



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**HAMSİ (*Engraulis encrasicolus*) VE İŞLEME ATIKLARINDAN ELDE
EDİLEN PROTEİN HİDROLİZATLARININ BESLEYİCİ,
FONKSİYONEL VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sinan KOÇ

Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

Not: Tez kapağı yüksek lisans tezlerinde “Turkuaz”, doktora tezlerinde “Mavi” dir.

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**HAMSİ (*Engraulis encrasicolus*) VE İŞLEME ATIKLARINDAN ELDE
EDİLEN PROTEİN HİDROLİZATLARININ BESLEYİCİ,
FONKSİYONEL VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Sinan KOÇ

Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 05/09/2016

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Fatma ARIK ÇOLAKOĞLU

ÇANAKKALE

Sinan KOÇ tarafından Prof. Dr. Fatma ARIK ÇOLAKOĞLU yönetiminde hazırlanan ve **05/09/2016** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve İşleme Atıklarından Elde Edilen Protein Hidrolizatlarının Besleyici, Fonksiyonel ve Biyoaktif Özelliklerinin Araştırılması**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Fatma ARIK ÇOLAKOĞLU

Başkan

Prof. Dr. Emin YILMAZ

Üye

Doç. Dr. Nermin BERİK

Üye

Prof. Dr. Taçnur BAYGAR

Üye

Prof. Dr. Nuray ERKAN ÖZDEN

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu tez çalışması TAGEM/HSGYAD tarafından 14/A05/P06/71 numaralı projeden desteklenmiştir.

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Sinan KOÇ

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesi sürecinde, bilgi ve tecrübesiyle yolumu aydınlatan, pozitif yaklaşımıyla her türlü güçlüğü aşmamı sağlayan saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatma ARIK ÇOLAKOĞLU'na, tezimin tüm aşamalarını hassasiyetle takip ederek önerileri ve yönlendirmeleriyle çalışmama değer katan Sayın Prof. Dr. Emin YILMAZ ve Sayın Doç. Dr. Nermin BERİK hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın çeşitli aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve emekleri ile katkıda bulunan; Deniz Bilimleri ve Teknoloji Fakültesi'nden Sayın Dr. Hasan Basri ORMANCI'ya, ÇOMÜ Bilim ve Teknoloji Uygulama Merkezi çalışanlarına, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nden Sayın Prof. Dr. Ahmet YEMENİCİOĞLU'na ve başta Sayın Dane RUSÇUKLU hanımefendi olmak üzere Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezi teknik ekibine, çalışmamın büyük bölümünü yürüttüğüm Çanakkale Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü'nden başta Kurum Amiri Sayın Mustafa UÇAR olmak üzere Sayın Mehmet DİLER'e, Sayın Orhan TURAN'a ve burada isimlerini saymadığım tüm değerli mesai arkadaşlarıma saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın bir bölümünü destekleyen Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne ve çalışma materyalini temin eden Cansu Su Ürünleri Ltd. Şti.'ne saygı ve şükranlarımı sunarım.

Sevgi, hoşgörü ve destekleriyle çalışmama büyük katkı sağlayan sevgili eşime ve biricik kızıma, değerli anneme içten teşekkürlerimi sunarım.

Sinan KOÇ
Çanakkale, Eylül 2016

SİMGELER VE KISALTMALAR

A1, A2, A3	(Sırasıyla) 1, 2 ve 3 saatlik hidrolizle elde edilen atık hidrolizatı
ACE	Anjiotensin dönüştürücü enzim
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	Adenozin trifosfataz
AU	Anson birimi
BPH (FPH)	Balık protein hidrolizatı (Fish Protein Hydrolysate)
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
E1, E2, E3	(Sırasıyla) 1, 2 ve 3 saatlik hidrolizle elde edilen et hidrolizatı
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FSHU	(Japon) Gıdaların sağlıklı yaşam için kullanımı
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HA	Hippurik Asit
HACCP	Tehlike Analizleri ve Kritik Kontrol Noktaları
HD	Hidroliz Derecesi
HHL	N-Hippuril-His-Leu hidrat
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
kDa	Kilodalton
KM	Kuru madde
M	Molar
MWCO	Moleküler kütle ayırma sınırı
PTFE	Politetrafloroetilen polimer (Teflon)
RP	Ters faz
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezis
SSA	Sığır Serum Albümini
TCA	Triklor asetik asit
TGK	Türk Gıda Kodeksi
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

HAMSİ (*Engraulis encrasicolus*) VE İŞLEME ATIKLARINDAN ELDE EDİLEN PROTEİN HİDROLİZATLARININ BESLEYİCİ, FONKSİYONEL VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sinan KOÇ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Fatma ARIK ÇOLAKOĞLU

05/09/2016, 123

Çalışmamız, çöpe atılan hamsi işleme atıklarının protein hidrolizi ile değerlendirilme potansiyelini araştırmak amacıyla tasarlanmıştır. Karşılaştırma amaçlı olarak hamsi eti hidrolizatları da üretilerek incelenmiştir.

Çalışma kapsamında hamsi (*Engraulis encrasicolus*), marinata işlenecek şekilde ayıklanmış, et ve atık olmak üzere iki grup çalışma materyali elde edilmiştir. Her iki grup materyal, Alcalase® enzimi kullanılarak üç farklı sürede (1, 2 ve 3 saat) protein hidrolizine tabi tutulmuş; elde edilen hidrolizatların besleyici, fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri incelenmiştir. İncelenen bu özelliklere, hidroliz süresi ve materyal tipinin etkisi ile birlikte biyoaktif özellikler için ultrafiltrasyon uygulamasının etkisi de araştırılmıştır.

Hamsi işleme atıklarından üretilerek kurutulan hidrolizatların %75 protein içerdiği ve bu proteinlerin %46'sının esansiyel amino asitlerden oluştuğu tespit edilmiştir. Besleyici özelliğinin yanı sıra atık hidrolizatlarının emülsifiye edici, köpük oluşturucu, su ve yağ tutucu özellikleri ile gıda katkı maddesi olarak kullanılma potansiyeli bulunduğu belirlenmiştir. Biyoaktif özellikler açısından atıklardan elde edilen hidrolizatların 1 mg/ml konsantrasyonda; %60 ACE inhibisyonu, %21 DPPH temizleme ve %59 Fe⁺² şelatlama aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu özelliklerle, farmakolojik alanda da yüksek seviyede kullanım potansiyelinin bulunduğu görülmüştür.

Anahtar sözcükler: Hamsi, Alcalase®, Balık Protein Hidrolizatı, Fonksiyonel Özellikler, Biyoaktif Özellikler, ACE İnhibisyonu, DPPH Temizleme Aktivitesi, Şelatlama Aktivitesi.

ABSTRACT

A STUDY ON NUTRITIONAL, FUNCTIONAL, AND BIOACTIVE PROPERTIES OF PROTEIN HYDROLYSATES FROM ANCHOVY (*Engraulis encrasicolus*) FLESH AND BY-PRODUCTS

Sinan KOÇ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Fishing and Fish Processing Technology

Advisor: Prof. Dr. Fatma ARIK ÇOLAKOĞLU

05/09/2016, 123

Our study was designed to investigate the potential of utilization of trashed anchovy processing by-products by hydrolysis of proteins. Also, the anchovy flesh protein hydrolysates were produced and examined for comparison purposes.

In this context; heads, viscera, and backbones were removed from whole anchovies (*Engraulis encrasicolus*) and two study materials (flesh and by-products) were obtained. Both material groups were subjected to protein hydrolysis by using the Alcalase enzyme at three different periods (1, 2 and 3 hours). Nutritional, functional and bioactive properties of the obtained hydrolysates were determined. Effects of the hydrolysis periods and material types on examined properties were investigated. On the bioactive properties, effect of ultrafiltration was also investigated.

It was determined that by-product hydrolysates lyophilised contain 75% protein which consists of 46% essential amino acids. It was found to have utilization potential as food additive of these hydrolysates having emulsifying, foaming, water holding and oil absorption properties in addition to their nutritional properties. In respect to the bioactive properties of the hydrolysates obtained from the anchovy by-products at 1 mg/ml concentration; they have been found to possess 60% ACE inhibition activity, 21% DPPH scavenging activity and 59% Fe⁺² chelating activity. It has been found that potential use of high level of these hydrolysates having nutraceutical effects for protection and improvement of human health.

Keywords: Anchovy, Alcalase®, Fish Protein Hydrolysate, Functional Properties, Bioactive Properties, ACE Inhibition, DPPH Scavenging Activity, Chelating Activity.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Balık Proteinleri ve Temel Özellikleri	4
2.1.1. Miyofibriller Proteinler	4
2.1.2. Sarkoplazmik Proteinler.....	6
2.1.3. Stroma Proteinleri.....	6
2.2. Enzimler	7
2.3. Balık Protein Hidrolizi	10
2.3.1. Kimyasal Yöntemle Balık Protein Hidrolizi	10
2.3.2. Biyokimyasal Yöntemlerle Balık Protein Hidrolizi	12
2.4. Balık Protein Hidrolizatlarının (BPH) Özellikleri	19
2.4.1. Balık Protein Hidrolizatlarının Besleyici ve Duyusal Özellikleri.....	19
2.4.2. Balık Protein Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özellikleri.....	21
2.4.3. Balık Protein Hidrolizatlarının Biyoaktif Özellikleri	25
2.5. Balık Protein Hidrolizatlarının Kullanımı ve Karşılaşılan Güçlükler	31
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT	33
3.1. Materyal.....	33
3.2. Yöntem	33
3.2.1. Deneme Planı	33
3.2.2. Hidroliz	35
3.2.3. Yürütülen Ölçüm ve Analizler	39
3.2.4. Anket Çalışması	52

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi	52
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	54
4.1. Balık Materyaline Ait Bulgular	54
4.1.1. Biyometrik Ölçümlere Ait Bulgular	54
4.1.2. Makro Besin Bileşenleri	55
4.1.3. Mineral Kompozisyonu	56
4.1.4. Amino Asit Kompozisyonu	58
4.1.5. Biyojen Aminler	59
4.1.6. SDS-PAGE.....	60
4.2. Hidrolizatların Tanımlayıcı ve Besleyici Özelliklerine Ait Bulgular	61
4.2.1. Hidroliz Derecesi (HD).....	63
4.2.2. Makro Besin Bileşenleri	64
4.2.3. Mineral Kompozisyonu	68
4.2.4. Amino Asit Kompozisyonu	70
4.2.5. Biyojen Aminler	75
4.2.6. SDS-PAGE.....	77
4.3. Hidrolizatların Fonksiyonel Özelliklerine Ait Bulgular	79
4.3.1. Hidrolizatların Protein Çözünürlüğü	79
4.3.2. Hidrolizatların Emülsifikasyon Aktivitesi	80
4.3.3. Hidrolizatların Köpük Oluşturma Özellikleri	82
4.3.4. Hidrolizatların Yağ ve Su Tutma Özellikleri	84
4.4. Hidrolizatların Biyoaktif Özelliklerine Ait Bulgular	85
4.4.1. Hidrolizatların ACE İnhibisyon Aktivitesi	86
4.4.2. Hidrolizatların Antioksidan Aktivitesi	89
4.5. Yürütülen Anket Çalışmasına Ait Bulgular	97
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	100
5.1. Sonuçlar	100
5.2. Öneriler	104
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Proteazların sınıflandırılması (Kumar ve ark., 2008)	8
Şekil 2.2. Protein hidroliz yöntemleri (Kristinsson ve Rasco, 2000b)	10
Şekil 2.3. Alkali protein hidrolizinde oluşabilecek bileşikler (Kristinsson ve Rasco, 2000b)	12
Şekil 2.4. Enzimatik balık protein hidrolizatı üretimi genel akış şeması	14
Şekil 2.5. Renin anjiyotensin sistemi (Wilson ve ark., 2011)	27
Şekil 3.1. Hamsi (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	33
Şekil 3.2. Deneme Planı	34
Şekil 3.3. Hamsinin ayıklanması ile hazırlanan atık ve et materyalleri	36
Şekil 3.4. Atık materyalin hidroliz için homojenizasyonu	36
Şekil 3.5. Hidroliz reaktörü	37
Şekil 3.6. Santrifüj sonrası hidroliz karışımındaki fazların görüşü. Soldaki fotoğrafta; (A) yağ, (B) düşük yoğunluklu partiküllerin oluşturduğu zar, (C) çözülmüş protein karışımından oluşan hidrolizat, (D) çözünmemiş katı kısım	38
Şekil 3.7. Kurutulmuş atık ve et hidrolizatları	38
Şekil 3.8. SDS-PAGE sistemleri. Soldan sağa; mini jel, maksijel dikey elektroforez sistemi ve görüntüleme cihazı	43
Şekil 3.9. Üreticisi tarafından beyan edilen marker protein bantlarının dizilimleri	44
Şekil 3.10. Albümin (SSA) ile çizilen protein kalibrasyon kurvesi ($\lambda=660$ nm)	45
Şekil 3.11. Hippurik asit kalibrasyon eğrisi	48
Şekil 3.12. ACE reaksiyon karışımının hazırlanması ve inkübasyonu	49
Şekil 3.13. Anket formu	53
Şekil 4.1. Hamsi materyalinin biyometrik ölçüm sonuçları	54
Şekil 4.2. Balık eti ve atıklarında makro besin bileşenlerinin dağılımı	55
Şekil 4.3. Et ve atık materyalde >1 mg/kg düzeyindeki mineraller	58
Şekil 4.4. Balık eti ve atıklarında putresin, kadaverin ve histamin değerleri (mg/kg)	60
Şekil 4.5. Balık eti ve atık proteinlerinin SDS-PAGE mini jelde görüntüleri. (A) orijinal görüntü, (B) görüntüleme cihazı ile alınan görüntü ve marker baz alınarak cihaz tarafından atanan molekül ağırlıkları. (1. marker, 2. tuz solüsyonu ile ekstrakte edilen et, 3. fosfat buffer ile eksakte edilen et, 4. SDS solüsyonu ile ekstrakte edilen et; 5, 6 ve 7 aynı sıralamadaki solüsyonlarla ekstrakte edilen atıklar)	61
Şekil 4.6. Hidrolizatların hidroliz süreleri bazında hidroliz dereceleri	63
Şekil 4.7. Sıvı ve kurutulmuş hidrolizatların % kuru madde (%KM) değerleri	65
Şekil 4.8. Hidroliz süresince sarf edilen 2N NaOH çözeltisinin hidrolizat grupları bazında ortalama dağılımı	67
Şekil 4.9. Et ve atık materyalleri ile bunlara ait hidrolizatlarda yüksek düzeyde bulunan minerallerin dağılımı	69
Şekil 4.10. Toplam amino asitlerin dağılımı (A: et materyali ve et hidrolizatları ortalaması; B: atık materyali ve atık hidrolizatları ortalaması)	72
Şekil 4.11. Hamsi et ve atıkları ile hidrolizatlarında serbest amino asitlerin % dağılımı ...	73
Şekil 4.12. Hidrolizatların farklı yaş grupları için önerilen aminoasit ihtiyacını karşılama durumu	75
Şekil 4.13. Farklı hidrolizat çözeltilerinin SDS-PAGE görüntüleri. M- ultra low molecular weight marker; E- et hidrolizatları, A- atık hidrolizatları; 1, 2 ve 3- hidroliz süreleri (saat)	78
Şekil 4.14. Hidrolizatlardaki proteinlerin molekül ağırlık dağılımları	78

Şekil 4.15. Et ve atık hidrolizatlarının protein çözünürlüğü (%).....	80
Şekil 4.16. Hidrolizatlarının emülsifiye aktivite indeksi değerleri (m ² /g)	81
Şekil 4.17. Hidrolizatların emülsiyon stabilite indeksi değerleri (dk.)	81
Şekil 4.18. Hidrolizatların köpük genişleme özelliği (%)	83
Şekil 4.19. Hidrolizatların köpük stabilitesi özelliği (%)	83
Şekil 4.20. Captopril etken maddesinin konsantrasyona bağlı %ACE inhibisyonu grafiği	86
Şekil 4.21. Hidrolizatların ACE inhibisyon aktivitesi IC ₅₀ konsantrasyonları (mg/ml)	88
Şekil 4.22. Trolox maddesinin konsantrasyona bağlı %DPPH temizleme aktivitesi	90
Şekil 4.23. Hidrolizatların %DPPH temizleme aktivitesi (1mg hidrolizat/ml, KM bazında)	92
Şekil 4.24. EDTA'nın konsantrasyona bağlı % Fe ⁺² şelatlama aktivitesi	94



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Amino asit tüketiminde önerilen referans model (FAO, 1985).....	41
Çizelge 3.2. Biyojen amin analizi gradient solvent akış programı	42
Çizelge 4.1. Hamsi örneklerine ait protein ve yağ içerikleri	56
Çizelge 4.2. Balık eti ve atıklarında mineral seviyeleri (mg/kg)	57
Çizelge 4.3. Balık eti ve atıklarında kuru madde bazında toplam ve serbest amino asit kompozisyonu	59
Çizelge 4.4. Balık eti ve atıklarının SDS-PAGE çalışmalarında elde bulgular	62
Çizelge 4.5. Kurutulmuş hidrolizatların KM bazında makro besin bileşenleri	65
Çizelge 4.6. Balık eti ve atık hidrolizatlarında mineral kompozisyonu (mg/kg).....	68
Çizelge 4.7. Balık eti ve atık hidrolizatlarında toplam amino asit değerleri (KM'de g/100g hidrolizat).....	71
Çizelge 4.8. Balık eti ve atık hidrolizatlarında serbest amino asit değerleri (KM'de mg/100g hidrolizat).....	71
Çizelge 4.9. Farklı yaş grupları için önerilen amino asitler ve bu amino asitlerin hidrolizatlardaki miktarları (mg/g protein).....	74
Çizelge 4.10. Sıvı hidrolizatların putresin, kadaverin ve histamin seviyeleri (mg/kg)	76
Çizelge 4.11. Hamsi et ve atıkları ile hidrolizatlarına ait biyojen amin değerleri (KM'de mg/kg)	76
Çizelge 4.12. Hidrolizatların yağ ve su tutma kapasiteleri	85
Çizelge 4.13. Hidrolizatların KM bazında ACE inhibisyonu aktivitesinin yüzde (%), Captopril eşiti ve IC ₅₀ değerleri	87
Çizelge 4.14. Hidrolizatların KM bazında yüzde (%) ve trolox eşiti olarak DPPH temizleme aktiviteleri.....	91
Çizelge 4.15. Hidrolizatların KM bazında IC ₅₀ ve EDTA eşiti olarak Fe ⁺² şelatlama aktiviteleri.....	95
Çizelge 4.16. Hidrolizatların DPPH temizleme ve Fe ⁺² şelatlama aktivitelerinin karşılaştırılması	96
Çizelge 4.17. Balık işleme atıklarından elde edilen ürünlere tüketicilerin yaklaşımı	98

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Hayvansal kaynaklı proteinler, içerdikleri esansiyel amino asitler nedeniyle diyetlerin vazgeçilmez unsurudur. Dünyada tüketilen hayvansal proteinin %16,7'si, tüm tüketilen proteinlerin ise %6,5'i balıktan karşılanmaktadır. Sağlıklı beslenme bilincinin gelişmesi, dağıtım kanallarının yaygınlaşması ve ulaşılabilir fiyatı ile yıllık su ürünleri tüketimi son 50 yılda 9,9 kilogramdan 19,2 kilografa çıkmıştır. Nüfus artışından daha yüksek artışa sahip toplam su ürünleri talebinin; 2012 yılı verilerine göre 91,3 milyon tonu avcılıktan, 66,6 milyon tonu ise yetiştiricilikten karşılanmıştır (FAO, 2014). Avlanan türlerin stokları hızla tüketilirken su ürünlerine olan talebi karşılamak üzere hızla büyüyen bir sektör olarak kültür balıkçılığının, önemli çevre sorunlarına sebep olacağı ve zaten baskı altındaki vahşi türler için tehdit oluşturacağı yönündeki kaygılar da giderek artmaktadır (Tidwell ve Allan, 2001). Dolayısıyla talep edilen miktarda su ürünleri üretimini arttırmak, sürdürülebilir balıkçılık yaklaşımıyla ve ekosistemi koruma gayretleriyle sınırlanmaktadır. Bu açıdan tüm gıda ürünlerinde olduğu gibi balıkçılık ürünlerinde de hammaddeden son ürüne değin elde edilen materyalin en etkin şekilde kullanımı ve atıkların azaltılması ve/veya maksimum faydayı veren katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi büyük önem arz etmektedir.

Dünya balıkçılık üretiminin insan tüketimine ayrılan kısmının %46'sı taze-soğutulmuş olarak pazarlanmakta, kalan %54'lük kısım (yaklaşık 75 milyon ton) ise çeşitli teknolojik işlemlerle dayanıklı yeni ürün formunda tüketiciye sunulmaktadır (FAO, 2014). Su ürünleri işlemeciliğinde hammaddenin yapısına ve kullanılan teknolojiye bağlı olarak önemli miktarda atık ortaya çıkmaktadır. Baş, iç organlar, omurga, deri, yüzgeç, kırpıntı et ve kabuk gibi vücut bölümlerinden oluşan ve birincil üretimde kullanılmayan bu atıkların oranı çift kabuklu yumuşakça işlemeciliğinde %20-50, eklem bacaklı işlemeciliğinde %50-60, balık fileto-kürleme-tuzlama-tütsüleme üretiminde %50-75 ve konserve balık üretiminde ise %30-65 kadar olabilmektedir (Waldron, 2007; Shirai ve Ramirez-Ramirez, 2011). Avrupa Birliği ülkelerindeki su ürünleri işlemeciliğinden her yıl yaklaşık 5,2 milyon ton katı atık çıkmakta, bu atıkların 3 milyon ton gibi büyük bölümü fileto çıkarma, tuzlama, tütsüleme yapan işletmelerden gelmektedir (Ferraro ve ark., 2010). Hamsi işlemeciliği sırasında da baş, iç organlar ve omurga kısmı işleme atığı olarak ayrılmaktadır. Hamsi gibi küçük pelajik türlerde iç organlar, baş ve kuyruk toplamı, balığın yaklaşık %27'sine denk gelmekte; deri, kemikler, kan ve omurganın oluşturduğu diğer atıklar ise balığın %25'ini oluşturmaktadır (Ferraro ve ark., 2010). Bu rakamlarla uyumlu olarak Çanakkale'de hamsi (marinat) işleyen

tesis yetkilileri %50 verimle çalıştıklarını, hammadde hamsi kütlesinin yaklaşık yarısının atık olarak ayrıldığını ve bertaraf edildiğini beyan etmektedirler.

Dünya genelinde her yıl amaç dışı avlanan türler ve işleme atıklarından oluşan yaklaşık 20 milyon ton balıkçılık ürünü hiç kullanılmadan bertaraf edilmekte, bu miktar yıllık avcılık üretiminin %25'ine denk gelmektedir. Bu durum, beslenme açısından değerli besin bileşenlerinin kaybına ve ekonomik açıdan maliyet artışına neden olmaktadır (Rustad, 2007). Öte taraftan zengin organik madde içeriğine sahip su ürünleri işleme atıklarının çöp olarak atılması, çevre açısından da problem yaratmaktadır. (Kim ve Mendis, 2006; Hayes ve McKeon, 2014). Arıtma işleminden geçirilmeyen atıkların kontrolsüz biyodegradasyonu ile çevre açısından tehlikeli metan ve toksik bileşiklerin oluşumu söz konusu olmakta, ayrıca güçlü bir koku ile duyuusal problem ortaya çıkmaktadır (Waldron, 2007; NOAA).

Etkin bir gıda üretiminde öncelikle üretim sırasında atıkların azaltılması amaçlanmakta, bunun yanı sıra ortaya çıkan atık materyalin geri kazanılması yani yeni ürünlerin üretimi de önem kazanmaktadır (Waldron, 2007). Atıkların başka bir işleme tekniğinde hammadde olarak kullanımı, bu ürünlerin sistemden uzaklaştırma maliyetinin azaltılması ve sektöre ilave gelir kazandırma potansiyeli açısından ilgi çekmektedir (Arvanitoyannis ve Kassaveti, 2008). Yağ, protein, kollajen, enzim ve mineraller gibi değerli bileşenlerin balık işleme atıklarından geri kazanılması, gelişen teknolojilerle birlikte biyoaktif özelliklerde yeni bileşiklerin elde edilmesi ve bunların endüstriyel sistemlerde girdi olarak kullanılması, bugün çöp olarak nitelendirilen materyalden yüksek kazanç elde edilmesine olanak verebilmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000a; Geirsdóttir, 2005; Arason ve Ark., 2009).

