). Cardiovascular effects of ω -3 fatty acids. The New England Journal of Medicine, 318, 549-557.

Lee, K.T., Foglia, T.A. (2001). Fractionation of menhaden oil and partially hydrogenated menhaden oil: characterization of triacylglycerol fractions. Journal of the American Oil Chemists' Society, 78, 297-304.

Lembke, P. (2013). Production techniques for omega-3 concentrates. In: F., Meester, R.R., De Watson & S., Zibadi, (Eds.), Nutrition and health (p 353-364), Humana Press, Totowa, NJ, ISBN 978-1-62703-214-8.

Lewis N.M., Seburg, S., Flanagan, N.L. (2000). Enriched eggs as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids for humans. Poultry Science, 79, 971-974.

Lopez-Martínez, J.C., Campra-Madrid, P., Guil-Guerrero, J.L. (2004). Gamma linolenic acid enrichment from Borago officinalis and Echium fastuosum seed oils and fatty acids by low temperature crystallization. The Journal of Bioscience and Bioengineering, 97, 294-298.

Ma, D.W.L., Wierzbicki, A.A., Field, C.J., Clandinin, M.T. (1999). Preparation of conjugated linoleic acid from

- safflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 729-730.
- Riserus, U., Berglund, L., Vessby, B. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: A randomised controlled trial. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 25, 1129-1135.
- Rubio-Rodriguez, N., Beltran, S., Jaime, I., De, D.S.M., Sanz, M.T., Carballido, J.R. (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 1-12.
- Shahidi, F., Wanasundara, U.N. (1998). Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. *Trends Food Science Technology*, 9, 230-240.
- Vazquez, L., Akoh, C.C. (2011). Concentration of stearidonic acid in free fatty acid and fatty acid ethyl ester forms from modified soybean oil by winterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 1775-1785.
- Viladomiua, M., Hontecillasa, R., Bassaganya-Riera, J. (2016). Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *European Journal of Pharmacology*, 785, 87-95.
- Wanasundara, U.N. (1996). Marine oils: Stabilization, structural characterization and omega-3 fatty acid concentration (Doctoral thesis), Memorial University of Newfoundland.
- Wanasundara, U.N., Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F. (2005). Novel separation techniques for isolation and purification of fatty acids and oil by-products. In F. Shahidi (Ed), *Bailey's industrial oil and fat products* (p 585-621). John Wiley & Sons, Inc., ISBN 9780471678496.
- Watkins, B.A. (1991). Importance of essential fatty acids and their derivatives in poultry. *The Journal of Nutrition*, 121, 1475-1485.
- Wu, M., Ding, H., Wang, S., Xu, S. (2008). Optimizing conditions for the purification of linoleic acid from sunflower oil by urea complex fractionation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 677-684.