Ülkemizde balıkçılık üretimi toplam olarak 537 bin 345 ton olarak gerçekleştirilmekte, avlanan deniz balıklarının (231 bin ton) %42'sini ise hamsi (96 bin ton) oluşturmaktadır (TUİK, 2015a). Büyük oranda Karadeniz'den avlanan hamsinin (*Engraulis encrasicolus*), 2014 yılı verilerine göre %62'sinin insan tüketimine sunulduğu, %38 gibi önemli bir bölümünün de hayvan yemi üretiminde kullanılmak üzere düşük değerli balık ununa işlendiği bildirilmektedir (TUİK, 2015b). Bunun yanı sıra su ürünlerinden gıda üretimi sırasında ortaya çıkan ve tüketimde kullanılmayan atıkların büyük bölümünün de çöp olarak atıldığı ifade edilmektedir. Hamsi işleyen tesislerde hammadde balığın yaklaşık yarısı işleme atığı olarak ayrılmakta ve bertaraf edilmektedir. Bu atıklarla beraber %11-15 düzeyinde protein de çöpe atılmaktadır. Amino asit kompozisyonu ve kolay sindirimi ile "kaliteli" proteine sahip olan balık etinin ülkemiz adına öncelikli olarak hamsi kapsamında değerlendirilmesi gereği, elzem bir durum olarak ortaya çıkmaktadır.

Ülkemizde su ürünleri işleme atıklarının değerlendirilme olanakları konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Atıklardaki protein içeriğinin geri kazanılması ve aynı zamanda özellikleri değiştirilerek değerli ürünlere dönüştürülmesi enzimatik protein hidrolizi ile mümkün olmaktadır. Son yıllarda bu yolla elde edilen balık protein hidrolizatlarının ortaya konulan özellikleri dikkati çekmekte; gıda, yem ve eczacılık endüstrisi tarafından yakından takip edilmektedir. Yapılan literatür araştırmalarında, bu tezin çalışma materyali olan hamsi etinde ve atıklarında yürütülen hidroliz ve elde edilen hidrolizatın özellikleri konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışması; yukarıda ifade edilen problemlerin çözümüne katkı yapmak amacıyla, gıda kaynaklarının verimli kullanılması adına yürütülen çalışmaların bir parçası olarak tasarlanmıştır. Çalışmanın temel amacı; hiçbir şekilde değerlendirilmeyerek çöpe atılan hamsi işleme atıklarının, protein hidrolizi yoluyla değerlendirilme potansiyelini araştırmaktır. Bu amaca bağlı olarak incelenen özellikler bakımından hamsi atıklarından elde edilen hidrolizatların durumu, hamsi eti hidrolizatları ile karşılaştırılarak ortaya konulmuştur. Çalışma kapsamında Alcalase® enzimi kullanılarak elde edilen hamsi et ve atık hidrolizatlarının; takviye edici gıda ve gıda katkı maddesi olarak kullanım olanakları (besleyici ve fonksiyonel özellikleri) araştırılmış, aynı zamanda sağlıkla ilgili kullanımına yönelik veri oluşturmak amacıyla biyoaktif özellikleri ortaya konmaya çalışılmıştır. Araştırma sonucunda elde edilen verilere ek olarak, tüketici anketi çalışması da gerçekleştirilmiştir. Çalışma materyalinin gıda işleme atığı, kullanıcının da insan olması nedeniyle tüketicilerin bu konudaki görüşlerinin, çalışmanın endüstriyel boyutunu tamamlayacağı düşünülmüştür.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Balık Proteinleri ve Temel Özellikleri

Proteinler; karbon, hidrojen, oksijen, azot ve genellikle kükürt içeren amino asitlerin peptit bağları ile bir araya gelmeleri sonucu oluşan kompleks organik bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Bitki ve hayvan hücre protoplazmalarının temel bileşeni olan proteinler 20 farklı aminoasitten oluşur (Li-Chan, 2004). Yan zincirlerinde yer alan fonksiyonel grupların (R) kimyasal yapısına göre farklı özellikler sergileyen bu amino asitlerin oranı, sayısı ve dizilimleri proteinin birincil yapısının özelliklerini belirlemektedir (Zubay ve ark., 1995). Genel anlamda hayvan etleri, içerdikleri protein miktarı ve amino asit kompozisyonu bakımından birbirlerine benzerlik göstermektedir. Bununla beraber balık eti ile kara hayvanlarının etleri arasında bağ doku açısından farklılık bulunmakta, balık kası daha az bağ doku içerdiğinden eti daha yumuşak olmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000b; Helfman ve Ark., 2009).

Balık etinin ana bileşenleri; su, protein ve yağdan oluşmaktadır. Sudan sonra ikinci büyük miktara sahip olan proteinin oranı genel olarak %15-20 arasında değişmekte, ortalama olarak ise %17 civarında bulunmaktadır (Huss, 1988; Murray ve Burt, 2001; Ninan, 2003; Nunes, 2011). Protein olmayan azotlu bileşiklerin (serbest amino asitler, peptitler, aminler, amin oksitler, guadinler, kuvaterner amonyum bileşikleri, poliaminler, nükleotidler ve onların yıkım ürünleri, üre ve nükleik asitler) protein değerine katkısı ise %25 kadar olabilmektedir (Shahidi, 1994).

Balık eti proteinleri, suda çözünebilme karakterine göre üç gruba ayrılmaktadırlar. Bunlar; miyofibriller, sarkoplazmik ve stroma (bağ doku) proteinleridir (Xiong, 2004)

2.1.1. Miyofibriller Proteinler

Tüm proteinlerin %70-80'ini oluştururlar. Memelilerde bu oran %40 civarındadır. Suda çözünmezler, yalnızca yüksek iyonik güçte ($\geq 0,5$ M) nötral tuz solüsyonlarında çözünürler (Huss, 1988, Tülsner 1994). Miyofibriller proteinlerin ana bileşenleri miyozin, aktin, tropomiyozin, troponin C, I ve T' dir. Bunlar temel olarak kasın kasılmasında görev alırlar (Ninan, 2003). Esas olarak enzimatik protein hidrolizinde yıkıma maruz kalan miyofibriller proteinler (Kristinsson ve Rasco, 2000b), kontrollü ısıtma-soğutma prosedürleri ile denatüre ve koagüle olurlar. Böylece kas dokuda yeni bir yapı, tekstür ve sertlik oluştururlar (Tülsner, 1994).

Miyozin, balık kasında en fazla bulunan proteindir. Miyofibriller proteinlerin %50-60'ını, toplam proteinlerinin ise %38'ini oluştururlar. Yaklaşık 4500 amino asitten oluşan miyozinin molekül ağırlığı yaklaşık 500 (480-540) kilodaltondur (Kristinsson ve Rasco, 2000b; Tejada, 2001; Xiong, 2004; Vercruyssen ve Ark., 2005). Yapısal olarak, ATPaz aktivitesine sahip globüler bir baş kısmı ve ATP moleküllerinin bağlandığı filament kısmı mevcuttur. Sahip olduğu ATP ve ATPaz'lar sayesinde miyozin, aynı anda bir enzim ve bir fibröz protein olarak davranabilmektedir. Balık etinin jelleştirilmesi prosesinde, miyozin ağır zincirlerinin farklı proteinlerle interaksiyonları önemli rol oynar (Ninan, 2003). Diğer proteinlerden ziyade özellikle balık miyozininin emülsifiye edici ve bağlayıcı özelliği sayesinde balık sucuğu, balık jambonu gibi spesifik balık ürünlerinin üretimi yapılabilmektedir (Sen, 2005).

Balık kasında miyozinden sonra gelen diğer bir önemli protein aktindir. Aktin, miyofibriller proteinlerin %15-30'unu, toplam kas proteinlerinin ise %13'ünü oluşturur. G-aktin ve F-aktin olmak üzere iki formu vardır. Molekül ağırlığı 42-47 kDa aralığında olan ve 375 amino asitten oluşan globüler yapıdaki G-aktinin polimerizasyonu ile ince filamentlerin miyozin ile bağlanmasını sağlayan fibriller yapıda F-aktin oluşur (Kristinsson ve Rasco, 2000b; Tejada, 2001; Ninan, 2003; Vercruyssen ve Ark., 2005). Miyozin kasta kalın filamentleri, aktin ise troponin ve tropomiyozin ile birlikte ince filamentleri oluşturur. Tropomiyozin, sarmal boyunca ince filamentlerin oyukları içinde yer alır ve iki troponin molekülü, her sarmal tekrarında tropomiyozini aktin moleküllerine tutturur (Kristinsson ve Rasco, 2000b).

Tropomiyozinin kasın kasılmasını düzenleyici görevi vardır. Molekül ağırlıkları 33 kDa olan α -tip ve β -tip olmak üzere iki alt birimi bulunur. Asit, alkali ve ısı uygulamalarına dayanıklı olup, kolayca denatüre olmaz. Troponin yaklaşık 80 kDa molekül ağırlığına sahip, tropomiyozin gibi kasılmayı regüle eden proteindir. Üç adet alt birimi vardır. Bu proteinlerden Troponin C kalsiyumu bağlayıcı, Troponin I aktomiyozinin ATPaz aktivitesini inhibe edici özelliğe sahiptir. Troponin T ise tropomiyozin ile güçlü bir birleşme bölgesi oluşturur (Ninan, 2003).

Diğer kontraktıl proteinler C-protein, α -aktinin, β -aktinin, konnektin ve paramiyozindir. Ancak bunlar gıda proteini olarak çok önemli değerlerdir (Kristinsson ve Rasco, 2000b).

2.1.2. Sarkoplazmik Proteinler

Bu protein grubu kas içerisinde çözünmüş halde bulunduğundan su ve düşük iyonik güce sahip (<0,15 M) nötral tuz solüsyonlarıyla ekstrakte edilebilirler. Genel olarak miyoalbumin ve globulinden oluşur. Bünyesinde en az 500 farklı protein bulunan bu grup, tüm proteinlerin %25-30'unu oluştururlar. Sahip oldukları proteinler türe özgü kompozisyon gösterdiğinden, elektroforesis tekniği ile türlerinin belirlenmesinde kullanılabilirler (Huss, 1988; Xiong, 2004). Bu grup proteinlerin çoğu düşük moleküler ağırlığa (40-70 kDa) sahiptir. Sarkoplazmik proteinlerin miktarı, pelajik balıklarda yüksek dip balıklarında düşüktür (Sen, 2005).

Metabolik faaliyetlerde görev alan çoğu enzim bu gruba dâhildir. Kasta bulunan önemli glikolitik enzimler; enolaz, kreatin kinaz, aldolaz (ADL) ve gliseraldehit fosfat dehidrogenazdır. Allerjiye neden olduğu için önem kazanmış parvalbumin de (Ca^{+2} bağlayan ve kütlesi yaklaşık 12 kDa) bir sarkoplazmik proteindir. Parvalbumin ve diğer bir kalsiyum bağlayan protein olan calmodulin, sarkoplazmik proteinlerin yaklaşık %20-30'unu oluşturur (Ninan, 2003; Lanier ve Ark., 2013).

Bunların dışında sarkoplazmik proteinlerin içinde az miktarda pigmentler, hemoglobin, miyoglobin ve antifiriz proteinleri bulunur (Ninan, 2003; Belitz ve Ark., 2009). Balık etinin açık kırmızı rengi ile ilişkili pigmentler oksihemoglobin ve oksimiyoglobindir. İşleme ve depolama sırasında hemoglobin kolaylıkla kaybedilirken, miyoglobin hücre yapısı tarafından tutulur. Miyoglobin, molekül ağırlığı yaklaşık 18 kDa olan bir globüler hem proteindir. Uskumru balığı etinin koyu renkli kısmında miyoglobin 3,9 g/kg, hemoglobin 5,8 g/kg ve sitokrom C 0,13 g/kg düzeyinde bulunmaktadır. Açık renkli kas dokusunda ise miyoglobin ve hemoglobin içeriği toplamı yalnızca 0,1 g/kg seviyesindedir.

2.1.3. Stroma Proteinleri

Bu protein tipi vücudu destekleyen ve formunu korumasına neden olan deri, kemik, kıkırdak, diş, pul, kıl, tırnak gibi dokuları oluşturur. Suda yaşayan canlılar destek dokularına çok fazla ihtiyaç duymazlar. Bu nedenle balıkta bağ doku proteinleri; kemikli balıklarda proteinin yaklaşık %3'ünü, kıkırdaklı balıklarda ise yaklaşık %10'unu oluşturur. Memelilerde bu oran %17'dir. Bağ doku proteinleri suda ve tuz çözeltilerinde çözünmezler ancak seyreltik hidroklorik asit veya sodyum hidroksit içinde çözünebilirler. Stroma proteinleri sindirimi zor ve esansiyel amino asit içeriği az olduğundan beslenmede değersizdir. Bağ doku proteini esas itibariyle kolajenden oluşur. Vücutta çok sayıda tipi bulunan kolajenin, bağ doku proteini içindeki oranı %90'ın üzerine kadar ulaşabilmekte,

kalan kısmı ise elastinden oluşmaktadır. Balık kolajeninin kısalma (shrinkage) sıcaklığı (T_s), 45°C olup, 60-65°C olan memeli kolajenine göre çok düşüktür. Bu iki faktör balık etini memeli etlerine göre daha yumuşak ve hassas yapar (Huss, 1988; Belitz ve Ark., 2009).

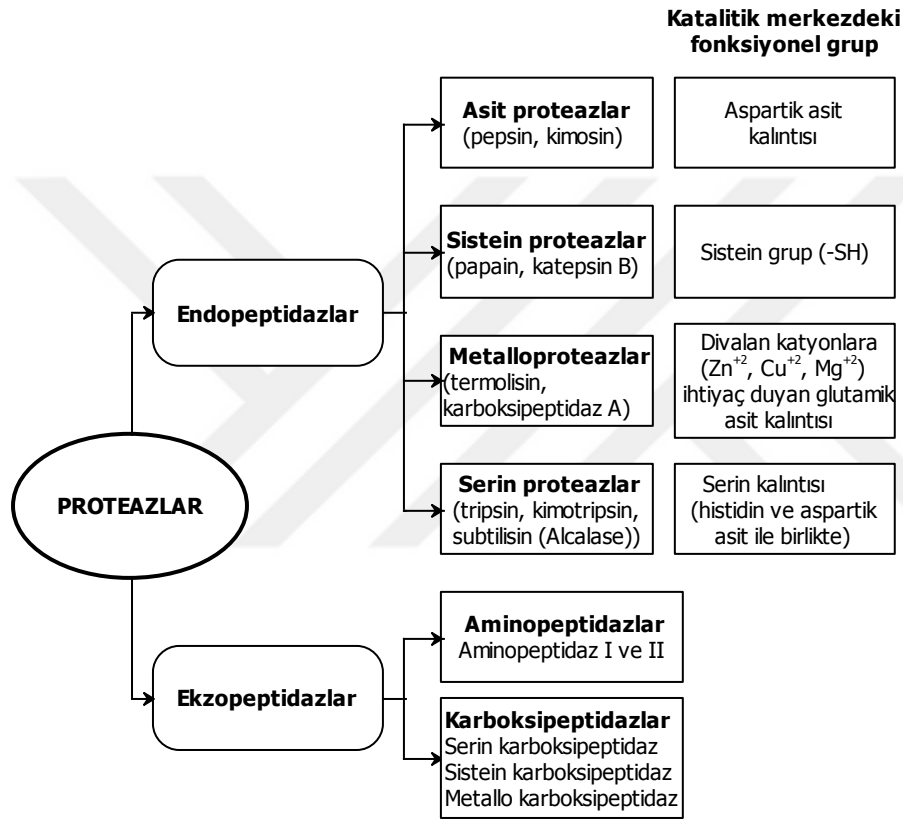
Kolajen miktarı; türe, beslenme rejimine ve balığın olgunluk durumuna göre değişiklik gösterir. Genel olarak balık kasında %0,2 – 2,2 kolajen bulunur (Shahidi, 1994; Sen, 2005). Kolajen, her biri yaklaşık 95 kDa ağırlığındaki polipeptit alt birimlerinin oluşturduğu üçlü heliks yapısına sahiptir. Soğuk su balıklarındaki kolajenin denatürasyon sıcaklık derecesi, ılık sulara yaşayan balıklara göre daha düşüktür (Sen, 2005). Yapısına bağlı olarak kolajen ısıtıldığında jelatine dönüşebilir. Çözünebilir özellikteki jelatinin, miyofibriller proteinlerin jelyasyonuna katkı yaptığı düşünülmektedir (Lanier ve Ark., 2013). Kolajen ve onun kısmen hidrolize formu jelatin; glisin, valin, alanin, prolin ve hidroksiprolin gibi non-polar amino asitler yönünden zengindir (Kim ve Mendis, 2006). Yaklaşık 750 aminoasit kalıntısından oluşan ve molekül ağırlığı 68 kDa olan elastin, dokulara elastikiyet kazandırır. Elastin, ıslak ısıtmaya karşı çok dayanıklı olup pişirmeden etkilenmez. Bağ doku proteinleri koyu renkli etlerde, açık renkli etlere göre daha fazla bulunur (Tahergorabi ve Jaczynski, 2014).

2.2. Enzimler

Enzimler; organik moleküllerin yapılması ve yıkılması, kas kasılması, hücre solunumu, kanın pıhtılaşması gibi biyolojik aktivitelerin sürdürülmesini sağlayan; kimyasal tepkimelerin hemen hemen tamamını milyonlarca kez hızlandıran, tepkimede tüketilmeyen ve tepkime sonunda kendisinde değişim olmaksızın tekrar tekrar kullanılabilen, ribozimler dışında protein yapısında olan biyolojik katalizörlerdir (Yıldız, 2007). Gıda endüstrisinde hammaddenin yüksek kalitede ürüne dönüştürülmesi, arzu edilen fonksiyonel özelliklerin kazandırılması ve tüketici açısından daha hoşta gider ürünlerin elde edilmesinde enzimler kullanılmaktadır.

Uluslararası Biyokimya Derneğinin (IUB) Enzim Komisyonunca (EC) belirlenen esaslara göre enzimler başlıca altı büyük sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; Oksidoredüktazlar (EC1), Transferazlar (EC2), Hidrolazlar (EC3), Liyazlar (EC4), İzomerazlar (EC5) ve Ligazlardır (EC6) (Bergmeyer, 1979). Tüm enzim sınıflarının gıda ve yem teknolojisinde bir uygulama alanı bulunmakla birlikte, en yaygın kullanılan enzim hidrolazlar olarak bilinmektedir (Fernandes, 2010). Hidrolazlar içinde yer alan enzim gruplarının kullanım miktarlarına göre sıralaması; karbonhidrazlar, proteinazlar ve lipazlar şeklindedir. Bunların içinde proteazlar, gıda sanayinde en iyi karakterize edilmiş, ekonomik etki açısından en önemli enzim grubudur (Kennedy ve White, 1984).

Proteazlar (proteolitik enzimler), proteinlerin (polipeptitlerin) yapısını oluşturan amino asitler arasındaki peptit bağlarının su molekülü olarak ayrılmalarını sağlayan hidroliz reaksiyonunu katalizlerler (deMan, 1999). Proteazlar tarafından gerçekleştirilen katalizleme işlemi 3 temel reaksiyondan oluşur. Bunlar; orijinal peptit zinciri ile enzim arasında Michaelis kompleksinin oluşumu, peptit bağının koparılıp iki peptitten birinin serbest kalması ve nükleofilik ataklarla enzim-peptit kompleksinin ayrılması ve diğer peptit ile enzimin serbest kalmasıdır (Kristinsson ve Rasco, 2000b).



Şekil 2.1. Proteazların sınıflandırılması (Kumar ve ark., 2008)

Proteazlar, farklı şekillerde kategorize edilebilmektedir. Şekil 2.1’de katalizledikleri bölgeye ve katalitik merkezlerindeki fonksiyonel gruplarına göre yapılan sınıflandırma yer almaktadır. Katalizledikleri hidroliz bölgesine göre proteazlar iki gruba ayrılırlar. Bunlardan ilki endopeptidazlar (endoproteinazlar, proteinazlar), polipeptit zincirindeki peptit bağlarını, uçlardan uzak iç kısımlarda hidrolize ederler ve daha küçük boyutta suda çözünebilir peptitler oluştururlar. Ekzopeptidazlar ise, karboksi (COOH) veya amino (NH₂) uçtan (terminal) peptit bağlarını kopararak serbest amino asitlerin ayrılmasını sağlarlar (Aehle, 2004). Ekzopeptidazlardan N (amino) ucundan ayıranlara aminopeptidaz, C (karboksi) ucundan ayıranlara ise karboksipeptidaz adı verilmektedir. Gıda proteinlerinin hidrolizinde

genellikle endoproteinazlar kullanılır ancak bütünüyle bir hidroliz amaçlanıyorsa nadiren ekzopeptidazlarla kombine edilerek de kullanımı söz konusudur (Kristinsson ve Rasco, 2000b).

Enzim molekülünde substratın bağlandığı ve katalizlemenin gerçekleştiği aktif bölgelerinde (katalitik merkez) bulunan fonksiyonel gruplara göre de proteazlar 4 önemli sınıfa ayrılırlar. Bunlar asit proteazlar (A), tiol/sistein proteazlar (C), metalloproteazlar (M) ve serin proteazlardır (S) (Temiz, 2007; Batra ve Walia, 2014).

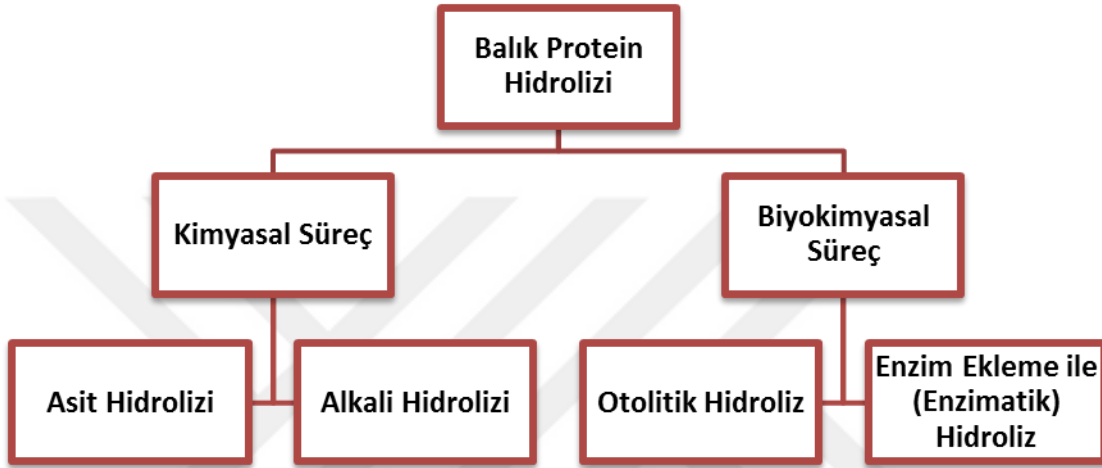
Asit proteazlara aspartil veya karboksilik proteazlar da denilmektedir. Bunun sebebi aktif bölgelerinde iki aspartik asit kalıntısına ait karboksil gruplarının bulunmasıdır. Bu enzimler asidik pH'da (3-4) yüksek aktivite ve stabilite gösterirler. Balıkların midesinden izole edilen yaygın asit proteazlar; pepsin, kimosin (rennin) ve gastriksindir.

Thiol/sistein proteazlar, katalitik bölgelerinde esansiyel grup olarak sistein ve histidin içerirler. Sisteinden gelen tiol (-SH) grubuna ihtiyaç duyarlar. En yüksek hidrolitik aktiviteyi pH 4-6,5 arasında gösterirler (Simpson, 2000). Lizozomal sistein proteazlardan katepsin B, H ve L hücre içi protein dönüşümlerinde önemli rol oynarlar. Balığın post-mortem safhasında yapısal kas proteinlerini hidrolize ederek etin yumuşamasını sağlarlar (Yoshida ve ark., 2015).

Metalloproteinazların aktivitesi iki değerlikte katyon bağlarının varlığına bağlıdır. Aktif bölgesinde, birbirine yakın iki histidin yan zinciri tarafından bağlanmış çinko atomu ve glutamik asit kalıntısı bulunur. Tüm metallo-endopeptidazların doğal formlarında katalitik aktif metal olarak çinko yer almakta, ancak çinko yerine kobalt gibi başka bir metal geçtiğinde de enzim aktivitesinde bir değişiklik olmamaktadır (Simpson, 2000; Barrett ve Rawlings, 2001).

Bilinen proteazların üçte birinden fazlasını serin proteazlar oluşturur. Serin proteazlar aktif bölgelerinde katalitik üçlü olarak adlandırılan bir imidazol grup (His), bir aspartil karboksil grup (Asp) ve nükleofil olarak reaktif serin (Ser) kalıntısı içerirler (Cera, 2009). Balık sindirim bezlerinden izole edilen serin proteazlar; tripsin, kimotripsin ve elastazdır. Tripsin yüksek seçiciliğiyle peptit zincirinin karboksil tarafından lisin ve arjinin kalıntıları üzerine etki eder. Kimotripsin ise daha yaygın şekilde trozin, fenilalanin, triptofan ve lösin gibi büyük boyutlu yan zincire sahip nonpolar (hidrofobik) amino asitler üzerinde etkilidir. Serin proteazlar genellikle nötr ve alkali pH değerlerinde aktiflerdir. Optimum pH aralığı 7-11, izoelektrik noktaları pH 4-6, molekül ağırlıkları 18-35 kDa arasındadır. Serin proteazların en geniş alt grubu olan serin alkali proteazlar, alkali pH değerlerinde aktiflerdir. Optimum pH değeri 10, izoelektrik noktası pH 9 civarındadır. Molekül ağırlıkları 15-30 kDa

arasında değişmektedir. Substrat seçicilikleri bakımından kimotripsine benzerler (Rao ve ark., 1998). Endüstriyel enzimler içinde en önemli grup, mikrobiyal orijinli serin alkali proteazlardır. Gıda, yem, deterjan, deri, fotoğraf endüstrileri gibi geniş bir kullanım alanına sahip olan (Gupta ve ark., 2002; Batra ve Walia, 2014) bu enzimlerin üretildiği en önemli mikroorganizma grubu *Bacillus spp.*dir. *Bacillus* türlerinden elde edilen ve yaygın kullanıma sahip enzim ise subtilisindir (Rao ve ark., 1998; Kumar ve ark., 2008; Bhunia ve ark., 2012).



Şekil 2.2. Protein hidroliz yöntemleri (Kristinsson ve Rasco, 2000b)

2.3. Balık Protein Hidrolizi

Balık proteinlerindeki peptit bağlarının kimyasal veya enzimatik yollarla su alarak yıkılması ile elde edilen farklı büyüklüklerde peptitlerden ve serbest amino asitlerden oluşan sıvı ürüne balık protein hidrolizatı (BPH), yürütülen işleme de protein hidrolizi adı verilmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000b; He ve Ark., 2013). Esas itibariyle balık protein hidrolizatı üretiminde, kimyasal ve biyokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Kimyasal yöntemle hidroliz, asit veya alkali kullanılarak gerçekleştirilmekte; biyokimyasal süreç ise kendi içinde farklı yöntemleri barındırmaktadır (Şekil 2.2).

2.3.1. Kimyasal Yöntemle Balık Protein Hidrolizi

Kimyasal yöntemle protein hidrolizi, asit veya alkali kullanılarak peptit bağlarının parçalanması şeklinde gerçekleşir. Bu yöntem, nispeten ucuz ve basit şekilde yürütülebildiğinden geçmişte sanayi tarafından tercih edilmiştir. Ancak elde edilen ürünlerin gıda amaçlı kullanımında bazı sorunlar yaşanmıştır. Kimyasal hidrolizde üretim faktörlerini kontrol etmek güç olduğundan, ürünler farklı kompozisyon ve fonksiyonel özellik

gösterebilmektedir. Güçlü kimyasallarla, yüksek sıcaklık ve pH değerlerinde gerçekleşen hidroliz sonunda ürünlerin besleyici değeri azalmakta, fonksiyonel özellikleri gerilemekte ve aroma kaybı meydana gelmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000b).

2.3.1.1. Asit Hidrolizi

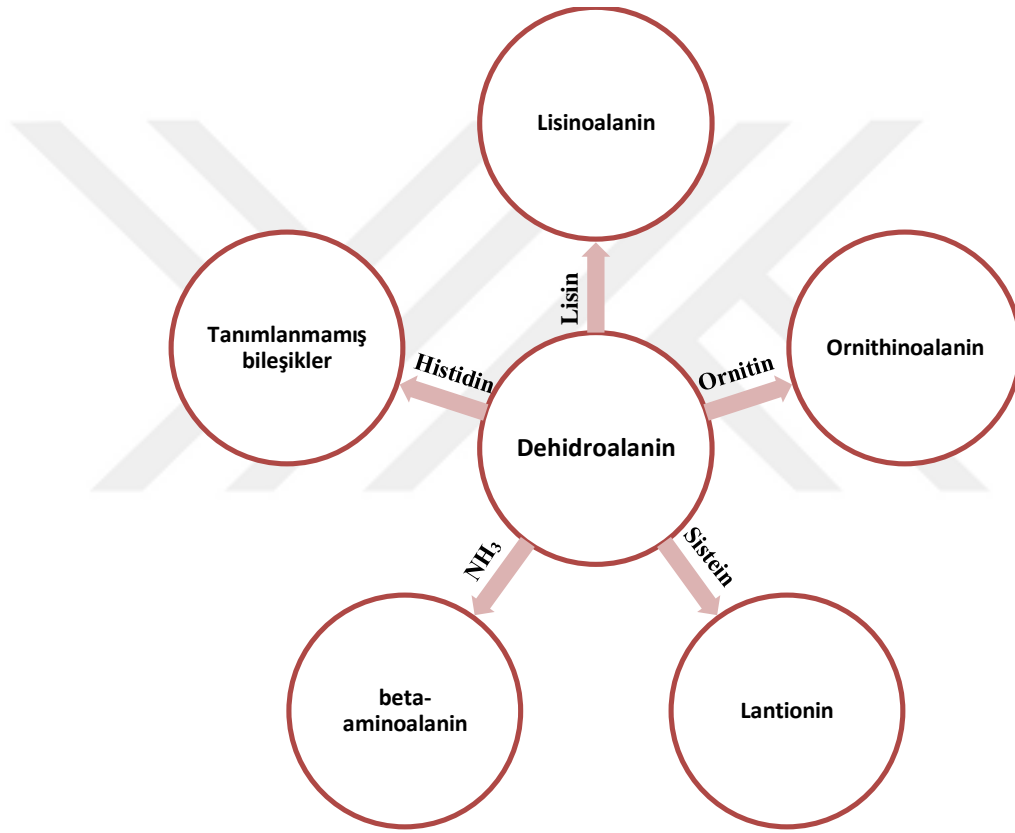
Asit hidrolizi, alkali hidrolizine göre daha yaygın kullanılan bir yöntemdir. Balık proteinlerinin asitle hidrolizinde genel olarak hidroklorik asit, bazı durumlarda da sülfirik asit kullanılır. Yüksek sıcaklıklarda ve yüksek basınç altında proteinlerin tamamı hidrolize olur. Hidrolizatın pH'sı daha sonra 6,0-7,0 seviyesine ayarlanır. Suyun fazlası uzaklaştırılarak lapa haline getirilir veya çeşitli işlemlerle kurutulur. Ürün büyük ölçüde hidrolize proteinlerden oluştuğundan sahip olduğu en önemli fonksiyonel özellik, çözünürlüktür. Balık protein substratının tamamı 6M HCl kullanılarak 110°C'de 24 saatte, 118°C'de 18 saatte veya 145°C'de 4 saatte hidrolize edilebilir. Sonrasında yapılan nötralizasyon işlemi ile büyük miktarda tuz oluşur. Bu tuz hem tadı bozar, hem de gıda sistemleri içinde istenmeyen etkileşimlere sebep olabilir (Kristinsson ve Rasco, 2000b; Ghaly ve ark., 2013). Bazı amino asitlerde meydana gelen kayıp, bu hidroliz yönteminin diğer olumsuz yönüdür. Asit hidrolizi şartlarında asparjin ve glutamin tamamen aspartik asit ve glutamik asite hidrolize olurken; esansiyel bir amino asit olan triptofan tamamen; tirozin, serin ve treonin ise kısmen tahrip olur. Genellikle asit hidrolizinde %5-10 geri kazanım kaybı olur (Ghaly ve ark., 2013).

Asit hidrolizi; kullanılmayan ikincil hammaddenin gübreye dönüştürülmesinde, düşük üretim maliyeti ve büyük ölçüde proteinlerin hidrolize olmasından dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000b).

2.3.1.2. Alkali Hidrolizi

Başta sodyum hidroksit olmak üzere, alkali kimyasallar kullanılarak yürütülen hidrolizde, sıklıkla zayıf fonksiyonel özelliklere ve tüketim açısından yan etkilere sahip ürün elde edilir. Balık proteinlerinin alkali hidrolizinde başlangıç substratı olarak balık protein konsantresi (BPK) kullanılır. Alkali hidrolizinde öncelikle hızlı bir şekilde suda çözünen proteinler parçalanır, diğer substratın degradasyonu yavaş bir şekilde devam eder. Yapılan bir çalışmada, balık protein konsantresi kullanılarak yüksek pH (12,5) ve sıcaklık değerlerinde (95°C) 20 dakika süreyle gerçekleştirilen alkali hidrolizinde substratın fonksiyonel özelliklerinin iyileştiği tespit edilmiştir (Tannenbaum ve ark., 1970a; 1970b; Kristinsson ve Rasco, 2000b).

Alkali hidrolizi esnasında zararlı reaksiyonlar meydana gelebilmektedir. Alfa karbon atomundan hidrojenin çekilmesiyle başlatılan reaksiyon süreci sonunda L-amino asit formundan, insan vücudunun kullanmadığı D-amino asit formuna dönüşüm (rasemizasyon) gerçekleşmektedir (Linder ve ark., 1995). Alkali hidrolizinde ayrıca β -eliminasyon reaksiyonları yoluyla sistein, serin ve treonin kaybı yaşanır ve disülfid bağları ayrılır (Lahn ve Braun, 1994). Bununla birlikte lisinoalanin, ornithinoalanin, lantionin ve β -amino alanin oluşur (Şekil 2.3). Hidroliz sırasında oluşan lisinoalanin gibi bileşikler toksik özellikte olup, gıdalarda olması arzu edilmez (Ghaly ve ark., 2013).



Şekil 2.3. Alkali protein hidrolizinde oluşabilecek bileşikler (Kristinsson ve Rasco, 2000b)

2.3.2. Biyokimyasal Yöntemlerle Balık Protein Hidrolizi

Balık veya diğer gıda proteinlerinin biyokimyasal hidrolizi, enzimler yoluyla gerçekleştirilmektedir. Bu işlem, balık iç organları veya kaslarında hâlihazırda bulunan proteolitik enzimlerin (endojen proteazlar) kullanımı ile olabileceği gibi bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal kaynaklardan gelen enzimlerin dışarıdan ilavesi ile de gerçekleştirilebilmektedir. Reaksiyon şartlarının belirlenmesinde ve üretilen hidrolizatların özelliklerinin oluşmasında kullanılan proteolitik enzimlerin yapı ve aktiviteleri önemli rol

oynamaktadır. Bu nedenle endojen veya ekzojen enzimlerin kullanım tercihi, tüm süreci etkileyen önemli bir karar aşaması olmaktadır.

2.3.2.1. Otolitik Hidroliz

Balık proteinlerinden hidrolizat elde etmede kullanılan biyokimyasal yöntemlerden biri otolitik hidrolizdir. İşlem sırasında kontrolü güç olan bu yöntemin basit işlem basamaklarından oluşması ve masrafının olmaması nedeniyle avantajlı yanları da bulunmaktadır.

Otolitik hidrolizde katalizleme işlemini yapan başlıca sindirim enzimleri, serin proteazlardan tripsin ve kimotripsin ile tiol proteazlardan pepsindir. Bu enzimler iç organlarda ve sindirim kanalında yoğun olarak bulunur. Sınırlı derecede balık kas hücrelerinde bulunan lizozomal proteazlar veya kateptik enzimler de proteolitik yıkıma etki ederler. Otolitik hidroliz ürünleri genel olarak serbest amino asitler ve kısa peptitler içeren akışkan sıvı formundadır (Kristinsson ve Rasco, 2000b).

Hidrolizi gerçekleştiren endojen enzimler, farklı aktivasyon şartlarına ihtiyaç duyan oldukça kompleks bir karışım halindedir. Aynı zamanda sindirim enzimleri konsantrasyon bakımından; türe, mevsime, cinsiyete ve yaşa göre önemli ölçüde farklılık gösterebilmektedir. Enzim sistemindeki bu kararsız yapı, hidrolitik prosesin kontrolünü imkansız kılmaktadır. Yürütülen hidroliz işlemi sonucunda, mevcut hidrolitik girdi ve şartlar çerçevesinde son ürünün moleküler profili şekillenmekte ve o hidroliz işlemine özgü ürünler elde edilmektedir.

Otolitik hidrolizde elde edilen hidrolizatlar, kimyasal hidrolizde olduğu gibi, düşük fonksiyonel özelliklere sahip olmaktadır. Bu durum nedeniyle endojen proteolitik enzimler, özellikle balık sosu ve balık silajı üretiminde kullanılmaktadır. Balık sosu üretiminde balık kası ve iç organlarından gelen proteazlara, halofilik bakterilerin ürettikleri de katılarak tat ve aroma gelişiminin tamamlanmasını sağlarlar. Balık silajı üretiminin başlangıcında hammadde asitlendirildiğinden, serin proteazlar inaktif durumdadır. Hidroliz bu pH değerlerinde çok aktif olan pepsin ve kateptik enzimlerle gerçekleşmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000b; Rustad, 2003; Thorkelsson ve Ark., 2008).

2.3.2.2. Enzimatik Balık Protein Hidrolizi

Enzim eklenerek yürütülen (enzimatik) balık protein hidrolizi, hammadde proteinin besleyici özelliklerini riske atmadan; fizikokimyasal, fonksiyonel ve duyuşsal özelliklerini geliştiren veya modifiye eden önemli bir işlemdir. Enzimatik hidroliz; otolitik hidrolizin

kontrollü şartlar altında genişletilmesidir. Bu hidroliz yöntemi genel olarak mutedil şartlarda (pH, sıcaklık, basınç) gerçekleştirildiğinden kimyasal hidroliz yöntemlerine göre üstün özellik gösterir. Bu hidroliz sürecinde;

- Asit veya alkali hidrolizinde meydana gelen optik özellikleri değişmiş rasemizasyon ürünleri,
- Asit hidrolizindeki esansiyel sistin, sistein, metionin ve triptofan amino asitlerinin harabiyeti,
- Asit hidrolizi sonunda yapılan nötralizasyona bağlı aşırı tuz oluşumu,
- Alkali hidrolizindeki sistin, arjinin, treonin, serin, isolösin ve/veya lisin miktarlarında azalma, lisinoalanin veya lantionin gibi alışılmadık toksik amino asit kalıntılarının oluşumu ortaya çıkmaz.

Enzimatik hidrolizin dışarıdan enzim katılarak gerçekleştirilmesi; işlemin çok iyi bir şekilde kontrol edilmesine, arzu edilen son ürüne göre sürecin tasarlanmasına imkân tanımaktadır. Bu haliyle de otolitik hidrolize göre çok büyük bir avantaj sağlamaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000b; Shirai ve Ramirez-Ramirez, 2011; Herpandi ve ark., 2011; Tavano, 2013).



Şekil 2.4. Enzimatik balık protein hidrolizatı üretimi genel akış şeması

Proteinlerin proteolitik enzimlerle spesifik peptit bağlarından parçalanmasıyla meydana gelen enzimatik modifikasyon, gıda sanayinde üstün fonksiyonel özelliklere sahip hidrolizat üretiminde yaygın bir kullanıma sahiptir (Tanuja ve ark., 2014). Temel işlem

basamakları Şekil 2.4’de verilen enzimatik hidroliz yoluyla katma değeri yüksek balık protein hidrolizatı (BPH) üretilmesi, ticari boyutta balığın daha fazla değerlendirilmesinin yolunu açtığından balıkçılıkla ilgili bilim insanlarının ve teknologların son yıllarda ilgisini çekmiştir. Balık proteinlerinin enzimatik hidrolizi, esasen kullanım dışı balık çıktılarının yem veya gübreye dönüştürülmesine alternatif bir yaklaşım olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle balık işleme atıkları veya ikincil hammaddenin BPH üretiminde kullanıldığı çalışmalar yakın zamanda oldukça artış göstermiştir (Venugopal 1994; Kristinsson ve Rasco, 2000b; Gildberg, 2002; Sen, 2005; Kristinsson, 2006; Souissi ve ark., 2007; Ovissipour ve ark., 2009a, 2009c; Valencia ve ark., 2011). Çizelge 2.1’de bazı balık ve işleme atıklarında yürütülen enzimatik hidroliz çalışmalarına ait bilgiler listelenmiştir. Bu çalışmalarda genellikle farklı enzimler veya aynı enzime ait farklı reaksiyon şartlarının ürün özelliklerine etkisi araştırılmıştır.

Enzimatik hidrolizde kullanılan proteolitik enzimler; bitkisel (papayadan elde edilen papain, incirden elde edilen fisin, ananastan elde edilen bromelain gibi), hayvansal (pepsin, tripsin, kimotripsin, pankreatin gibi) ve bakteri (Alcalase®, Protamex®, Flavourzyme®, Neutrase®, Pronase gibi) kökenli olabilmektedir (Kristinsson, 2006; Ovissipour ve ark., 2009a; Muzaifa ve ark., 2012). Kullanılan enzimlerde aranan temel özellikler; gıdada kullanılabilir vasıfta (food grade) olması ve mikroorganizma kökenli ise patojen olmayan organizmalardan türetilmiş olmasıdır (Shirai ve Ramirez-Ramirez, 2011). Genel olarak mikrobiyal enzimlerin hayvansal ve bitkisel kaynaklı enzimlere kıyasla geniş kapsamda katalitik aktivite göstermeleri, pH ve sıcaklık stabilitelerinin yüksek olması gibi bazı avantajlara sahip oldukları bilinmektedir (Diniz ve Martin, 1997). Bu nedenle hidrolizat üretiminde araştırmacıların daha çok mikroorganizma kökenli enzimlerle çalıştıkları görülmektedir. Bu kapsamda yürütülen çalışmalar sonucunda balık protein hidrolizatlarının hazırlanmasında kullanılan en iyi enzimin Alcalase® olduğu yönünde fikir birliği oluşmuştur. Balık protein hidrolizatlarında görülen acılık probleminin Alcalase kullanımıyla en aza indirilmesi, yüksek proteolitik aktivitesi ile düşük maliyetli olması yani nispeten az miktarda kullanımına karşılık yüksek protein geri kazanımı sağlaması tercih edilme sebeplerinin başında yer almaktadır. Ayrıca hidrolizatların fonksiyonel özelliklerinin iyileşmesinde gözlenen etkileri popülerliğinin artmasını sağlamıştır (Hoyle ve Merritt, 1994; Shahidi ve ark., 1995; Kristinsson ve Rasco, 2000b; Guerard ve ark., 2001; Ovissipour ve ark., 2009a, 2009c).

Çizelge 2.1. Balıkçılık ürünlerinde enzimatik hidroliz çalışması örnekleri

Hammaddenin		Hidroliz Şartları						Literatür
Türü	Kullanılan Kısım	Kullanılan Enzim	Hamm ad./ Su Oranı (m/v)	T (°C)	pH	E/S Oranı	Süre	
Blue whiting (<i>M. poutassou</i>)	Preslene-rek bir miktar yağ ve suyu alınmış balık keki	Alcalase 2.4L Tripsin Bu enzimler tek başına ve 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır.	25 g/L olacak şekilde	A: 50 T: 40 A/T: 45	A: 8,0 T: 8,0 A/T: 8,0	% 0,1 - % 6,0 (m/m) aralıkta arzu edilen HD elde edecek şekilde kullanılmıştır.	HD % 4, % 8 ve % 12 olacak şekilde hidroliz sürdürülmüştür.	Garcia-Moreno ve ark., 2016
Catfish (<i>P. Hypophthalmus</i>)	Fileto ve iç organlar ayrıldıktan sonra etli omurga	Alcalase	1:1	55	8,5	% 0,5, 1,5, 2,5 (v/m)	90 dk.	Tanjua ve ark., 2014
Silver carps (<i>H. molitrix</i>)	Pulları ayıklanmış, yağı alınmış balık filetosu	Papain (0.5–2 u/mg), Alcalase (35 u/mg), Flavourzyme (500 u/mg) Trypsin (250 u/mg)	1:7	P: 50 A: 60 F: 50 T: 37	P: 7,0 A: 8,5 F: 7,0 T: 7,5	% 1,0	2, 4, 6 ve 20 saat	Jianga ve ark., 2014
Barbel (<i>Barbus callensis</i>)	Fileto	Alcalase	1:1	50	10	3:1 (U/mg)	5 saat	Sila ve ark., 2013
Uskumru	Tüm balık ve işleme atıkları	Alcalase	1:1	55	7,5	0,5 g/100g materyal	1 saat	Ramakrishnan ve ark., 2013
Kırmızı tilapia balığı (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Fileto	Alcalase Flavourzyme Protamex	1:4	A: 60 F: 55 P: 50	A: 8,0 F: 7,0 P: 7,5	% 2 (m/m)	0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 saat	Shamloo ve ark., 2012
Pacific hake (<i>Merluccius productus</i>)	Derisi ayrılmış fileto	Alcalase, Bromelain, Flavourzyme, Protamex, Protease A “Amano” 2, Protease N “Amano” K, Protin SD NY10, Umamizyme-K, Validase BNP-L, Validase FPexo	1:2	50	pH ayarlanmamış, hidroliz sonunda 6.58–6.94 aralığında ölçülmüştür	216/100 (U/g balık)	1 saat	Cheung ve ark., 2012

Çizelge 2.1'in devamı

Hammaddenin		Hidroliz Şartları						Literatür
Türü	Kullanılan Kısım	Kullanılan Enzim	Hammad./ Su Oranı (m/v)	T (°C)	pH	E/S Oranı	Süre	
Somon	İşleme atıkları	Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, Pepsin Trypsin	% 12 protein içerecek şekilde	A:50 F: 50 N: 50 P: 37 T: 37	A:7,0 F: 7,0 N: 7,0 P: 2,0 T: 8,0	% 1 (m/m)	8 saat	Ahn ve ark., 2012
Bluewing searobin (<i>P. punctatus</i>)	Fileto	Alcalase ve Flavourzyme	500 mg protein/ml	A: 70 F: 50	A, F: 7,5	A: % 0,5 (m/m) F: % 3,0 (m/m)	A: 1 saat F: 2 saat	Santos ve ark., 2011
Orkinos (<i>Thunnus tonggol</i>)	Balığın kara eti (dark muscle)	Orientase 90N Protease XXIII	1:2	O: 50 P: 37	O: 7,0 P: 7,5	% 1 (m/m)	6 saat	Hsu, 2010
<i>Huso huso</i>	İç organları	Alcalase	1:2 (buffer)	35, 38, 45, 5, 55	8,5	17, 22, 34, 46, 51 AU/kg protein	60, 80, 120, 160, 180 dk.	Ovissipour ve ark., 2009c
Persian sturgeon (<i>Acipenser persicus</i>)	İç organları	Alcalase (2.4 AU/g, 1,18 g/ml)	1:4 (buffer)	35, 45 ve 55	8,5	0,1 AU/g	30-205 dk.	Ovissipour ve ark., 2009a
Yellow Stripe Trevally (<i>Selaroides leptolepis</i>)	Fileto ve isopropanol ile yağı alınmış fileto	Alcalase 2.4L Flavourzyme 500L	Fileto için 1:4; yağı alınmış fileto için 1:20,4	F: 50 A:60	F: 7,0 A: 8,5	% 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5 ve 10 (m/m)	20 dakika	Klompong ve ark., 2007
Grass Carp (<i>C. idella</i>)	Deri	Alcalase (2.4 AU/kg aktivite, 1,18 g/ml yoğunluk)	1:1 (Diğer hidroliz şartları %5, 10 ve 15 HD olacak şekilde)	%5 HD:59 %10 HD: 58 %15 HD: 60	%5 HD:8,0 %10 HD: 8,0 %15 HD: 9,0	%5 HD:%0,12 %10 HD: %0,57 %15 HD: %1,08	%5 HD:75 dk. %10 HD: 110 dk. %15 HD: 120 dk.	Wasswa ve ark., 2007
Orkinos	Balığın etli omurgası	Alcalase Chymotrypsin Papain Pepsin Neutrase Trypsin	1:10 (protein içeriği bazında)	A: 50 C: 37 PAP: 37 PEP: 37 N: 50 T: 37	A: 7,0 C: 8,0 PAP: 6,0 PEP: 2,0 N: 8,0 T: 8,0	% 1 (m/m)	8 saat	Je ve ark., 2007
Capelin (<i>Mallotus villosus</i>)	Bütün balık	Alcalase, Neutrase Papain Endojen enzimler	1:1	A: 45-65 N: 50-55 P: 45-65 Otoliz: 25	A: 8,5 N: 7,0 P: 6,1 Otoliz: 3,0	AU/kg protein olarak; A: 30 N: 30 P: 1 – 4		Shahidi ve ark., 1995

Novozyme (Danimarka) firması tarafından *Bacillus licheniformis* bakterisinden fermantasyon tekniği ile üretilen Alcalase® enzimi (EC 3.4.21.62, Subtilisin A, Subtilisin Carlsberg, Subtilopeptidaz A, Bakteriyel Alkalın Proteaz), Serin S8 endoproteinaz ailesi üyesi bir enzimdir. Geniş bir substrat seçiciliği ile alkali şartlarda doğal ve denatüre proteinleri yüksek düzeyde hidrolize etme yeteneğine sahip bu enzimin pH 6,5-8,5 aralığında aktif olduğu ve optimum aktivite sıcaklığının ise 60°C civarında olduğu belirtilmektedir (Sigma, 2016). Alcalase enzimi ile yürütülen çalışmalarda reaksiyon şartları farklılık gösterebilmektedir. Örneğin Shahidi ve arkadaşları (1995), Alcalase kullanım değerlerinin optimizasyonu çalışmasında, optimum sıcaklığının hidroliz süresine göre değişiklik gösterebileceğini belirtmişlerdir. Örneğin 60 dakikalık hidroliz süresi için 60°C uygun gözükürken, hidroliz süresi 120 dakikaya çıkarıldığında optimum sıcaklığın 55°C olması gerektiğini tespit etmişlerdir. See ve arkadaşları (2011) tarafından Alcalase enzimi ile *Salmo salar* derisi hidrolizi konusunda yapılan optimizasyon çalışmasında, hidroliz derecesinin (HD) en yüksek olduğu şartlar; enzim/substrat oranı %2,5 (v/m), reaktör sıcaklığı 55,3°C ve pH 8,39 şeklinde belirlenmiştir. Bu şartlarda hidroliz derecesi %77 olarak tespit edilmiştir. Ovissipour ve arkadaşları (2009c) ise, benzer çalışmayı mersin balığı iç organları ile yürütmüşler, cevap yüzey metolojisi ile değerlendirdikleri optimizasyon çalışmasında; pH 8,5'da, 50°C'de 120 dakikada, 34 AU/kg protein enzim/substrat oranında en yüksek protein kazanımını elde etmişlerdir. Muzafia ve arkadaşları (2012) tarafından pH 8,0 ve 55°C'de materyal olarak balık işleme atıkları kullanılarak elde edilen hidrolizatlardan; Flavourzyme kullanılarak elde edilen ürünlere göre Alcalase enziminin daha yüksek protein geri kazanımı sağladığı, ürünlerdeki çözünürlük, emülsifiye kapasitesi, köpürme gibi fonksiyonel özelliklerin daha yüksek değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Shamloo ve arkadaşları (2012) 60°C ve pH 8,0'de elde ettikleri Alcalase hidrolizatlarının, Protamex ve Flavourzyme hidrolizatlarına göre önemli derecede yüksek radikal temizleme aktivitesine sahip olduklarını, Alcalase enziminin katalitik aktivitesinin de diğerlerinden yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Enzimatik hidroliz süreci üç safhada gerçekleşmektedir. Başlangıç fazı, reaksiyonun en hızlı olduğu ve parçalanmanın en yoğun gerçekleştiği aşamadır. İkinci fazda, hidrolizle çözünür forma geçen peptitler, hidrolize olmamış proteinler için rekabetçi substrat oluştururlar ve hidroliz hızı süre ilerledikçe düşer. Üçüncü faz ise hidroliz reaksiyonunun olmadığı safha olup, durağan faz olarak adlandırılmaktadır (Shahidi ve ark., 1995).

Enzimatik hidroliz sürecinde amino asitlerin serbest kalmasına bağlı olarak pH değerinde düşüş olmaktadır. Özellikle serin alkali proteazların kullanımında bu durum,

reaksiyon ortamını optimumdan uzaklaştırarak verimi düşürmektedir. Reaksiyon esnasında oluşan bu olumsuzluk, “pH stat” yöntemi ile önlenmektedir. Bu yöntemle hidroliz süresince pH sürekli kontrol edilmekte, pH'nın düşmesi durumunda dışarıdan alkali ilavesi ile enzime özgü optimum pH sabit tutulabilmektedir (Himonides ve ark., 2011).

Hidroliz derecesi (% HD), hidrolitik yıkımın boyutunu ve reaksiyon şartlarının etkinliğini gösteren bir ölçüdür. Hidroliz derecesi farklı tekniklerle belirlenebilmektedir. Bunlardan biri pH stat yöntemi olup, sarfedilen alkali miktarı üzerinden hesaplama yapılmaktadır. Kullanılan diğer yaygın yöntemler ise ozmometre, TCA ve TNBS yöntemleridir (Adler-Nissen, 1986; Kristinsson ve Rasco, 2000b).

2.4. Balık Protein Hidrolizatlarının (BPH) Özellikleri

Temel olarak BPH'nın özellikleri, üretim şartlarına göre şekillenmektedir. Bunlardan en önemlileri kullanılan materyal (substrat) ve seçilen enzimdir. Hidroliz sürecini etkileyen reaksiyon şartları ile ilgili değişkenler ise; S (protein konsantrasyonu), E/S (enzim/substrat oranı), pH, T (sıcaklık) ve t (hidroliz süresi) olmaktadır. Kullanılan materyal ve enzim çeşidi, son ürünün yapısını belirleyen ana unsurlar olmakla beraber, hidrolitik şartlardaki değişkenler de hidrolizat verimi ve kompozisyonu üzerinde önemli etkiye sahiptir (Kristinsson, 2006; 2007).

Hidrolizatların özelliklerini kullanım amaçlarına göre kategorize etmek mümkün olmaktadır. Bu kapsamda BPH özellikleri; besleyici özellikler, fonksiyonel özellikler ve biyoaktif özellikler şeklinde üç sınıfta toplanabilir.

2.4.1. Balık Protein Hidrolizatlarının Besleyici ve Duyusal Özellikleri

Hidrolizat üretiminde, materyaldeki protein moleküllerinin tamamı parçalandığından geriye kalan yağ ve çözünmeyen katı maddeler uzaklaştırılmakta, dolayısıyla elde edilen üründe protein konsantrasyonu artmaktadır. Hidroliz yoluyla hammaddedeki proteinler; suda çözünebilir ve kolay sindirilebilir farklı boyutlarda peptit ve serbest amino asit karışımına dönüşmektedirler. Böylece hidrolizatlar, gıda takviyesi olarak insan ve hayvanların beslenmesinde kullanılabilirler (Kristinsson, 2006, 2007; Arason ve ark., 2009). Balık protein hidrolizi konusunda yürütülen çalışmalarda, seçilen reaksiyon şartlarına bağlı olarak kurutulmuş hidrolizatlarda %62,3 ila %88,6 arasında yüksek düzeyde protein tespit edilmiştir. Bu hidrolizatların; FAO ve WHO tarafından önerilen amino asit değerlerinin (FAO, 1985) üzerinde aminoasit kompozisyonuna sahip olduğu görülmüştür (Sathivel ve ark., 2005; Souissi ve ark., 2007; Pacheco-Aguilar ve ark., 2008). Enzimatik

protein hidrolizinde oluşan kısa zincirli peptit formu, spesifik formülasyonlar için arzu edilen önemli bir özelliktir. Kısa zincirli peptitlerin (temelde dipetitler ve tripeptitler) sindiriminin serbest amino asitlere göre çok daha etkin gerçekleştiği ifade edilmektedir (Clemente, 2000).

Balık protein hidrolizatlarının gıda katkı maddesi olarak kullanımı fikri oldukça cazip bir durumdur, ancak kullanımında bazı sınırlayıcı özellikleri bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi hidrolizatın sahip olduğu duyuşal özelliklerdir.

Doğal olarak balık hidrolizatları, yapısı gereği “balıksı koku” özelliğine sahiptir. Bu özellik hayvan beslemeciliğinde avantaj oluştururken, insan tüketimi için problem oluşturabilmektedir. Bu nedenle insan tüketimine sunulacak gıdalarda kullanımından önce kokunun giderilmesi için ilave işlemlere ihtiyaç bulunmaktadır. Araştırmacılar hidrolizatların kokusunun giderilmesi konusunda çalışmalara devam etmekte, çalışma sonuçlarının hidrolizat endüstrisine entegrasyonu ile balık hidrolizatlarının gıdalarda kullanımının yaygınlaşacağı düşünülmektedir (Karadeniz ve Kim, 2014). Hidrolizatlardaki önemli ve yaygın başka bir duyuşal problem ise “acılık”tır. Acımsı tat, hidroliz sürecinde son karbon terminalinde hidrofobik grup bulunan peptitlerin oluşumuna bağlanmaktadır. Acılığın maskeleyerek için glutamik asit veya glutamille zengin peptitler, polifosfatlar, jelatin ile glisin içeren maddelerin katılması önerilmektedir (Shirai ve Ramirez-Ramirez, 2011). Enzim seçimi ve hidroliz derecesinin hassas bir şekilde ayarlanması ise problemin en aza indirilmesinde önemli etki yaratmaktadır. Peptit zincirinin karboksi veya amino ucunda acılık oluşturan hidrofobik kalıntılara (valin, isoleüsin, fenilalanin, triptofan, lösin ve tirozin) sahip peptitlerin 1000-6000 Da moleköl ağırlığına sahip olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir yaklaşımda ise, peptit zincirindeki hidrofobik kalıntı sayısının üç veya daha fazla sayıda olmasının acılığa sebep olduğu ifade edilmektedir. Acılığın giderilmesinde ekzopeptidazlar ilave edilerek kapsamlı bir hidroliz gerçekleştirilmesi veya daha düşük hidroliz derecesi ile daha büyük boyutlu peptitlerin elde edilmesi önerilmektedir (Venugopal, 1994; Kristinsson ve Rasco, 2000b; Nilsang ve ark., 2005; Sen, 2005). Hidrolizin duyuşal açıdan ürüne kattığı olumlu etki ise, umami (glutamat benzeri) tadının oluşmasıdır. İnsanlarda cezbedici özelliği yüksek olan bu tadın kaynağı glutamik asit kalıntısı yönünden zengin, oligopeptitlerdir (Venugopal, 1994).

Balık protein hidrolizatları, mikroorganizmalar için de besin kaynağı olarak kullanılabilir. Balık hidroliz ürünlerinden elde edilen peptonun, diğer ticari peptonlara göre daha yüksek seviyede bakteri gelişimini desteklediği bazı çalışmalarda tespit edilmiştir. Örneğin Fallah ve arkadaşları (2015), sazan balığı Alcalase hidrolizatlarının ticari

TSB (Tryptic Soy Broth)'a göre *S. aureus* bakterisinin gelişimine önemli derecede olumlu etki yaptığını belirlemişlerdir. Ancak araştırmacılar aynı sonucu tripsin hidrolizatlarından alamamışlardır. Ovissipour ve arkadaşları (2009b) ise, yellowfin orkinos balığı kafalarından Alcalase ve Protamex enzimleri ile elde ettikleri peptonların, test edilen 7 bakterinin gelişimi üzerine ticari peptonlardan daha destekleyici olduklarını belirlemişlerdir. Annadurai ve arkadaşları da (2012), sardalya balığı işleme atıklarından elde ettikleri asit hidrolizatlarının pepton olarak besiyerinde kullanıldığında ticari peptonlar gibi işlev gördüğünü ve çok ucuza mal edilebildiğini rapor etmişlerdir.

2.4.2. Balık Protein Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özellikleri

Gıda üretiminde proteinler, genel anlamda ürünün besin kalitesini ve fonksiyonel özelliklerini iyileştirmek amacıyla kullanılmaktadır (Arason ve Ark., 2009). BPH'nın gıda sisteminde kullanımı ise, daha çok fonksiyonel özelliklerinden faydalanmak amacıyla olup, özel bir önem taşımaktadır. Fonksiyonel özellikler; *“Gıda sistemlerinde; işleme, depolama, pişirme ve tüketim sırasında proteinlerin davranışlarını etkileyen fiziksel ve kimyasal özelliklerdir”* şeklinde tanımlanmaktadır (Kinsella ve Melachorish, 1976). Bu kapsamda hidrolize proteinlerin fonksiyonel özellikleri arasında; çözünürlük, emülsifikasyon özellikleri, yağ tutma/bağlama kapasitesi, köpürme özellikleri, su tutma/absorbsiyon kapasitesi sayılabilmektedir (Pires ve Batista, 2013).

Bir proteinin fonksiyonelliğini belirleyen fiziksel ve kimyasal özelliklerinin; boyut, şekil, amino asit kompozisyonu ve dizilimi, net yükü ve yüklerin dağılımı, hidrofobisite/hidrofilisite oranı, peptit yapıları, moleküler elastikiyeti/rijitliği, dış çevreye (pH, sıcaklık, tuz konsantrasyonu) tepkisi ve diğer bileşenlerle etkileşim/reaksiyon kabiliyeti olduğu ifade edilmektedir (Damodaran, 1997; Kristinsson ve Rasco, 2000b). Hidroliz söz konusu olduğunda ise substrat olarak kullanılan proteinin fizikokimyasal özellikleri, kullanılan enzimin seçiciliği, hidroliz şartları (sıcaklık, pH, iyonik güç, su aktivitesi, solvent polaritesi), reaksiyon süresi, ilave enzimatik veya enzimatik olmayan modifikasyon uygulamaları hidrolizatın protein özellikleri üzerine etki etmektedir. Böylece hidrolizattaki protein, hidroliz öncesine göre yeni veya gelişmiş fonksiyonel özellikler gösterebilmektedir (Pires ve Batista, 2013). Bu nedenle seçilen proteolitik enzim ve reaksiyon şartları ile substrat proteinin alt birimlere parçalanma seviyesi (hidroliz derecesi) kontrol edilerek, istenilen fonksiyonel özelliklerde hidrolizat üretimi mümkün olmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000b). Genel itibariyle sınırlı hidrolizin fonksiyonel özellikleri geliştirdiği, kapsamlı hidrolizin ise biyoaktif etkilerin ortaya çıkarılmasında etkili olduğu

bildirilmektedir (Polanco-Lugo ve ark., 2014). Pires ve Batista (2013)'ya göre enzimatik hidrolizin proteinler üzerindeki etkileri; proteinlerin moleküler ağırlığında azalma, iyonize olabilir grupların sayısında artış ve hidroliz öncesi gizli kalmış hidrofobik grupların açığa çıkması şeklinde olmaktadır.

Balık protein hidrolizatlarında bu etkilerin büyüklüğüne bağlı olarak şekillenen fonksiyonel özellikler, aşağıda anlatılmaya çalışılmıştır.

2.4.2.1. Çözünürlük

Balık proteinlerinin hidrolizinde en dramatik değişim, suda çözünebilen protein miktarındaki artış şeklinde olmaktadır (Panyam ve Kilara, 1996). Emülsifikasyon ve köpürme gibi bazı fonksiyonel özellikler de çözünürlükten etkilenmektedir. Geniş iyonik güç ve pH aralığında çökme olmaksızın gelişen çözünürlük, proteinler daha küçük peptitlere ayrıldıkça yani hidroliz derecesi arttıkça, artmaktadır. Bu durum, bazı hidrofobik grupların hidrolizle çevre şartlarına maruz kalmasına ve terminal karbonil ve amino grupların oluşumu yoluyla bazı hidrofobik grupların hidrofilik gruplara dönüşmesi şeklinde açıklanmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000b; Souissi ve ark., 2007; Slizyte ve ark., 2009). Ayrıca miyofibriller proteinlerden türeyen daha küçük peptit moleküllerinin su ile hidrojen bağı oluşturabilen polar kalıntılara sahip oldukları ve çözünürlüğü arttırdıkları düşünülmektedir (Tanuja ve ark., 2014). Sathivel ve arkadaşları (2005), 6 farklı enzim kullanarak somon kafalarından 25, 50 ve 75 dakikalık hidrolizle ürettikleri hidrolizatlarda bu genellemenin dışında da sonuçlar almışlardır. Alcalase enzimi hidrolizatları en yüksek çözünürlüğü en kısa ve en uzun hidroliz süresinde alırken, Flavourzyme 500L hidrolizatlarında en uzun süreli hidroliz, en yüksek çözünürlük değerini vermiştir. Neutrased enzimi 50 dakikalık hidrolizde en yüksek çözünürlüğü gösterirken, Protex 6L hidrolizatlarının çözünürlüğü, hidroliz süresinden etkilenmemiştir. Bu nedenle çözünürlük üzerinde peptitlerin küçük boyutlara ayrılmasının tek etken olmadığını, peptitlerdeki hidrofilik ve hidrofobik elementlerin de bir denge içinde olmaları gerektiğini bildirmişlerdir. Diniz ve Martin (1997) ise yaptıkları çalışmada; hidroliz derecesinin Alcalase kullanılan balık protein hidrolizatlarının çözünürlüğü üzerine etki yaratmadığını, pH 3 ile pH 9 arasında hidrolizatların %90 ile %100 arasında çözünürlük gösterdiklerini, endojen enzimlere göre ticari Alcalase enziminin üstün bir çözünürlük özelliği kazandırdığını tespit etmişlerdir.

2.4.2.2. Emülsifikasyon

Balık protein hidrolizatlarının emülsifikasyon özelliği, doğrudan yüzey özellikleri ile bağlantılı olup, gıdadaki hidrofilik ve hidrofobik komponentler arasındaki ara yüzey geriliminin etkin bir şekilde azaltılma kapasitesi şeklinde ifade edilebilir. Hidrolizatlar suda çözünebilir hidrofilik ve hidrofobik fonksiyonel gruplara sahip olduklarından yüzey aktiftirler ve su-yağ emülsiyonlarını desteklerler (Kristinsson ve Rasco, 2000b). Mekanizma, homojenizasyon esnasında oluşan yağ damlacığının yüzeyine tutunan peptitlerin koruyucu bir membran oluşturarak onların birbirleriyle kaynaşmalarını önlemeleri şeklinde işlemektedir (Wasswa ve ark., 2007). Emülsifikasyon için esansiyel olan ara yüzey geriliminin düşürülmesi, ardışık veya eşzamanlı proses tarafından yönetilir. Bunlar; protein molekülünün ara yüzeye diffüzyonu ve yapışması, yüzeye tutunmuş moleküllerin açılması ve adsorbe moleküllerin yüzeyde yeniden sıralanmasıdır (Panyam ve Kilara, 1996). Hidroliz yoluyla açığa çıkan hidrofobik amino asit kalıntıları bu anlamda emülsiyon oluşumuna katkı yapmakla birlikte, ileri seviyede hidrolizin ise emülsifikasyonu azalttığı bildirilmektedir. Hidrolizat içeriğindeki 7-10 kDa aralığında molekül ağırlığına sahip protein yapılarının % 47 ila % 60 arasında olması durumunda, en yüksek emülsiyon oluşumunun gerçekleştiği ifade edilmektedir (Thuy ve ark., 2015). Çok küçük peptitlerin hızlı bir şekilde ara yüzeye dağılması ve absorblamalarına rağmen, açılma ve yeniden şekillenme eksikliğinden dolayı ara yüzey gerilimini azaltmada etkisiz oldukları düşünülmektedir (Pacheo-Aguilar ve ark., 2008).

2.4.2.3. Köpük Oluşturma

Protein hidrolizatlarının köpük oluşturma özelliğinin, emülsifikasyon özelliği ile birçok ortak noktası bulunmaktadır. Hidrolize proteinler, su-hava ara yüzeyindeki gerilimi düşürerek köpük oluşumunu sağlarlar. Proteinin hidrofobik kısmı havayı çevrelerken hidrofilik tarafın su fazına yayılması ile bu oluşumun şekillendiği düşünülmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000b). Küçük boyutlu peptitler gaz baloncukları etrafında stabil film oluşumunu engelleyebilmektedir. Bu nedenle kısmi hidrolizle büyük boyutlu peptitler elde edildiğinde, baloncuk etrafında oluşan film tabakanın daha dayanıklı özellik gösterdiği bildirilmektedir (Souissi ve ark., 2007; Tanuja ve ark., 2014). Diniz ve Martin (1997), Alcalase enzimi ile elde ettikleri balık protein hidrolizatlarının çözünürlük özelliği bakımından hidrolize edilmemiş proteine ve otolitik hidroliz ürünlerine göre yüksek değer gösterdiğini bulmuşlar; emülsifikasyon kapasitesi bakımından tam tersi durum tespit etmişlerdir. Köpürme özelliği bakımından yalnızca en düşük hidroliz derecesine sahip

(%6,5) Alcalase hidrolizatının yüksek köpürme özelliği gösterdiği görülmüş, ileri seviyede hidrolize olmuş Alcalase hidrolizatlarının otolitik hidroliz ürününden düşük, hidrolize edilmemiş proteinle ise aynı seviyede köpürme özelliğine sahip oldukları belirlenmiştir. Thiansilakul ve arkadaşları (2007b), %0,1'den %3,0'e kadar dört farklı protein konsantrasyonunda hazırladıkları solüsyonlarda, köpürtme sonrasında %23'den %70'e köpük genişlemesi ölçmüşler, ilk 10 dakika içinde en yüksek protein içeriğine sahip hidrolizat solüsyonunun en yüksek seviyede köpürme gösterdiğini, ancak bir sonraki ölçüm süresi olan 40. dakikada ise tüm örneklerin köpük seviyelerinin aralarında fark olmaksızın %10 dolaylarına düştüğünü tespit etmişlerdir. Liceaga-Gesualdo ve Li-Chan (1999) ise, ringa balığı Alcalase hidrolizatlarında hidrolize edilmemiş kontrol örneğe göre başlangıçta yüksek köpürme değeri elde etmişler, ancak 5. dakikadan itibaren kontrol örneklerinin köpük stabilitesi devam ederken hidrolizatların köpük miktarında dramatik düşüş olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar, oluşan köpüğün kısa zamanda azalmasını, protein-protein interaksyonunun yetersizliğine bağlamışlardır. Düşük molekül ağırlığı gibi yapısal protein özelliğinin, hızlı köpük oluşumunu desteklediğini, stabil köpük oluşumunu sağlayan protein-protein interaksyonları için ise bu yapının uygun olmadığını belirtmişlerdir.

2.4.2.4. Su ve Yağ Tutma

Su tutma kapasitesi, proteinin suyu kapma ve protein matriksi içinde yerçekimi kuvvetine karşı alıkoyma yeteneği olarak ifade edilebilir. Bu özellik gıda sistemlerinde tekstürü geliştiren bir özellik olduğu için önemlidir (Kristinsson ve Rasco, 2000b). Genel olarak hidrolize olmuş ve kısmen katlı şekli çözülmüş proteinlerin su tutma kapasitesi, tabii (hidrolize olmamış) proteine göre daha yüksek olmaktadır. Bunun sebebi, daha önce gömülü halde duran hidrofobik bazı grupların hidroliz sonrasında yüzey alanında oransal olarak artış göstermeleri ile açıklanmaktadır (Slizyte ve ark., 2009). Hidrolizatlar kıymalara ilave edildiğinde pişirme kayıplarının azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Wasswa ve ark., 2007). Yağ bağlama kapasitesi, et ve şekerli ürün sektöründe kullanılan katkıları için önemli bir özelliktir. Proteinin hacim yoğunluğu, hidroliz derecesi, enzim-substrat özgüllüğü gibi faktörler, hidrolizatların bu özelliğine etki yapmaktadır (Souissi ve ark. 2007).

Balık protein hidrolizatlarının yağ ve su tutma özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarda, birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Wasswa ve ark. (2007)'nin ot sazanı derisinden Alcalase enzimi ile elde ettikleri hidrolizatların su tutma kapasiteleri, hidroliz derecesi artışına bağlı olarak önemli derecede artış göstermiştir. Hidroliz derecesi %5 iken 1 gram hidrolizat tarafından 2 ml su tutulmuş, hidroliz derecesi %15 olduğunda tutulan su miktarı

da 4,9 ml' ye yükselmiştir. Araştırmacılar tarafından bu yükseliş, hidroliz sırasında artış gösteren COOH and NH₂ gibi polar grupların artışına atfedilmiştir. Aynı çalışmada yağ tutma özelliği ile hidroliz derecesi arasında negatif yönde bir ilişki olduğu bulunmuştur. En düşük hidroliz derecesinde hidrolizat gramı başına 3,6 ml yağ tutulurken, hidroliz derecesi artışıyla bu değer 3,2 ml ve 2,4 ml'ye düşmüştür. Proteinin sahip olduğu ağ sisteminin hidrolizle parçalanmasının, bu özellikte negatif etki yaratabileceği araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir. Sardalya balığı ile yapılan çalışmada ise Alcalase hidrolizatlarının yağ tutma özelliği ile hidroliz derecesi arasında bir ilişki bulunmamıştır. Hidrolize olmamış kontrol protein örneği, gramda 0,72 ml yağ tutarken orta düzey sürede (%9,3 HD) elde edilen hidrolizat yaklaşık 3 kat daha fazla (2,19 ml) yağı absorbe etmiştir (Souissi ve ark. 2007). Diniz ve Martin (1997) ise köpekbalığı alcalase hidrolizatlarında, kontrol ve otoliz ürününe göre daha düşük su ve yağ tutma özelliği tespit etmişler, enzimatik hidrolizin bu özelliklere negatif etki yaptığını ifade etmişlerdir. Sathivel ve arkadaşları (2005), altı farklı enzim kullanarak elde ettikleri somon kafası hidrolizatlarının, hidroliz derecesinden bağımsız olarak her bir gram hidrolizat başına 1,0 ml ila 3,3 ml aralığında su bağladıklarını tespit etmişlerdir. Aynı hidrolizatların 3,7 ml ila 7,8 ml gibi yüksek değerlerde yağ bağlama özelliği gösterdiğini rapor etmişlerdir. Su ve yağ tutma özellikleri açısından araştırmacılar, hidroliz derecesinde olduğu gibi hidrolizde kullanılan enzimlere göre de anlamlı bir ilişki tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

2.4.3. Balık Protein Hidrolizatlarının Biyoaktif Özellikleri

Biyoaktif (biyolojik/fizyolojik olarak aktif) peptitler; *“besin değerine ek olarak vücutta fizyolojik bir etki gösteren, doğal olarak bulunan ya da üretilen gıda kaynaklı bileşenler”* olarak tanımlanmaktadır (Vermeirssen ve ark., 2004). Protein dizisi içindeyken inaktif olan peptitler, sindirim sisteminde ya da işleme sırasında serbest kaldıklarında biyoaktif özellik kazanmaktadırlar. Biyoaktif peptitler genellikle 2-20 amino asit kalıntısına sahip, bazen 20'nin üzerinde kalıntı içeren kısa zincirli peptitlerdir. Bu peptitler, sindirim kanalından dolaşım sistemine geçerek farklı fizyolojik etkiler göstermekte ya da sindirim kanalında lokal etki yaratabilmektedirler. Gıdalardan türetilen biyoaktif peptitler; antihipertensif, antioksidatif, ağrı kesici, immün sistem düzenleyici, antimikrobiyal, probiyotik, mineral bağlayıcı, antitrombotik ve antiproliferatif etkileri kapsayan geniş bir aralıkta fizyolojik fonksiyonlar sergileyebilmektedir (Harnedy ve FitzGerald, 2011; Ryan ve ark., 2011).

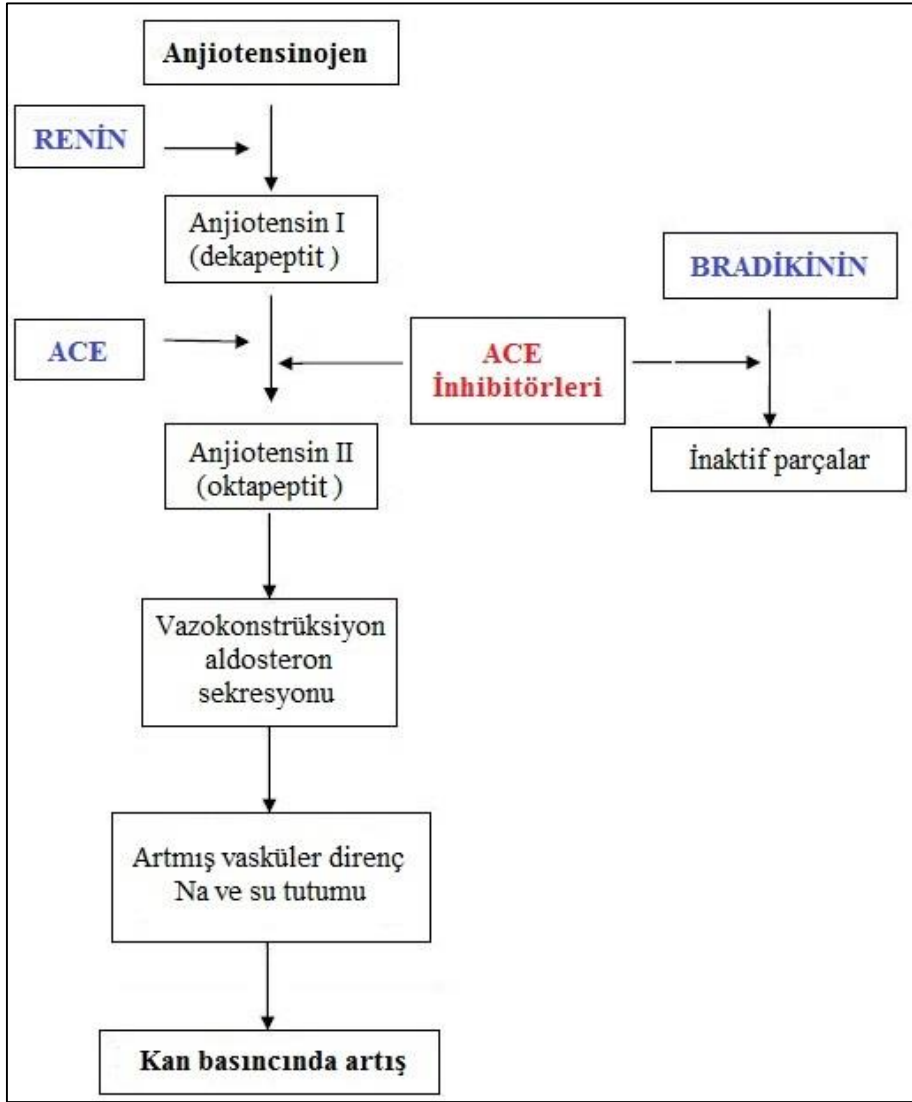
Protein bakımından zengin balıkçılık ürünleri ve işleme atıkları; yapısal özellikleri, amino asit kompozisyonu ve dizilimi bakımından biyoaktif peptitlerin üretilmesinde ideal bir başlangıç materyali oluşturmaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2011; Ngo ve ark., 2012; Chalamaiah ve ark., 2012). Enzimatik olarak bu peptitler; sindirim sisteminde, bakteriyel yıkımla veya çeşitli kaynaklardan elde edilen proteolitik enzimlerin kontrollü şartlarda kullanımıyla oluşabilmektedir. Biyoaktif peptitlerin üretilmesi amacıyla kullanılan en yaygın yöntem ise enzimatik hidroliz olmaktadır (Korhonen ve Pihlanto, 2006).

Balıkçılık ürünlerinden hidrolizle arzu edilen biyolojik aktivitede peptit üretiminin en önemli faktörlerinden biri, peptidin molekül ağırlığı olmaktadır. Boyutsal seçici geçirgenliğe sahip membran filtrelerin kullanıldığı ultrafiltrasyon ile 500, 1.000, 3.000 veya 5.000 Da gibi düşük molekül ağırlıklı peptit gruplarını konsantre halde ayırmak mümkün olabilmektedir. Ultrafiltrasyon veya nanofiltrasyon sonrasında peptitler, hidrofilik ve hidrofobik özelliklerine göre ters faz kolonla, UV veya MS dedektörlü bir HPLC kullanılarak fraksiyonlarına ayrılabilir. Çeşitli aşamalardan geçirilerek saflaştırılan biyoaktif peptitlerin amino asit içeriği ve diziliminin (sekansının) tanımlanması tandem kütle spektrometre ile kombine edilmiş likit kromatografi (LC-MS/MS) cihazı ile gerçekleştirilebilmektedir (Najafian ve Babji, 2012).

Yürütülen çalışmalarda değişik türden denizel organizmalardan elde edilen hidrolizatlarla; anjiyotensin-I dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyon etkisi (antihipertansif etki), antioksidan aktivitesi, antikoagülant ve antimikrobiyal etkileri gibi çeşitli biyoaktif özellikler tespit edilmiştir (Kim ve Wijesekara, 2010).

Yetişkin insanların dörtte birinden fazlasının maruz kaldığı yüksek (hiper) tansiyon, dünyada en yaygın kalp-damar hastalıklarından biridir. Damar sertliği (arteryoskleroz), kalp krizi (miyokard enfarktüsü) ve son safha böbrek yetmezliği için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır (Wilson ve ark., 2011). Anjiyotensin-I-dönüştürücü enzim (ACE, EC 3.4.15.1), C terminalinden His-Leu bağını kopararak inaktif anjiyotensin-I'i, güçlü bir damar daraltıcı (vazokonstriktör) olan anjiyotensin-II'ye dönüştürür. Aynı zamanda damar genişletici (vazodilatör) bradikinin'i inaktive ederek kan basıncının düzenlenmesinde (yükseltilmesinde) hayati rol oynar. Bu arada adrenal korteksten sodyum tutucu aldosteronun da salgılanmasını uyararak kan basıncının yükseltilmesinde üçlü bir etki yaratır (Şekil 2.5). ACE'nin inhibisyonu, Renin Anjiyotensin Sistem (RAS) olarak adlandırılan kan basıncını düzenleyen bu hormonal sistemi başlangıç safhasında kesintiye uğratarak kan basıncının yükselmesini önler. Bu nedenle hipertansiyonun ilaçla tedavisinde sentetik Captopril, Lisinopril, Enalapril, Fosinopril gibi ACE inhibitörü ilaçlar kullanılmaktadır.

Ancak bu ilaçlar; öksürük, tat bozukluğu, deride kızarıklık-kaşıntı ve anjiyönötik ödem gibi yan etkilere sahip olduklarından doğal ACE inhibitörü arayışları da sürmektedir. Bu kapsamda diğer gıda protein hidrolizatları gibi BPH'nın da ACE inhibisyon aktivitesi yoğun olarak incelenmektedir. (Vercruyssen ve ark., 2005; Kim ve Wijesekara, 2010; Ngo ve ark., 2012; He ve ark., 2013).



Şekil.2.5. Renin anjiotensin sistemi (Wilson ve ark., 2011)

BPH'nın ACE inhibisyon aktivitesi genelde in-vitro çalışmalarla test edilmektedir. Bazı çalışmalarda, ACE enzimi inhibisyon derecesi % olarak verilirken, bazılarında mevcut enzimin yarısını inhibe eden peptid konsantrasyonu (IC_{50}) olarak ifade edilmektedir. Byun ve Kim (2001), Alaska morinası balığının derisinden elde ettikleri jelatin hidrolizatlarını önce ultrafiltrasyona tabi tutmuşlar, 1 kDa ve daha küçük boyutlu fraksiyonun, büyük

boyutlu filtratlara göre en yüksek ACE inhibisyon aktivitesi (IC_{50} ; 0,63 mg/ml) gösterdiğini tespit etmişlerdir. Üç aşamalı saflaştırma işlemi sonrasında gerçekleştirilen tanımlama ile Gly-Pro-Leu dizilimine sahip tripeptidin en yüksek aktiviteye (IC_{50} ; 0,85 μ g/ml) sahip olduğunu bulmuşlardır. Theodore ve Kristinsson (2007)' nun kanal yayın balığı protein izolatlarından protamex enzimi ile hazırladıkları %5 hidroliz derecesindeki hidrolizatlarda, peptitlerin yaklaşık %90'ının 20 kDa'dan düşük molekül ağırlığına sahip olduğu, %15 ve %30 hidroliz derecesine sahip hidrolizatlarda bu oranın sırasıyla %93 ve %99'a ulaştığı kaydedilmiştir. İlgi çekici şekilde %5 hidroliz derecesinde, yüksek düzeyde (%90,6) ACE inhibisyonu elde edilirken; %15 ve %30 hidroliz derecelerinde önemli derecede düşük (sırasıyla %70,0 ve %73,9) inhibisyon oranları tespit edilmiştir. Yüzde 15 ve %30 hidroliz derecesine ait örneklerin ACE inhibisyonu aktivitelerinde önemli bir farklılık bulunmamıştır. Bu çalışmadaki bulguların bir özelliği, izolattan türetilen hidrolizatlar oldukları için yalnızca miyofibriller proteinlerden oluşan peptitlerin özelliklerini yansıtmasıdır. Ahn ve arkadaşları (2012) ise somon balığı işleme atıklarından 6 farklı enzimle hazırladıkları hidrolizatlardan (1 mg/ml konsantrasyonda) en yüksek ACE inhibisyon aktivitesini Alcalase, Protamex ve Pepsin hidrolizatlarının (sırasıyla; %56, %50 ve %23) gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada iyon değişim kolonu ile likit kromatografi kullanılarak 4 fraksiyon elde edilmiş, en yüksek aktivite gösteren (IC_{50} ; 0,17 mg/ml) ikinci fraksiyon saflaştırma amacıyla jel filtrasyon kolon kromatografisine tabi tutulmuştur. Toplanan porsiyonlardan en yüksek aktiviteyi gösteren (IC_{50} ; 0,14 mg/ml) pik, ileri saflaştırma amacıyla iki kez RP-HPLC ve ODS C18 kolon kullanılarak fraksiyonlarına ayrılmıştır. Hydrid Quadrupole-TOF LC/MS/MS mass spektrometre ile yürütülen sekans analizinde 6,79 μ g/ml IC_{50} değeri ile en yüksek aktiviteyi gösteren peptit, Phe-Asn-Val-Pro-Leu-Try-Glu şeklinde tanımlanmıştır. Roslan ve arkadaşları (2014) ise, konuya amino asit kompozisyonu etkisi yönünden yaklaşmışlardır. Alcalase enzimi ile 120 dakikalık hidrolizle tilapya balığı işleme atıklarından elde ettikleri %20 HD'ne sahip hidrolizatların 1-26 kDa aralığında peptit içeriğine sahip olduğunu ve %88 düzeyinde ACE inhibisyonu gösterdiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından toplam amino asit içeriğinin yaklaşık yarısına denk gelen hidrofobik amino asitlerin bu etkiye büyük katkı yapmış olabilecekleri ifade edilmiştir. Bu örnekler bakıldığında balık protein hidrolizatlarının antihipertensif etkisi bakımından önemli bir potansiyele sahip olduğu ve in-vivo çalışmalarla bu potansiyelin kullanım imkânlarının daha geniş şekilde araştırılması gerektiği görülmektedir.

Serbest radikaller, çift oluşturmamış kararsız elektronlara sahip, yüksek düzeyde komşu moleküllerle reaksiyona girme eğiliminde oksijen atomlarıdır. Doğal olarak metabolik faaliyetler esnasında üretilir ve vücudun savunma sistemi ile kontrol altında tutulurlar. Lipidler, proteinler ve DNA gibi makromoleküllere saldıran serbest radikallerin zincirleme reaksiyonlarla kontrolsüz bir şekilde çoğalması ise; kanser, şeker hastalığı, nörolojik dejenerasyon hastalığı ve yangılı doku hasarlanmalarına sebep olabilmektedir (Kim ve Wijesekara, 2010; He ve ark., 2013). Gıda endüstrisinde ise yağ içeren gıdalarda işleme ve depolama sürecinde arzu edilmeyen ikincil lipid peroksidasyonu ürünleri oluşmaktadır. Bu nedenle gıda ve kozmetik sanayinde oksidasyonu önlemek amacıyla BHT (butillendirilmiş hidroksitoluen), BHA (butillendirilmiş hidroksianisol), TBHQ (tersiyer butilhidrokinon), PG (propil gallat) gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Potansiyel sağlık tehlikelerinden dolayı, sentetik antioksidanların yerine doğal antioksidanlar tercih edilmekte ve bu amaçla BPH, önemli bir kaynak olarak görülmektedir (Chalamaiah ve ark., 2012; Ngo ve ark., 2012).

Antioksidanlar, oksidasyonu önemli derecede geciktiren veya önleyen maddelerdir. Bu haliyle de insan sağlığı üzerinde önemli pozitif etkileri bulunmaktadır (Chalamaiah ve ark., 2012). Peptitlerin antioksidan aktivite mekanizması tam olarak aydınlatılamamakla birlikte araştırmalar, protein hidrolizatlarının radikal temizleyici ve geçiş metallerinin şelatlayıcısı olarak davrandıklarını ve bu şekilde antioksidan etki yarattıklarını ortaya koymaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2011). BPH üzerinde bu özelliklerin araştırıldığı çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Klompong ve arkadaşları (2007), sarı çizgili trevali balığı hidrolizatlarının antioksidatif özelliklerini belirlemek amacıyla DPPH radikal temizleme aktivitesini test etmişler; Alcalase enzimi kullanılan en düşük hidroliz derecesindeki hidrolizat örneğinin, en yüksek aktiviteyi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Thiansilakul ve arkadaşları (2007b), *Decappterus maruads* balık hidrolizatlarının antioksidatif aktivitesini; DPPH radikal temizleme aktivitesi, indirgeme gücü ve Fe^{+2} şelatlama aktivitesi şeklinde üç noktadan test etmişlerdir. Bu üç aktivite testine ait sonuçlar sırasıyla %59,9, %1,01 ve %58,2 olarak tespit edilmiştir. Orkinos balığı omurgası hidrolizatları ile yapılan bir çalışmada ise antioksidan aktivitesi hidroksil radikal temizleme, süperoksit radikal temizleme ve lipid peroksidasyon inhibisyonu açısından test edilmiş, saflaştırma ve sekans analizi sonucunda 1519 Da molekül ağırlığında 14 amino asit kalıntısına sahip peptit, en aktif peptit olarak izole edilmiştir (Je ve ark., 2007). Souissi ve arkadaşları (2007) ise, sardalya balığı işleme atıkları hidrolizatlarında, linoleik asit otooksidasyon inhibisyonu ile test ettikleri antioksidan aktivitesinde, en yüksek hidroliz

derecesinde (%10,2) en yüksek aktiviteyi (%59,1) elde etmişlerdir. En düşük hidroliz derecesinde (%6,6) ise bu değer % 51,0 olarak tespit edilmiştir. Je ve arkadaşları (2007) tarafından izole edilen en aktif peptidin lipid peroksidasyon inhibe yeteneği (%85), Souissi ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında test edilen α -tokoferolden (%80) daha yüksek bulunmuştur. Bu da bilinen antioksidanların yanında balık protein hidrolizatlarının önemli bir etkiye sahip olduğunu, ancak saflaştırma işlemleri ile etkili peptitlerin izole edilmesi gerektiğini göstermektedir. Bunu doğrular şekilde Hsu (2010) yaptığı çalışmada, orkinos balığı koyu renkli etinin hidrolizatlarında kolon kromatografisi ve iki adımlı HPLC prosedürleriyle saflaştırdıkları 756 Da ağırlığındaki peptidin, %85,2 DPPH temizleme aktivitesiyle, %88,6 olan askorbik asite yakın antioksidan özellik gösterdiğini bulmuştur. Zhang ve arkadaşları (2012) ise, tilapya jelatin hidrolizatlarında DPPH, hidroksi radikal ve süperoksit anyon radikal temizleme aktiviteleri ile antioksidan kapasitesini test ettikleri çalışmada; bu özelliklere ait IC₅₀ değerlerini sırasıyla 3,66 mg/ml, 0,74 mg/ml ve 0,56 mg/ml olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada hidroksi radikal temizleme aktivitesi, çok aşamalı saflaştırma aşamaları sonunda büyük oranda iyileşerek 4,61 μ g/ml IC₅₀ değerine ulaşmıştır. Morina hidrolizatları ile yapılan başka bir çalışmada ise elde edilen hidrolizatlar; molekül ağırlığı bazında ayırım yapan membran filtrelerden (MWCO) geçirilerek önce üç alt grup örneğe, sonrasında <3 kDa ve 3-5 kDa gruplar da süper ince kolonla (size exclusion) sırasıyla 10 ve 7 fraksiyona ayrılmıştır. Bu fraksiyonlarda antioksidan aktivitesi; DPPH radikal temizleme aktivitesi, indirgeme gücü ve Fe⁺² şelatlama aktivitesi olarak ayrı ayrı test edilmiştir (Farvin ve ark., 2016). Farvin ve arkadaşlarının çalışmasında; antioksidatif serbest amino asitlerin (örneğin Lys, Met ve His) bütün fraksiyonlarda bol olarak bulunduğu, 3-5 kDa ve <3 kDa gruplarında çok sayıda peptit tanımlandığı, bunlardan Glu, Gly, Lys, Ala, Arg, His, Tyr, Pro ve Phe içerenlerin yüksek DPPH temizleme aktivitesi ve indirgeme gücü gösterdiği, tüm fraksiyonların iyi bir şelatlama yeteneğine sahip oldukları belirlenmiştir.

Yukarıda verilen tüm çalışmalarda balık protein hidrolizatlarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları görülmektedir. Ancak çalışmalar arasında kullanılan test yöntemlerinin farklı olması ya da aynı yöntemde sonuçların ifadesinde farklılıklar olmasından dolayı, literatürdeki verilerin kıyaslanmasında güçlük yaşanmaktadır. Bununla birlikte genel olarak çalışmalarda; balık işleme atıklarından elde edilen hidrolizatların da güçlü antioksidan özelliği gösterdiği, peptitlerin boyutları küçüldükçe antioksidan aktivitesinin yükseldiği, aktif peptitler saf olarak izole edildiğinde ise en yüksek aktivite derecesine ulaşıldığı görülmektedir.

2.5. Balık Protein Hidrolizatlarının Kullanımı ve Karşılaşılan Güçlükler

Enzimatik hidroliz yoluyla balıkçılık ürünlerinden üretilen balık protein hidrolizatlarının; takviye edici gıda olarak besleyici özellikleri, gıda katkı maddesi olarak kullanımına yönelik fonksiyonel özellikleri ve farmakoloji alanında kullanımına yönelik biyoaktif özellikleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bugüne kadar elde edilen veriler; balık protein hidrolizatlarının günümüzde ve gelecekte kullanımı açısından ümit verici niteliktedir.

Soya ve süt orijinli proteinlerin hâkim olduğu hidrolizat pazarında şimdilik balık proteinlerinin kullanımı sınırlıdır. BPH, Avrupa’da ve ABD’de daha çok besicilikte süt yerine veya süttten kesilen hayvanların beslenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca tahıl menşeyli gıdalarda, çorbalarda, ekmeklerde ve krakerlerde protein katkısı amacıyla kullanılmaktadır (Shirai ve Ramirez-Ramirez, 2011). Nordik ülkelerinde (Danimarka, Finlandiya, İzlanda, Norveç ve İsveç) üretilen balık protein hidrolizatlarının büyük kısmı, yem ve evcil hayvan yemi (pet-food) olarak kullanılmaktadır. Bu ülkelerde BPH ile zenginleştirilmiş gıda ürünü bulunmamasının en önemli sebebinin, katı Avrupa Birliği (AB) mevzuatı olduğu düşünülmektedir (Arason ve Ark., 2009). Bununla beraber son dönemde tüm Avrupa’da artan desteklerle, fabrika sayısı ve BPH üretimi artmaktadır. Fransa Boulogne’daki bir fabrika, yıllık 8000 ton üretimle, Avrupa’da birinci sıradadır. Norveç’te kurulan yeni fabrikalarla gelecek dönemde üretim miktarlarında önemli artışlar beklenmektedir (Karadeniz ve Kim, 2014).

BPH’nın sağlık alanında kanıtlanmış biyoaktif özelliklerine bağlı kullanımı ise Avrupa ve Kuzey Amerika’da bulunmamaktadır. Ancak Japonya’da bu tür ürünlere ilgi yüksektir. Örneğin Japon yetkili birimleri tarafından onaylanmış kurutulmuş palamut balığı hidrolizatı olan “Katsuobushi oligopeptide”, PEPIDE ACE 3000 markası ile Japonya’da satılmaktadır. Aynı ürün ABD ve Kanada’da Vasotensin®, PeptACE™ ve Levenorm™ markasıyla pazarlanmaktadır. Japonya’da üretilen diğer ticari ürün, sardalya balığı eti hidrolizatı olan SP100N, Japonya’da diğer içecek ürünleri ile birlikte LAPIS SUPPORT adıyla, kan basıncını düşürücü etkisi ile satılmakta, pazarlanmaktadır. Bağırsak sistemini düzenleyici olarak 1994 yılından bu yana ABD pazarında olan Seacure® markalı ürün ise beyaz etli balık protein hidrolizat konsantresi olarak piyasada bulunmaktadır. Bundan başka Norveç’te morina balığından üretilen peptit tozu Nutripeptin® kan şekeri düzenleyicisi olarak, Fransa’da Protizen™ ise balık biyoaktif peptit içeriği ile sakinleştirici etkiye sahip ürün olarak pazarlanmaktadır (Arason ve ark., 2009; Thorkelson ve Kristinsson, 2009;

Hayes, 2013). Balık protein hidrolizatlarının biyoaktif özellikleri sebebiyle daha birçok örneği pazarda yer almakta ve pazara giren ürün sayısı her geçen gün artmaktadır.

BPH'nın yasal statüsüne baktığımızda farklı uygulamalarla karşılaşılmaktadır. BPH'nın hangi hammaddeden üretildiği, ne amaçla kullanılacağı ve nasıl kullanılacağı önemle irdelenmektedir. Literatürde BPH üretiminde işleme atıklarının kullanılması ürünün farklı kategorilere girmesine neden olmaktadır. Örneğin, Batista ve Pires (2011)'e göre; balık işleme atıkları Avrupa Birliği EC 1069/2009 numaralı direktifinde yer alan kategori 3 sınıfına girmekte, bu direktife göre hayvansal kaynaklı olduklarından insan tüketiminde kullanılamamaktadır. İşleme atıklarından balık proteinleri veya peptitler üretildiğinde; mikrobiyolojik ve kimyasal bulaşmanın önlenmesi ve kontrolü açısından EC No 178/2002 Yönetmeliği'ne uygun olması gerekmektedir (Thorkelsson ve ark., 2008). Bu yönetmelik tüm gıdalar için genel gıda güvenliği kriterlerini içermekte, BPH ürünleri de bu kapsama girmektedir. BPH üretiminde ayrıca gıda maddelerinin mikrobiyolojik kriterleri ile ilgili EC 2073/2005 Yönetmeliği'ne de uyulması istenmekte, dolayısıyla üretim, dağıtım ve depolama süreçlerinin HACCP temelli prosedürlere ve hijyen gerekliliklerine uygun olması gerekmektedir. Gıda katkı maddesi olarak kullanımlarında, yasal düzenlemelerde ve sektörel rehber dokümanlarda farklılıklar bulunmasına rağmen balık bazlı katkı maddeleri için genel yaklaşım tek tiptir (Arason ve ark., 2009). Eklenen bileşen (örneğin protein), nihai ürünün bir parçası olduğundan etikette mutlaka belirtilmelidir. Burada esas ürüne eklenen balık bazlı katkının orijini olan tür ile esas ürünün orijini olan tür aynı ise etikette belirtme zorunluluğu bulunmamaktadır. Bu yaklaşımda katılan bileşenin nasıl üretildiği önemli olmayıp, orijinine odaklanılmıştır. Hâlbuki tür konusu dışında, kullanılan işleme teknolojisine göre ürün (kıyma, izolat, hidrolizat gibi) özellikleri de önemli ölçüde değişmektedir. ABD ve Kanada'da yasal düzenlemeler; balık ürünlerinde protein uygulamaları ve yeni ürünler için onay alma sürecini zorunlu kılmaktadır. Örnek olarak FDA, aynı tür balıktan ekstrakte edilen balık proteinlerinin, filetolara enjeksiyonu konusunda bazı başvurulara "genel olarak güvenli kabul edilen" GRAS (Generally Recognized as Safe) statüsü vermiştir (Arason ve ark., 2009). Avrupa Birliği açısından durum karışık olmakla birlikte özellikle fonksiyonel özellikte gıdaların EFSA'dan (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi) onay alması zorunlu tutulmaktadır (Hayes, 2013).

Bunun yanında hayvan yemi olarak kullanılacak hidrolizatların dioksin içeriği açısından 2006/13/EC komisyon direktifine uygun olması, 505/2012 numaralı Avrupa Komisyonu uygulama tüzüğüne göre yalnızca genç memeli hayvanların beslenmesinde kullanılması öngörülmektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmamızda materyal olarak hamsi, *Engraulis encrasicolus* kullanılmıştır (Şekil 3.1). Balıklar Mart 2014 tarihinde Ege Denizi'nden avlanmış, aynı gün buzlanmış kasalarda soğutuculu araçla Çanakkale'ye getirilmiştir. Bir gece 1 °C'de tutulan balıklardan yaklaşık 15 kg alınmış ve strafor kutularda buz içinde laboratuvara getirilmiştir. Hidroliz öncesinde balıklar yıkanarak ayıklanmış; bu işlem sonucu et ve atık olmak üzere iki grup çalışma materyali elde edilmiştir.



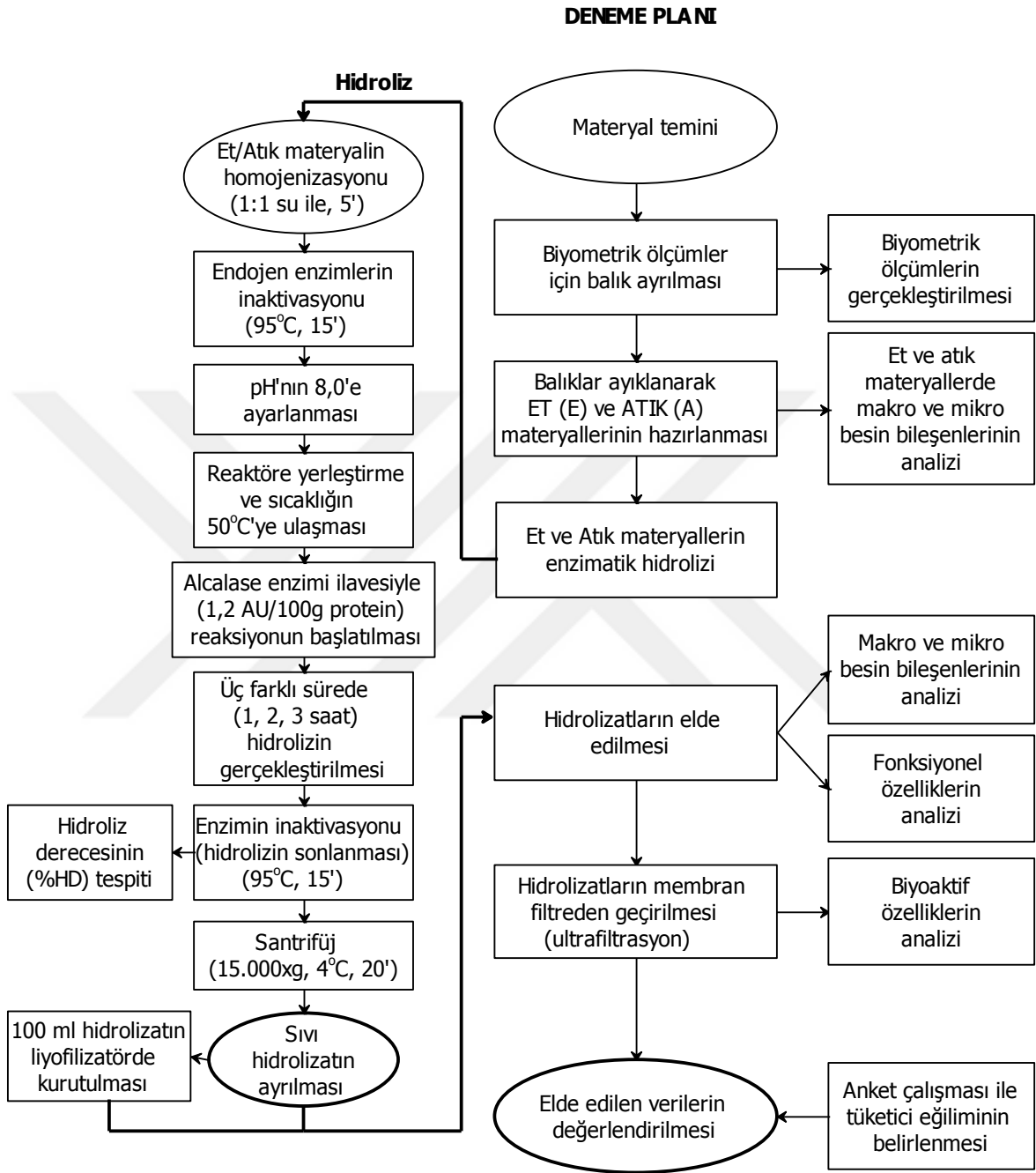
Şekil 3.1. Hamsi (*Engraulis encrasicolus*)

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneme Planı

Denemede öncelikle materyal olarak kullanılan hamsinin biyometrik ölçümleri (ortalama ağırlık, ortalama toplam boy, et verimi) yapılmış, hamsinin ayıklanmasıyla elde edilen et ve atık materyallerde ise tanımlayıcı ve besleyici özellikleri ortaya koyan analizler (su, yağ, protein, kül, tuz analizleri; mineral kompozisyonu, amino asit kompozisyonu, biyojen amin ve SDS-PAGE analizleri) gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hamsiden elde

edilen et ve atık materyaller, 3 farklı sürede ve 3 tekrarlı olarak enzimatik protein hidrolizine tabi tutulmuştur.



Şekil 3.2. Deneme Planı

Tüm hidroliz işlemlerinde Alcalase® enzimi kullanılmış ve enzime özgü reaksiyon şartları (pH 8, 50°C) sabit tutulmuştur. Elde edilen hidrolizatların özellikleri üzerine materyal tipi (et ve atık) ve hidroliz süresi (1, 2 ve 3 saat) faktörlerinin etkisi incelenmiştir. Hidroliz işlemi sonlandırıldığında öncelikle hidroliz derecesi belirlenmiştir. Çalışmada 2

farklı materyalden, 3 farklı sürede, 3 tekrarlı hidroliz işlemi ile 18 adet hidrolizat elde edilmiştir. Hidrolizatlarda önce tanımlayıcı ve besleyici özellikleri ortaya koyan analizler (su, yağ, protein, kül, tuz analizleri; mineral kompozisyonu, amino asit kompozisyonu, biyojen amin ve SDS-PAGE analizleri) gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hidrolizatların fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi amacıyla; protein çözünürlüğü, emülsifiye aktivitesi, emülsiyon stabilitesi, köpük genişlemesi, köpük stabilitesi, su tutma kapasitesi ve yağ tutma kapasitesi analizleri yürütülmüştür. Biyoaktif özelliklerin analizi öncesinde hidrolizatlar, 5 kDa geçirgenliğe sahip membran filtreden süzülerek (ultrafiltrasyon), 5 kilodaltondan küçük molekül ağırlığına sahip hidrolizat örnekleri elde edilmiştir. Biyoaktif özellikler; hem ultrafiltrasyona tabi tutulmuş bu hidrolizatlarda, hem de orijinal hidrolizatlarda gerçekleştirilmiştir. Biyoaktif özellikler kapsamında; anjiotensin-I dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyon aktivitesi, DPPH radikali temizleme aktivitesi ve Fe⁺² şelatlama aktivitesi analizleri yürütülmüştür. Yapılan bu çalışmalara ek olarak, araştırma sonuçlarının kabul görme potansiyelini analiz etmek için, bir anket faaliyeti ile tüketicilerin su ürünleri işleme atıklarından üretilen gıdalara nasıl baktıkları da tespit edilmeye çalışılmıştır. Deneme planı, ana hatları ile Şekil 3.2’de sunulmuştur.

Hidrolizatların liyofilizasyonu ve amino asit kompozisyonu analizleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde, SDS-PAGE analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Uygulama ve Araştırma Merkezinde, diğer analizler Çanakkale Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü’nde gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Hidroliz

Çalışma materyali hamsi, laboratuvara getirildikten sonra yıkanmış, suyun süzülmesi için 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra ayıklama işlemine geçilerek marinata işlenecekmiş gibi baş, iç organlar ve omurga kısmı ayrılmıştır. Bu şekilde hidroliz işleminde kullanmak üzere “E” ile kodlanan ET (fileto) materyali ile “A” ile kodlanan ATIK materyali olmak üzere iki materyal grubu elde edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Hamsinin ayıklanması ile hazırlanan atık ve et materyalleri

Hazırlanan et ve atık materyalleri yüksek hızda parçalayıcı (Robot Coupe R5 V.V.) kullanılarak homojen hale getirilmiş (Şekil 3.4), tanımlayıcı analizler için numune ayrıldıktan sonra 250'şer gramlık porsiyonlar halinde polietilen torbalara tartılarak hidroliz işlemi için -50°C 'de muhafaza altına alınmıştır.



Şekil 3.4. Atık materyalin hidroliz için homojenizasyonu

Üstten motorlu mekanik karıştırıcı (Heidolph RZR 2020), su banyosu (Funke Gerber WB336-D), sıcaklık sensörlü ATC probu olan pH metre (WTW Inolab pH7110), sıvılı cam termometreden oluşan reaktör sistemi kurulmuş (Şekil 3.5), homojenize edilmiş balık eti (E) veya atıklarından (A) alınan 250 gramlık porsiyon aynı miktar saf su ile 5 dakika süreyle karıştırılmıştır. Elde edilen karışım 95°C 'de 15 dakika tutularak materyallerdeki endojen enzimler inaktive edilmiştir. Bu işlem sonrası pH, 2N NaOH (Sodyum hidroksit; Merck 109136) kullanılarak 8,0'e getirilmiştir. Enzim/substrat oranı 1,2 AU/100g protein (%0,5 m/m) olacak şekilde Alcalase® enzimi (Sigma P4860) kullanılarak; pH değeri 8,0 ve

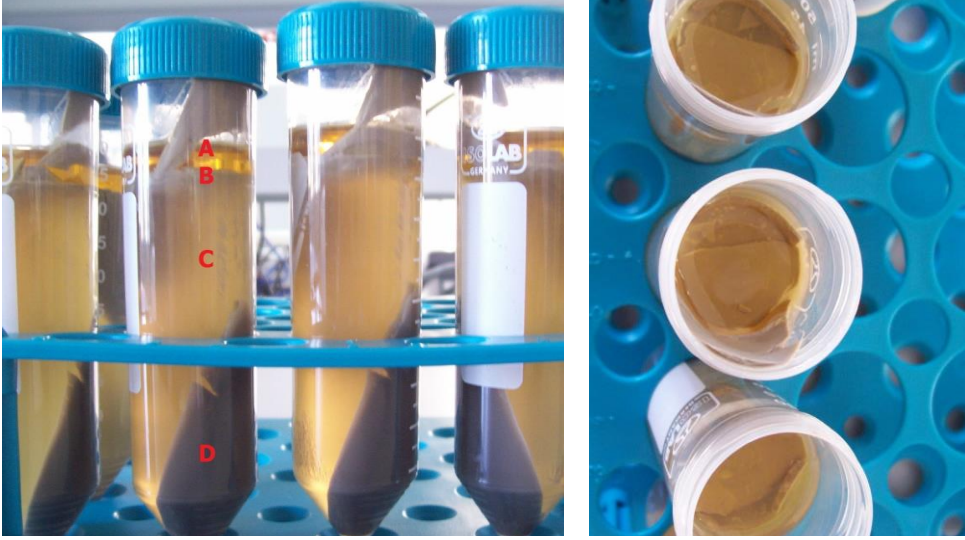
sıcaklık değeri 50°C’de sabit tutularak 3 farklı sürede (1, 2 ve 3 saat) hidroliz gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon süresince pH devamlı izlenmiş, 7,9’a geldiğinde 2N NaOH ilave edilerek reaksiyon karışımı pH’sının 7,9-8,0 aralığında kalması sağlanmıştır. Deneme süresi sonunda reaksiyon karışımı 95°C’de 15 dakika tutularak kullanılan enzim inaktif hale getirilmiş ve hidroliz sonlandırılmıştır.



Şekil 3.5. Hidroliz reaktörü

Hidroliz sonrası reaksiyon karışımlarından hidroliz derecesinin (HD) tespiti amacıyla örnek alınmış, kalan karışım 4°C’de 15.000 xg’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üstte yağ tabakası, hemen altında bir zar tabakası, ortada çözünür formda protein hidrolizatı ve en altta çözünmeyen katı kısım olmak üzere 4 katman elde edilmiştir (Şekil 3.6). Ortada yer alan protein hidrolizatı 50 ml’lik pipet kullanılarak alınmıştır. İki farklı grupta, 3 farklı sürede, 3 tekrarlı olarak yürütülen hidroliz işlemleri sonrasında 18 adet, miktarları 205 ml ile 245 ml arasında değişim gösteren hidrolizat (3xA1, 3xA2, 3xA3, 3xE1, 3xE2, 3xE3) elde edilmiştir.

Elde edilen hidrolizatların 100 ml’lik kısmı dondurularak kurutma (liyofilizasyon) işlemine tabi tutulmuştur. Hidrolizatlar 2 grup halinde liyofilizatörde (Christ Alpha 1-2 LD Freeze Dryer) yaklaşık 80 saat süre ile tutulmuştur. Kurutma işlemi sonrasında her örnekten ortalama 8 gram kurutulmuş hidrolizat elde edilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.6. Santrifüj sonrası hidroliz karışımındaki fazların görünüşü. Soldaki fotoğrafta; (A) yağ, (B) düşük yoğunluklu partiküllerin oluşturduğu zar, (C) çözülmüş protein karışımından oluşan hidrolizat, (D) çözünmemiş katı kısım

Biyoaktif analizler için sıvı hidrolizatlar, 5 kDa'dan küçük molekül ağırlık geçirgenliği olan (5000 Da Molecular Weight Cut-Off) polietersülfon (PES) yapısında membran filtreden (Sartorius Vivaspin 20, 5000 MWCO PES) geçirilmiştir. Ultrafiltrasyon işlemi; 14 ml örnek içeren membran filtrelili, iki parçalı santrifüj tüplerinin 3 saat süresince 2°C'de, 8000 xg'de santrifüj (Sigma 3-18K) edilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında 5 - 7,5 ml filtrat (<5 kDa) elde edilmiş, yürütülecek biyoaktif analizlerin hesaplamalarında kullanılmak üzere filtratların protein ve kurumadde içerikleri tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. Kurutulmuş atık ve et hidrolizatları

3.2.3. Yürütülen Ölçüm ve Analizler

3.2.3.1. Biyometrik Ölçümler

Ayıklama öncesi rastgele alınan 100 adet hamside ortalama boy ve ağırlık belirlenmiş, ayrıca % et verimi hesaplanmıştır.

Toplam boy, ağzı kapalı balığın alt çenesinin ön ucu ile kuyruk yüzgecinin bitimi arasındaki en uzun mesafenin 1 mm taksimatlı ölçüm tahtası ile ölçümü şeklinde belirlenmiştir. Toplam ağırlık, yıkandıktan sonra 15 dakika suyu süzülen balıkların 1 mg hassasiyetteki dijital terazide tartımı ile belirlenmiştir.

Ayıklama öncesinde balıklar bütün olarak tartılmış (m_t), ayıklama sonrasında ayrılan et materyal ayrıca tartılarak (m_e) aşağıdaki formüle göre et verimi hesaplanmıştır (Erkoyuncu ve ark. 1994).

$$\% \text{ Et verimi} = m_e / m_t \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.3.2. Makro Besin Kompozisyonu Analizleri

Temel besin bileşenleri analizleri en az üç paralel yapılmıştır. Rutubet analizi ISO 1442 (1997)'ye göre 100°C'de sabit ağırlığa gelinceye değin kurutmaya, yağ analizi TS 1744 (1974)'e göre asitle muamele sonrası petrol eteri ekstraksiyonu ile, kül analizi ISO 936 (1998)'ya göre 550°C'de yakma ve külleştirme metodu ile, tuz analizi ISO 1841-1 (1996)'e göre titrimetrik yöntemle, protein analizi ise AOAC (2003)'ye göre LECO FP-528 tam otomatik protein cihazında yakma metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Protein çözünürlüğünün tespiti kapsamında yürütülen protein analizleri spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır (Lowry ve Ark., 1951).

3.2.3.3. Mineral Kompozisyonu Analizleri

Örneklerden yaklaşık 1 gram tartılmış, 8 ml %65 nitrik asit (HNO₃, Merck 100441) ve 2 ml %30 hidrojen peroksit (H₂O₂, Fluka 16911) ile karıştırılarak mikrodalga çözümleme sisteminde, 220 psi basınç altında, 180°C' de toplam 30 dakika (yükselme+bekleme süresi) tutularak analiz için hazır hale getirilmiştir (TS EN 13805: 2004). Hazırlanan numunelerin mineral içerikleri [Ca (kalsiyum), K (potasyum), Mg (magnezyum), Na (sodyum), P (fosfor), Fe (demir), Al (alüminyum), As (arsenik), B (bor), Cr (krom), Cu (bakır), Mn (mangan), Ni (nikel), Se (selenyum), Cd (kadmiyum), Co (kobalt), Pb (kurşun), Sn (kalay) ve Zn (çinko)] NMKL (Nordic Committee on Food Analysis) prosedürleri baz alınarak oluşturulan analiz metodu kullanılarak ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission

Spectrometry) cihazı (Perkin Elmer Optima 7000DV) ile tespit edilmiştir. Element düzeyinde dalga boyları 189,927 nm ile 766,490 nm (As – K) arasında seçilmiş, tüm mineraller için plazma parametreleri; Plas. L/min: 17, Aux L/ min: 0,2, Neb L/ min: 0,65, Power Watts: 1450, View Dist. 15,0 olarak sabit tutulmuş, plazma pozisyonu (view) B, P, Sn, Mg, Ca, K, Na için “radial”, diğerleri için “axial” olarak ayarlanmıştır. Kullanılan yazılım tarafından her bir mineral pikinin yedi noktadan integrasyonu yapılmış, her analiz günü alan (area) değerleri baz alınarak çizilen kalibrasyon kurvesi üzerinden miktar hesaplamaları yapılmıştır. Analizler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.4. Amino Asit Kompozisyonu Analizleri

Amino asit kompozisyonu; et ve atık materyali ile kurutulmuş hidrolizat örneklerinde total ve serbest amino asit olarak ayrı ayrı belirlenmiştir. Toplam amino asit analizinde yaklaşık 30 mg protein içerecek şekilde ısıya dayanıklı vida kapaklı cam şişelere tartılan örneklere, 20 ml 6N HCl ilave edilmiş ve azot gazı geçirildikten sonra 110°C’de 24 saat hidroliz edilmiştir. Hidrolizi yapılan örnekler 0,20 µm PTFE şırınga filtreden süzölmüş ve HCl, evaporatörde yüksek vakum altında 60°C’de uçurularak; geriye kalan kalıntı pH’sı 2,2 olan sodyum sitrat tampon çözeltisiyle (0,1M, pH 2,2) seyreltilmiştir. Hidroliz işlemi tamamlanmış örneklerin amino asit miktarlarının tespiti için EZ: Faast GC/FID Free (Physiological) Amino Asit Kitleri kullanılmıştır. Bu yöntem, katı faz ekstraksiyonu, türevlendirme ve sıvı/sıvı ekstraksiyonu aşamalarından oluşmaktadır. Hazırlanan ve türevlendirilen örnekler GC’de analiz edilmiştir. İnternal standart (IS) olarak Norvaline kullanılmış ve konsantrasyonu örneklerde 200 nmol/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Serbest amino asit analizleri, yukarıda tanımlanan hidroliz işlemi ihmal edilerek diğer işlemlerin uygulanması ile gerçekleştirilmiştir.

GC cihazının konfigürasyonu ve kromatografik koşullar;

Gaz Kromatografisi: Finnigan Trace GC Ultra AI 3000 Thermo Finnigan analyzer

Kolon: Zebron Zebron™ ZB-HAAC 10 m x 0,25 mm kapilari GC kolon.

Split 1:15 (250°C)

Enjeksiyon Miktarı: 2,0 µl

Taşıyıcı gaz: Helyum 1,0 ml/dk.

Sıcaklık programı: 110°C ile 320°C arası artış 35°C/dak., 320°C’de 1 dak. bekle

Dedektör: Alev iyonizasyon dedektörü (FID; 320°C)

Kalibrasyon: Çoklu amino asit standartı (EZ:fast SD solution)

Amino asit sonuçları elde edildikten sonra hidrolizatların kimyasal skor değerleri hesaplanmıştır. Bu amaçla önce kurumadde bazında, tüm hidroliz derecelerinin ortalaması şeklinde, et ve atık hidrolizatlarının Valin, Lösin, İzolösin, Treonin, Metiyonin+Sistein, Fenilalanin+Tirozin, Lizin ve Histidin amino asit değerleri mg/g-protein düzeyinde hesaplanmıştır. Sonrasında FAO tarafından bu amino asitler için farklı yaş grupları için önerilen değerler (Çizelge 3.1) kullanılarak aşağıdaki formül ile amino asit kimyasal skoru hesaplanmıştır (Seligson ve Mackey, 1984):

$$\text{Amino Asit \% Kimyasal Skoru} = \text{TAA}_H / \text{AA}_R \times 100 \quad (3.2)$$

Burada;

TAA_H: Hidrolizatlardaki seçili amino asit değeri (mg toplam AA/g protein)

AA_R: Seçili amino asit için önerilen referans değer (mg/g protein)

Çizelge 3.1. Amino asit tüketiminde önerilen referans model (FAO, 1985)

Amino asit	Yaş gruplarına göre önerilen amino asit miktarları (mg/g protein)		
	2-5 Yaş	10-12 Yaş	Yetişkin
Valin	35	25	13
Lösin	66	44	19
İzolösin	28	28	13
Treonin	34	28	9
Metiyonin+Sistein	25	22	17
Fenilalanin+Tirozin	63	22	19
Lizin	58	44	16
Histidin	19	19	16

3.2.3.5. Biyojen Amin Analizleri

Biyojen amin (putresin, kadaverin, histamin) analizleri, perklorik asitle ekstrakte edilen aminlerin alkali ortamda dansil klorür ile türevlendirilmesi sonrasında, dansile edilen aminlerin UV-DAD dedektörlü HPLC’de (Agilent 1100 Series) tespiti şeklinde yürütülmüştür (Eerola ve ark., 1993). İnjeksiyon sıvısındaki konsantrasyonu 0,05 µg/ml ile 7,0 µg/ml arasında olacak şekilde hazırlanan 9 farklı konsantrasyonda mix standart çözeltiler (0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 1,5 µg/ml, 2,0 µg/ml, 3,0 µg/ml, 5,0 µg/ml, 7,0 µg/ml) ile pik yükseklikleri baz alınarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve miktar

ayını yapılmıştır. Analizler 3 paralel olarak yürütülmüştür. HPLC bileşenleri ve şartları aşağıda verilmiştir:

Degaser: Agilent 1100 Series

Quaternary Pump: Agilent 1100 Series

Autosampler: Agilent 1100 Series

Column Oven: Agilent 1100 Series

UV-DAD Detector: Agilent 1100 Series

Kolon: Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 (150x4,6mm; partikül büyüklüğü 5µm)

Akış oranı: 0,9 ml/dakika

İnjesiyon hacmi: 20 µl

Kolon sıcaklığı: 40 °C

Detektör dalga boyu: 254 nm

Sıvı kromatografi mobil fazı A (Amonyum asetat, 0,1 mol/l): Tam olarak 7,708 gram amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) tartılmış, 1000 ml' lik balon jöjeye aktarılmış, su ile eritilerek çizgisine getirilmiştir. Vakumlu süzme aparatı kullanılarak 0,45 µm filtreden süzülerek kullanılmıştır. Çözelti 3 günde bir yenilenmiştir.

Sıvı kromatografi mobil fazı B (Asetonitril, HPLC grade): Vakumlu süzme aparatında 0,45 µm'lik filtreden süzülerek kullanılmıştır.

Gradient Akış Programı: Çizelge 3.2'de verilmiştir.

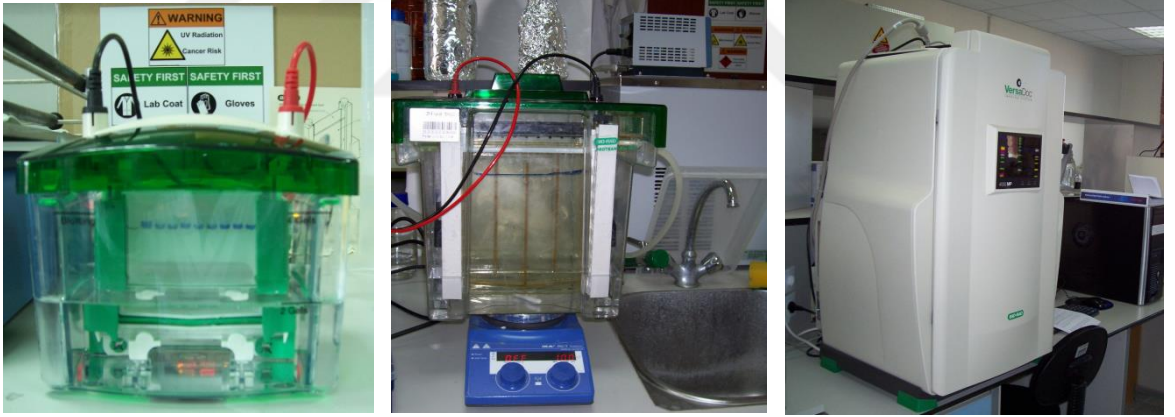
Çizelge 3.2. Biyojen amin analizi gradient solvent akış programı

Süre (dakika)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)	Akış Hızı (ml/dak)
0	50	50	0,9
19	10	90	0,9
20	50	50	0,9
28	50	50	0,9

3.2.3.6. SDS-PAGE

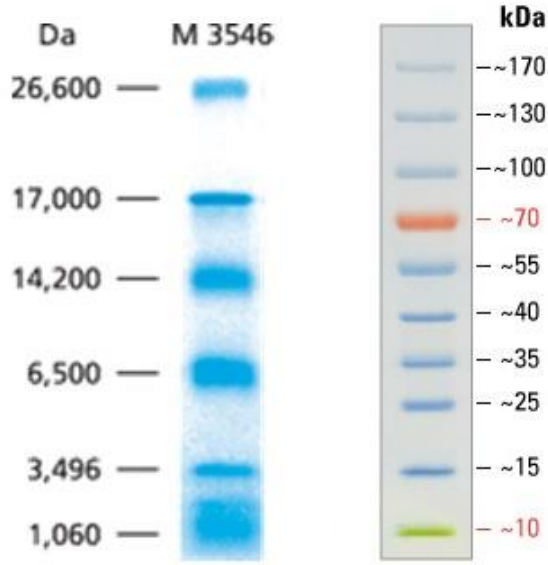
Hamsi eti ve atık örnekleri ile bunlardan üretilen hidrolizatlardaki proteinlerin moleküler ağırlık bazında dağılımları, SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) tekniği ile incelenmiştir. Materyal olarak kullanılan hamsi eti ve atıklarında bulunan proteinler; üç farklı solüsyon kullanılarak [0,8M NaCl (pH 6), fosfat buffer (I=0,5 ve pH 7,5) ve %1 sodyum dodesil sülfat (SDS)] ekstrakte edilmiştir. Sıvı hidrolizatlar suyla, kurutulmuş hidrolizatlar ise %1 SDS ile çözündürülmüşlerdir. Final

hacimler örnek protein miktarlarına göre hesaplanmış, örneklerin protein içeriği spektrofotometrede (Thermo Nanodrop 8000) 280 nm’de kontrol edilmiştir. Aynı solüsyonlar kullanılarak ekstraktlar ve hidrolizat çözeltilerinin protein içerikleri 5 mg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Et ve atık ekstraktları için %30 akrilamid/bis kullanılarak %12’lik running (separating) jel, hidrolizatlar için %15’lik running jel hazırlanmıştır. Her ikisi için de %4’lük stacking jel hazırlanmıştır. Her iki grup önce Bio-Rad Mini Proetan Tetra Cell dikey elektroforez düzeneğinde (8.3x7.3cm, jel kalınlığı 1mm), sonrasında 10°C’ye ayarlı soğutmalı sirkülasyon banyosuna (PolyScience Refrigerated Circulating Bath) bağlı, manyetik karıştırıcı (IKA RCT Basic) üzerine yerleştirilmiş olan Bio-Rad Maxi Proetan II-xi Cell dikey elektroforez düzeneğinde (16x16cm, jel kalınlığı 0,75mm) ayrı ayrı çalışılmıştır (Şekil 3.8). Ekstraktlar ve hidrolizatlar 1:1 oranında sample buffer [%37,5 su, %12.5 0,5M Tris-HCl (ph 6,8), %20 gliserol, %20 SDS (% 10’luk), %5 β-merkaptotanol, %5 bromfenol blue (%0,5’lik sulu çözelti)] ile karıştırıldıktan sonra 100°C’de 10 dakika tutulmuş, oda sıcaklığına geldikten sonra her örnek karışımından 20 µl alınarak jele yüklenmiştir.



Şekil 3.8. SDS-PAGE sistemleri. Soldan sağa; mini jel, maksijel dikey elektroforez sistemi ve görüntüleme cihazı

Et ve atık ekstraktlarının boyanmasında % 0,1’lik, hidrolizatların boyanmasında %0,025’lik Coomassie Brilliant Blue G 250 kullanılmıştır. Protein bantlarının yaklaşık molekül ağırlıklarının tespitinde et ve atık ekstraktları için Thermo Scientific PageRuler Prestained Protein Ladder (10 kDa-170 kDa), hidrolizatlar için Sigma Ultra Low Range Molecular Weight Marker (1,0 kDa-26,6 kDa) standartları kullanılmıştır (Şekil 3.9). Jel görüntüleme işlemi, Bio-Rad VersoDoc 4000MP cihazında yapılmıştır.



Şekil 3.9. Üreticisi tarafından beyan edilen marker protein bantlarının dizilimleri

3.2.3.7. Hidroliz Derecesinin (%HD) Tespiti

Hidroliz Derecesi Hoyle ve Merritt (1994)'e göre hidroliz sonrasında triklor asetik asitte (TCA) çözünen proteinin, toplam proteine oranı şeklinde hesaplanmıştır. Hidroliz sonrasında reaksiyon karışımı %20' lik triklorasetik asitle 1:1 oranında karıştırılmış ve bu karışım 4°C'de 15.000 xg'de 20 dakika santrifüj edilerek berrak sıvıda (%10 TCA) çözülmüş halde bulunan proteinler analiz edilmiştir. Analizler 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Hidroliz karışımında bulunan toplam proteinlerin analizi ile aşağıdaki formül kullanılarak hidroliz derecesi tespit edilmiştir.

$$\% \text{ HD} = N_{\delta} / N_T \times 100 \quad (3.3)$$

N_{δ} : Hidrolizatın %10 TCA'da çözülmüş azot miktarı

N_T : Hidrolizattaki toplam azot miktarı

3.2.3.8. Protein Çözünürlüğü

Pacheco-Aguilar ve arkadaşları (2008)'na göre hidrolizat örnekleri asidik, nötr ve bazik pH' da olacak şekilde hazırlanmıştır. Hidrolizatların protein içeriği 100 µg/ml, pH'ları 4, 7 ve 10 olacak şekilde 0,1M HCL veya 0,1M NaOH kullanılarak ayarlanmış, su ile seyreltilmiştir. Nalınanon ve arkadaşları (2011)'na göre oda sıcaklığında 30 dakika karıştırılan örnekler, 5000 xg'de 15 dakika santrifüj edilmiş, supernatantların protein içeriği

Lowry ve arkadaşları (1951) tarafından verilen yönteme göre belirlenmiştir. Yöntem, alkali ortamda peptit bağları ile indirgenen bakırın folin reaktifi ile renk oluşturmaya dayanmaktadır. Bu amaçla öncelikle aşağıdaki reaktifler hazırlanmıştır:

Çözelti A: %2,0 sodyum karbonat (Na_2CO_3 ; Merck 106392) çözeltisi, %0,1 N sodyum hidroksit (NaOH ; Merck 106498) içinde,

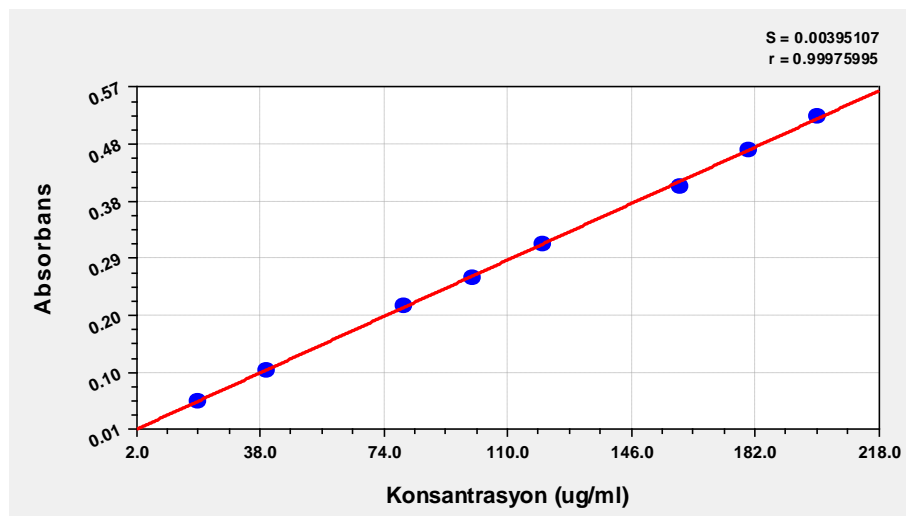
Çözelti B: %0,5 bakır (II) sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Merck 102790) çözeltisi, % 1,0 potasyum sodyum tartarat tetrahidrat ($\text{KOCOC}(\text{OH})\text{CH}(\text{OH})\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; Sigma S2377) içinde stok solüsyonlardan taze hazırlanmış,

Reaktif I: Kullanmadan hemen önce Çözelti A ve Çözelti B'nin 50:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanmış,

Reaktif II: Eşit miktarda %0,1 N NaOH ile seyreltilmiş Folin-Ciocalteu's fenol ayırıcı (Merck 109001),

Sığır serum albümini (SSA) standart çözeltileri: Protein standardı olarak sığır serum albümininin (Sigma A7906) 20 – 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonlarında seri çözeltisi hazırlanmıştır.

Analiz; 1'er ml örnek ve standart çözeltilerinin (kör için 1 ml su) 4,5 ml Reaktif I ile karıştırılması, 10 dakika beklendikten sonra 0,5 ml Reaktif II ilave edilerek ve karanlıkta 30 dakika beklendikten sonra absorbans değerlerinin spektrofotometrede (Shimadzu UV-160A) 660 nm'de okunması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Örneklerin protein içeriği, SSA standart çözeltileri ile çizilen kalibrasyon kurvesine göre hesaplanmıştır (Şekil 3.10). Deney üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. % Çözünen Protein Oranı; süpernatantların protein içeriğinin, toplam proteine yüzde oranı şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 3.10. Albümin (SSA) ile çizilen protein kalibrasyon kurvesi ($\lambda=660$ nm)

3.2.3.9. Emülsifiye Özelliği

Hidrolizatların emülsifiye özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Pearce ve Kinsella (1978)'nin metodu küçük değişiklikler yapılarak uygulanmış, Emülsifiye Aktivite İndeksi (EAI) ve Emülsiyon Stabilitate İndeksi (ESI) hesaplanmıştır. EAI'ni belirlemek amacıyla hidrolizat örneklerinin protein içeriği %0,25, %0,50 ve %1,00 olacak şekilde sulu çözeltileri hazırlanmış, 6 ml hidrolizat çözeltisi, 2 ml soya yağı (Sigma-S7381) ile ultraturrax (IKA-WERKE T25B) kullanılarak 20.000 devir/dakika (rpm) hızda, 1 dakika süreyle karıştırılmıştır. Homojenizasyon işlemi bitiminde derhal karışımın bulunduğu tüpün dibinden 50 µl alınmış ve 100 kat %0,1 sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu ile seyreltilerek spektrofotometrede 500 nm'de absorbansı (A_0) ölçülmüştür. Aynı karışımdan 10 dakika sonra dipten 50 µl alınmış ve 100 kat %0,1 SDS solüsyonu ile seyreltilerek spektrofotometrede 500 nm'de absorbansı (A_{10}) ölçülmüştür. Üç tekrarlı olarak yürütülen çalışma sonrasında aşağıdaki formüller kullanılarak EAI ve ESI hesaplanmıştır.

$$EAI \text{ (m}^2\text{/g)} = (2 \times 2.303 \times A_0) / (0,25 \times \text{protein konsantrasyonu}) \quad (3.4)$$

$$ESI \text{ (dakika)} = (A_0 \times \Delta t) / (A_0 - A_{10}) \quad (\Delta t = 10 \text{ dk.}) \quad (3.5)$$

3.2.3.10. Köpürme Özelliği

Hidrolizatların köpürme özellikleri kapsamında; Nalinanon ve arkadaşları (2011)'na göre Köpük Genişleme (KG) ve Köpük Stabilitesi (KS) testleri gerçekleştirilmiştir. Üç farklı protein konsantrasyonunda (%0,25, %0,50 ve %1,00) hazırlanan sulu hidrolizat çözeltilerinden 20'şer ml ölçülü silindire alınmış, oda sıcaklığında 13.400 devir/dakika hızda 1 dakika süreyle karıştırılarak köpük oluşumu sağlanmıştır. Oluşan köpükle birlikte derhal toplam hacim ölçülmüş (V_T), karışım oda sıcaklığında 60 dakika bekletildikten sonra toplam hacim tekrar (V_t) ölçülmüştür. Üç tekrarlı olarak yürütülen çalışmada KG ve KS aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır.

$$\%KG = [(V_T - V_0) / V_0] \times 100 \quad (3.6)$$

$$\%KS = [(V_t - V_0) / V_0] \times 100 \quad (V_0 = \text{karıştırma öncesindeki hacim}) \quad (3.7)$$

3.2.3.11. Yağ Tutma Kapasitesi

Wasswa ve arkadaşları (2007) tarafından kullanılan metoda göre kurutulmuş hidrolizat örneğinden 0,5 gram, 10 ml soya yağı (Sigma S7381) ile santrifüj tüpü içerisinde 60 saniye süreyle vortex mikser kullanılarak 2.500 devir/dakika hızda karıştırılmış, karışım 30 dakika süreyle 2800 xg'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında ayrılan yağ miktarı ölçülerek, hidrolizat gramı başına tutulan yağ miktarı (ml) hesaplanmış, bu değer Yağ Tutma Kapasitesi (YTK) olarak ifade edilmiştir. Analizler üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.12. Su Tutma Kapasitesi

Wasswa ve arkadaşları (2007)'na göre yürütülen analizlerde; 0,5 gram kurutulmuş hidrolizat örneği, 20 ml saf su ile santrifüj tüpü içerisinde 30 saniye süreyle vortex mikserde 2.500 devir/dakika hızda karıştırılmış, karışım oda sıcaklığında 6 saat süreyle tutulmuştur. Süre sonunda karışımlar 2800 xg'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı kısım filtre kâğıdından (Whatman No.1) süzülmüş, süzüntü miktarı ölçülerek, hidrolizat gramı başına tutulan su miktarı (ml) hesaplanmış ve bu değer Su Tutma Kapasitesi (STK) olarak ifade edilmiştir.

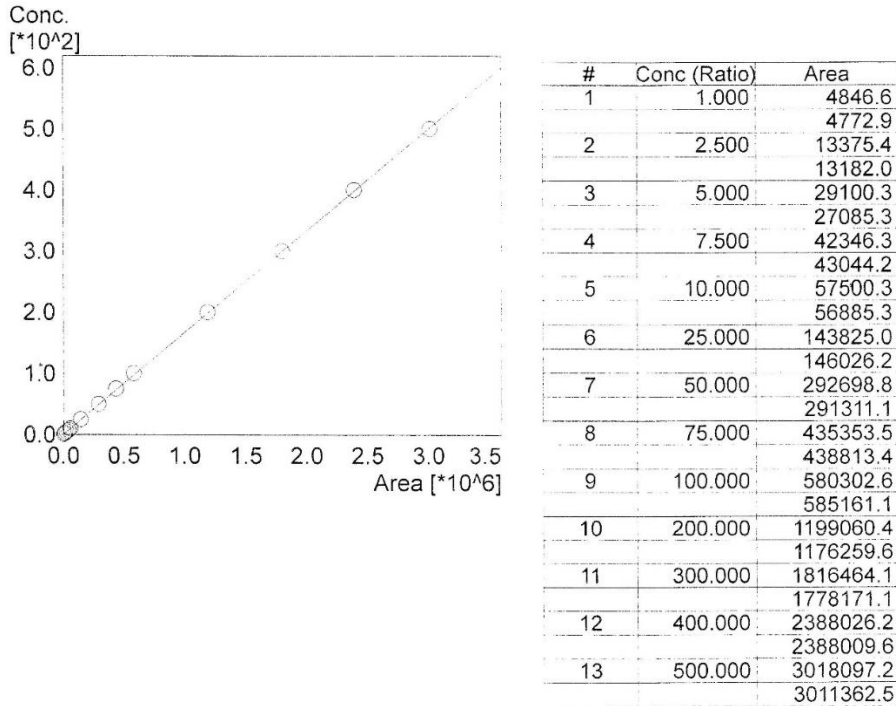
3.2.3.13. ACE İnhibisyon Aktivitesi Analizi

Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE) inhibisyon aktivitesi analizi, bazı modifikasyonlar yapılarak Pegg ve arkadaşları (2007)'na göre HPLC yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yöntem, ACE'nin HHL substratından enzimatik reaksiyon sonucunda oluşturduğu hippurik asit miktarının HPLC ile tespit edilmesi, hippurik asit miktarına göre inhibisyon aktivitesinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Tüm işlemlerde ultrapur su kullanılmıştır.

Ultrafiltrasyondan geçirilmiş (<5 kDa) ve geçirilmemiş (orijinal) hidrolizatlar ayrı ayrı analiz edilmişlerdir. Analiz öncesinde taze olarak 50 mM Tris buffer (300 mmol NaCl içeren, pH 8,3) hazırlanmıştır. Bunun için 1,211g tris [(Tris(hydroxymethyl) aminomethane; Merck-108387] ve 3,5064g NaCl (Sigma-31434) tartılarak 100 ml'ye su ile seyreltilmiştir (100mM Tris, 600 mM NaCl içeren). Bu çözeltilerden 50 ml alınarak pH'sı 25°C'de 8,6'ya ayarlanmış ve 100 ml'ye su ile tamamlanmıştır. 25°C'de 8,6'ya ayarlanan pH, reaksiyon sıcaklığında (37°C) 8,3'e tekabül etmektedir. Ayrıca buz banyosu içinde 10 mU/ml ACE (Angiotensin Converting Enzyme) solüsyonu Sigma-A6778 kullanılarak hazırlanmış, seyreltmede 50 mM Tris buffer kullanılmıştır. Enzim substratı olarak 3 mM HHL (N-Hippuryl-His-Leu hydrate; Sigma-H1635) taze olarak hazırlanmıştır. Bunun için

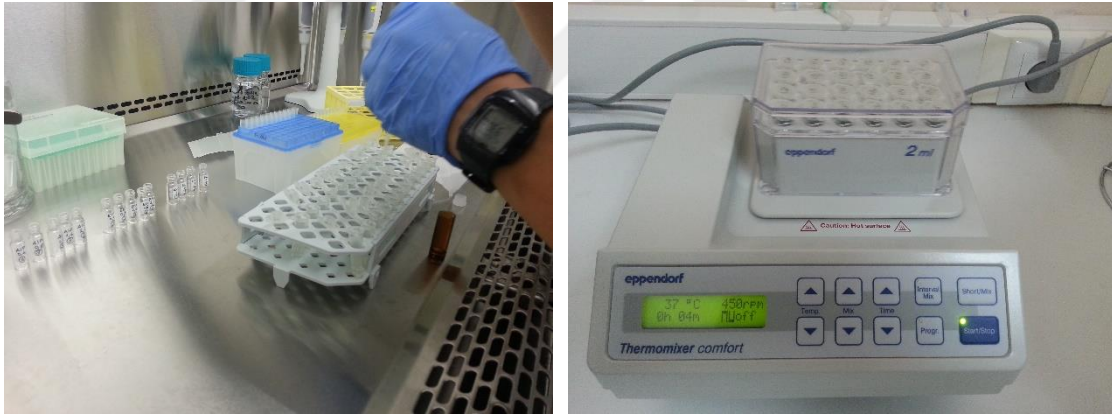
kullanılacak toplam çözelti miktarı hesap edilerek 1,3425 mg HHL/ml Tris buffer olacak şekilde konsantrasyonu ayarlanmıştır. Çalışmamızda ACE ve HHL çalışma çözeltileri, buz banyosunda hazırlanıp, her analiz çalışmasına yetecek porsiyonlar şeklinde -20°C’de amber renkli kapaklı cam şişelerde muhafaza edilen stok çözeltilerden hazırlanmıştır.

Çalışmamızda ACE inhibisyon aktivitesinin IC₅₀ değeri ve Captopril konsantrasyonu eşiti şeklinde ifade edilebilmesi için ön denemelerle örnek hidrolizatlar için 5, Captopril etken maddesi için 7 çalışma konsantrasyon aralığı belirlenmiştir. Bu kapsamda <5 kDa hidrolizatların kurumadde bazında 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ve 1,0 mg/ml’lik, orijinal hidrolizatların ise 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, ve 2,0 mg/ml’lik konsantrasyonları Tris buffer kullanılarak hazırlanmıştır. Günümüzde yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan güçlü bir ACE inhibitörü olan Captopril etken maddesinin (Sigma-C4042) 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0 ve 14 ng/ml’lik konsantrasyonları Tris buffer kullanılarak hazırlanmıştır. İnhibisyon aktivitesinin belirlenebilmesi için standart olarak kullanılan hippurik asitin (Sigma-112003) 1 µM ila 500 µM arasında 13 farklı konsantrasyonda standart çözeltisi hazırlanarak HPLC’de kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 3.11). Bu kalibrasyon eğrisinden konsantrasyon düzeylerine göre seçilen 6’şar nokta ile düşük (1-25 µM), orta (7,5-100 µM) ve yüksek düzey (75-500 µM) hippurik asit (HA) alt kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Tüm kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayısı (R²) >0,9999 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.11. Hippurik asit kalibrasyon eğrisi

Analiz; enzimatik reaksiyonun gerçekleştirilmesi ve reaksiyon karışımında oluşan hippurik asitin HPLC sisteminde tespiti şeklinde iki kısımda yürütülmüştür. Reaksiyon için; 2 ml'lik kapaklı tüplerin (Eppendorf tüp) içinde 50 µl substrat solüsyonu (HHL, 3 mM), 50 µl enzim (ACE, 10 mU/ml enzim aktivitesinde) ve 50 µl hidrolizat örneği (farklı konsantrasyonlarda) karıştırılmış ve tüpler ısıtıcı bloğa (Eppendorf Thermomixer Comfort) yerleştirilerek 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda karıştırıcı özelliği 450 devir/dakika hıza ayarlanarak çalıştırılmış ve 30 dakika daha aynı sıcaklıkta karıştırılarak inkübasyona devam edilmiştir (Şekil 3.12). İnkübasyon sonunda 150 µl glasiyel asetik asit (Merck-100063) ilave edilerek ACE aktivitesi sonlandırılmıştır. Reaksiyon karışımı 45 µm'lik teflon şırınga filtreden geçirilerek viallere alınmıştır. Captopril çalışması, hazırlanan farklı konsantrasyonlarda Captoprilin, hidrolizat yerine reaksiyona dâhil edilmesi şeklinde yürütülmüştür. Her çalışma grubunda örnek yerine 5 adet 50 µl Tris buffer kullanılarak çalışma grubuna ait kör değerleri elde edilmiştir. Gerek hidrolizatların, gerekse Captoprilin inhibe edemediği ACE tarafından oluşturulan HA miktarı, HPLC'de tespit edilmiş, HA miktarlarına göre % inhibisyon hesaplanmıştır.



Şekil 3.12. ACE reaksiyon karışımının hazırlanması ve inkübasyonu

Hippurik asit tayininde; LC20AD solvent dağıtım ünitesi, DGU 20A3R degaser ünitesi, SIL 20AHT otoörnekleyici, CTO 10ASVP kolon fırını ve SPDM20A UV-VIS detektörden oluşan Shimadzu UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatography) HPLC sistemi kullanılmıştır. Analizde kullanılan HPLC şartları aşağıda verilmiştir:

Enjeksiyon hacmi: 10 µl

Kolon: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18; 4,6mm x 150mm; 5µm

Kolon sıcaklığı: 25°C

Akış hızı: 1 ml/dk

Dedektör: UV, 228 nm

Mobil Faz (İsokratik): % 12,5 (v/v) HPLC grade asetonitril (pH 3,0). pH ayarlamada glasiyel asetik asit kullanılmıştır.

Ölçümler sonrasında kalibrasyon eğrisinden hesaplanan örneklere ve köre ait hippurik asit miktarları ($HA_{\text{örnek}}$ ve $HA_{\text{kör}}$) üzerinden aşağıdaki formülle %ACE inhibisyonu hesaplanmıştır:

$$\% \text{İnhibisyon}_{\text{ACE}} = (1 - (HA_{\text{örnek}}/HA_{\text{kör}})) \times 100 \quad (3.8)$$

Konsantrasyona bağlı inhibisyon eğrisinden reaksiyon ortamındaki ACE'nin %50'sini inhibe eden hidrolizat miktarı, IC_{50} (mg/ml) değeri olarak kurumadde (KM) bazında hesaplanmıştır. Ayrıca her hidrolizatın 1 mg/ml'sinin inhibisyon değerine karşılık gelen Captopril konsantrasyonu (nM), Captoprile ait % inhibisyon eğrisinden tespit edilmiştir. Bu değer, hidrolizatların Captopril eşiti ACE inhibisyon aktivitesi olarak verilmiştir.

3.2.3.14. DPPH Temizleme Aktivitesi Analizi

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) kararlı bir organik azot radikali olup, fenolik bileşiklerin ve gıdaların antioksidan kapasitesini ölçmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (Büyüktuncel, 2013). DPPH radikali temizleme aktivitesi, Thaipong ve arkadaşları (2006)'na göre test edilmiştir. Spektrofotometrik olarak gerçekleştirilen analiz; koyu menekşe renkli radikalın, proton veya elektron verebilme yeteneğinde bir antioksidanla reaksiyona girmesi sonucu renginin açılması esasına dayanmaktadır.

Analiz öncesi DPPH'in stok ve çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Stok DPPH çözeltisi hazırlamak için 28 mg DPPH (Sigma-D9132), metanol ile çözündürülerek 100 ml'ye tamamlanmış, 10 ml'lik porsiyonlar halinde alüminyum folyo ile kapatılarak -20°C 'de muhafazaya alınmıştır. Her çalışma gününde taze olarak 10 ml stok DPPH çözeltisi, 45 ml metanol ile karıştırılarak çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin spektrofotometrede 515 nm'de absorbansının $1.100 \pm 0,02$ olup olmadığı kontrol edilmiş, olmadığında kullanım öncesi metanol veya stok çözelti ilave edilerek bu aralığa getirilmiştir.

Çalışmada pozitif kontrol numunesi olarak Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid; Aldrich-238813) kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 250,29 g/mol olan Troloxtan 800 μM , 50 ml hazırlamak için 10,012 mg tartılmış ve metanol ile çözündürülerek 50 ml'ye tamamlanmıştır. Çalışma gününde taze olarak stok çözeltiden seyreltik alt çözeltiler hazırlanarak 75 μM – 800 μM arasında 7 Trolox standart çalışma

çözeltisi elde edilmiştir. 800 µM stok standart çözelti -20°C' de alüminyum folyoya sarılı şekilde saklanmıştır.

Analiz; farklı konsantrasyonlardaki Trolox standart çözeltilerinden ve ön denemelerle belirlenen konsantrasyonlarda su ile hazırlanmış hidrolizat örneklerinden alınan 150 µl ile 2850 µl DPPH çalışma çözeltisinin karıştırılması ve karışımın karanlıkta 24 saat bekletilmesi şeklinde gerçekleştirilmiştir. Her çalışma setine 3 adet kör dâhil edilmiştir. Kör için örnek yerine 150 µl metanol kullanılmıştır. Süre sonunda örnek absorbansları metanole karşı 515 nm'de spektrofotometrede (Shimadzu UV-160A) okutulmuştur. Trolox standartlarının ve konsantrasyon bazında hidrolizatların %DPPH temizleme aktivitesi hesaplanmış, ayrıca 1 mg/ml konsantrasyondaki hidrolizatın eşiti Trolox konsantrasyonu (µM), farklı konsantrasyonlardaki Troloxa ait %DPPH radikal temizleme değerleri ile çizilen grafikten hesaplanmıştır. %DPPH temizleme aktivitesi hesabı aşağıdaki formüle göre yapılmıştır:

$$\%DPPH \text{ temizleme aktivitesi} = (1 - (\text{Örnek}_{\text{abs}} / \text{Kör}_{\text{abs}})) \times 100 \quad (3.9)$$

Burada;

Örnek_{abs}: Hidrolizatların ve Trolox standartlarının 515 nm'deki absorbansları

Kör_{abs}: Çalışma setine ait kör çözeltilerinin 515 nm'deki ortalama absorbans değeri

3.2.3.15. Fe⁺² Şelatlama Aktivitesi Analizi

Bu analiz Decker ve Welch (1990) yöntemine göre yapılmıştır. Metot, güçlü bir metal şelatlayıcı olan Ferrozin reaktifi ile ortamda test edilen Fe⁺² bağlayıcı bileşiklerin rekabetine dayanmaktadır. Test edilen örneğin şelatlama gücü oranında, kırmızı renkli Fe⁺²-Ferozin oluşumu engellemekte ve renk açılmaktadır.

Analiz öncesinde 246,23 mg Ferrozin (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p,p'-disulfonic acid monosodium salt hydrate; Aldrich-160601) su ile 100 ml'ye seyreltilerek 5mM Ferrozin çözeltisi hazırlanmıştır. Ayrıca 2 mM FeCl₂ (Merck-103861) hazırlamak için 4 sulu demir II klorürden (bünyesindeki su dikate alınarak) 99.42 mg tartılmış ve su ile 100 ml'ye seyreltilmiştir.

Pozitif kontrol örneği olarak EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid; Sigma-Aldrich E9884) seri standart çözeltileri kullanılmıştır. EDTA çözeltilerinin hazırlanmasında, çözünmenin tam olarak gerçekleşebilmesi için pH'sı 8,0-8,5 aralığına getirilmiş (NaOH kullanılarak) su kullanılmıştır. Molekül ağırlığı 292,24 g. olan EDTA'dan önce 1m/ml

konsantrasyonda çözelti hazırlanmış, buradan farklı hacimlerde alınan çözelti ile 50, 60, 70, 80 ve 90 µg/ml konsantrasyonlarda bir seri EDTA çalışma çözeltisi hazırlanmıştır.

Analiz öncesinde filtre edilen ve edilmeyen hidrolizat örneklerinden kurumadde bazında 0,25, 0,50, 1,0, 1,5 ve 2,0 mg/ml konsantrasyonlarda su ile analiz örnekleri hazırlanmıştır.

Analiz; farklı konsantrasyonlarda EDTA ve hidrolizat örneklerinden alınan 4,7 ml porsiyonun 15 ml'lik kapaklı plastik tüplerde 0,1 ml FeCl₂ (2 mM) ve 0,2 ml Ferrozin (5 mM) karıştırılması, karışımın 20 dakika oda sıcaklığında inkübasyonu ve inkübasyon sonrasında örnek absorbanslarının 562 nm'de spektrofotometrede (Shimadzu UV-160A) okunması şeklinde yürütülmüştür. Kör olarak, örnek yerine 4,7 ml su kullanılmıştır. Her konsantrasyondan en az iki paralel analiz gerçekleştirilmiştir. Hidrolizat örneklerinin Fe⁺² şelatlama aktivitesi (%) aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\% \text{Fe}^{+2} \text{ şelatlama aktivitesi} = (1 - (\text{Örnek}_{\text{abs}} / \text{Kör}_{\text{abs}})) \times 100 \quad (3.10)$$

Her numuneye ait şelatlama aktivite eğrisinin regresyon denklemi çıkarılarak %50 şelatlama aktivitesine karşılık gelen numune miktarı IC₅₀ değeri olarak hesaplanmıştır. Ayrıca kurumadde bazında 1 mg hidrolizatın şelatlama aktivitesi eşiti, EDTA'nın konsantrasyona bağlı şelatlama aktivitesi eğrisinden hesaplanmış ve µM EDTA'ya çevrilmiştir.

3.2.4. Anket Çalışması

Çalışmanın sonucunda 250 katılımcı ile bir anket faaliyeti gerçekleştirilmiştir. Ankette; balık işleme atıklarından gıda veya gıda katkı maddesi üretilmesi durumunda tüketicilerin bu ürünlere yaklaşımının ne olacağı belirlenmeye çalışılmıştır. Beş soruluk kısa anket formu (Şekil 3.13) ile önce tüketicinin salt olarak bu ürünlere bakışı öğrenilip, sonraki sorularla fikrini değiştirmesine sebep olabilecek etmenler belirlenmeye çalışılmıştır.

Ankete katılanların; farklı yaşlarda (18-70), farklı eğitim seviyelerinde (ilkokul-lisansüstü), farklı meslek gruplarında (ev hanımı, öğrenci, esnaf, memur, akademisyen) ve farklı cinsiyetlerde homojen olarak dağılmasına özen gösterilmiştir.

3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Elde edilen verilerle; aritmetik ortalama, standart sapma ve standart hata hesaplamaları yapılarak tablolar oluşturulmuştur. Hidrolizde kullanılan et ve atık materyalin tanımlayıcı

analizlerinde, ortalamalar arasında farkın tespiti amacıyla t testi kullanılmıştır. Materyal tipi (et ve atık) ve hidroliz sürelerinin ana faktör olarak yer aldığı analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde two way-ANOVA, bunlara ilaveten ultrafiltrasyon, pH veya protein konsantrasyonlarının üçüncü bir faktör olarak devreye girdiği analiz sonuçları ortalamaları arasında farkın test edilmesinde three way-ANOVA tekniğinden yararlanılmıştır. Farkın önemli bulunduğu testlerde farkın hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek amacıyla çoklu karşılaştırma testleri (Holm-Sidak, Bonferroni, Tukey) kullanılmıştır. Önem seviyesi olarak %5 (p=0,05) alınmıştır. İstatistiksel hesaplamalarda Minitab® 16, SPSS® 18 ve SigmaPlot® 12 istatistik paket programlarından faydalanılmıştır.

Sayın Katılımcı;

Bu 5 soruluk anket formu, **Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Su ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı**'nda yürütülen, balık eti ve işleme atıklarından protein bazlı ürün elde etmeye ve bu ürünlerin özelliklerini belirlemeye yönelik doktora çalışmada tüketici eğilimini belirlemek amacıyla tasarlanmıştır.

Katılımınız ve samimi cevaplarınız için teşekkür ederim.

Sinan KOÇ
Su Ürünleri Yük. Mühendisi

1. Balık işleme atıklarından (baş, iç organlar, kırpıntı et, omurga, deri vb.) elde edilen ürünleri gıda veya gıda katkı maddesi olarak tüketir misiniz?
a) Evet tüketirim b) Hayır tüketmem
2. Sağlık açısından yararlı olduğu bilimsel çalışmalarla kanıtlandığında, balık işleme atıklarından elde edilen ürünleri gıda veya gıda katkı maddesi olarak tüketir misiniz?
a) Evet tüketirim b) Hayır tüketmem
3. Güvenilir gıda kapsamında olduğu bilimsel çalışmalarla kanıtlandığında, balık işleme atıklarından elde edilen ürünleri gıda veya gıda katkı maddesi olarak tüketir misiniz?
a) Evet tüketirim b) Hayır tüketmem
4. Yetkili resmi kuruluslardan onay aldığı anda, balık işleme atıklarından elde edilen ürünleri gıda veya gıda katkı maddesi olarak tüketir misiniz?
a) Evet tüketirim b) Hayır tüketmem
5. Yukarıdaki maddelerden herhangi birine **EVET** cevabı verdi iseniz;
Balık işleme atıklarından elde edilen ürünleri tüketiminizde, renk, tat, koku, kıvam gibi duyuşsal özellikler sizin bu kararınızı değiştirmenizde etkili olur mu?
a) Evet olur b) Hayır olmaz

Şekil 3.13. Anket formu

BÖLÜM 4

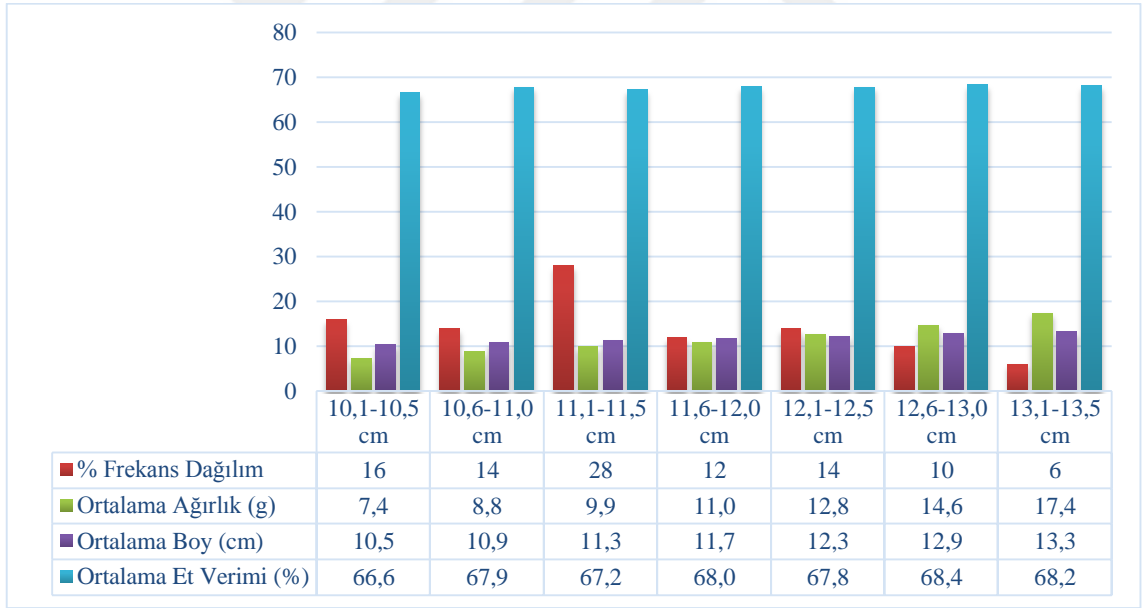
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada öncelikle hammaddeyi tanımlamaya yönelik biyometrik ölçümler gerçekleştirilmiş, hamsi eti ve atıklarında makro ve mikro besin bileşenleri analizleri ile biyojen amin ve SDS-PAGE analizleri gerçekleştirilmiştir. Enzimatik protein hidrolizi ile elde edilen hidrolizatlarda ise tanımlayıcı ve besleyici özellikler ile fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerini yansıtan analizler gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, elde edilen bulgular hammadde ve hidrolizatlar olarak ayrı başlıklar altında sunulmuş ve tartışılmıştır.

4.1. Balık Materyaline Ait Bulgular

4.1.1. Biyometrik Ölçümlere Ait Bulgular

Balıkların ortalama boy ve ağırlık ölçümleri ile et verimi hesaplamaları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



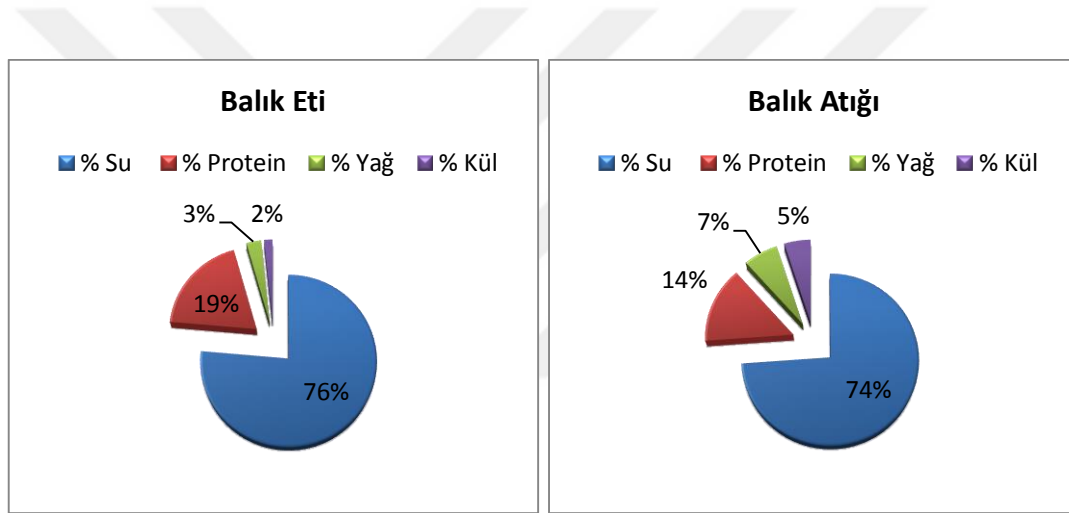
Şekil 4.1. Hamsi materyalinin biyometrik ölçüm sonuçları

Çalışmada kullanılan balıkların ortalama boy değeri $11,6\pm 0,9$ cm, ortalama ağırlık değeri $10,8\pm 2,8$ g ve ortalama et verimi ise $67,6\pm 1,6$ olarak tespit edilmiştir. Toplam boy değerleri baz alınarak oluşturulan 7 sınıfın et verimi ortalamaları arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu çalışmada yaklaşık %68 olarak bulunan et verimi, ticari işletmelerde %50 olarak hesaplanmaktadır. Et verimi değerinin daha yüksek bulunması,

ayıklama işleminin laboratuvar ortamında daha titiz bir şekilde yürütülmesinden ve işleme sürecindeki sıvı kayıpların hesaplama dışında tutulmasından kaynaklanmaktadır. Çünkü işletmeciler verimi, son ürün (marinat) ağırlığının hammadde ağırlığına oranı şeklinde hesaplamaktadırlar.

4.1.2. Makro Besin Bileşenleri

Makro besin bileşenleri olan su, protein, yağ ve kül değerleri balık etinde sırasıyla; %76,35±0,04, %19,20±0,07, %2,82±0,06, %1,60±0,02 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Hamsiden et ayrıldıktan sonra kalan ve atık olarak nitelendirilen baş, iç organlar ve omurgadan oluşan kısımda ise besin bileşenleri, %73,85±0,14 su, %14,54±0,05 protein, %6,60±0,05 yağ ve %5,00±0,07 kül değeri şeklinde saptanmıştır.



Şekil 4.2. Balık eti ve atıklarında makro besin bileşenlerinin dağılımı

Hamsi et ve atık gruplarının; su, protein, yağ ve kül değerlerinin istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu ($p<0,05$) bulunmuştur. Bir balık türüne ait besin kompozisyonu, beslenme, göç ve büyük miktarda enerji gerektiren üreme dönemindeki seksüel değişimlerle yakın ilişkili olan yaş, cinsiyet ve mevsime bağlı değişimler göstermektedir (Hannachi ve ark., 2011). İlkbahar-sonbahar aralığında yumurtlayan hamsi için bu değişimler, periyodik olarak tekrarlanmaktadır. Bu nedenle ön denemelerde kullanılan Ekim ayı örnekleri ile asıl deneme için alınan Mart ayı örnekleri arasında özellikle protein ve yağ içeriği açısından önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Hamsi örneklerine ait protein ve yağ içerikleri

Örnekleme Dönemi	Et kısmı		Atık kısmı	
	% Protein	% Yağ	% Protein	% Yağ
Ekim 2013	17,0±0,1	15,5±0,1	11,47±0,2	18,3±0,1
Mart 2014	19,2±0,1	2,8±0,1	14,5±0,1	6,6±0,1

Kaya ve Turan (2010) Ekim ayında yaptıkları örneklemede, bu çalışmanın ön denemesinde kullanılan materyale yakın değerlerde, protein (%17,2) ve yağ içeriği (%18,6) tespit etmişlerdir. Gökoğlu ve arkadaşları (1999), Eylül-Nisan döneminde aylık periyotlarla yürüttükleri çalışmada hamsinin yağ içeriğini en yüksek Kasım ayında (%13,9), en düşük değeri ise Mart ayında (%4,7) elde etmişlerdir. Mevsimsel olarak gözlenen bu farklılıklar, bu çalışmada Mart ayı örnekleme ile Ekim ayı örneklemede kullanılan materyalin yağ içerikleri ile benzerlik göstermektedir.

4.1.3. Mineral Kompozisyonu

Balık eti ve atıklarında 19 adet mineral maddenin miktar analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mineral analizi sonuçları Çizelge 4.2’de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre balık eti ve atık örneklerinde kalsiyum, potasyum, magnezyum, sodyum, fosfor ve demir elementlerinin 1 mg/kg seviyesinin üzerinde değerlere sahip olduğu, iki materyal grubunda da bu mineral değerlerinin istatistiksel açıdan farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.3).

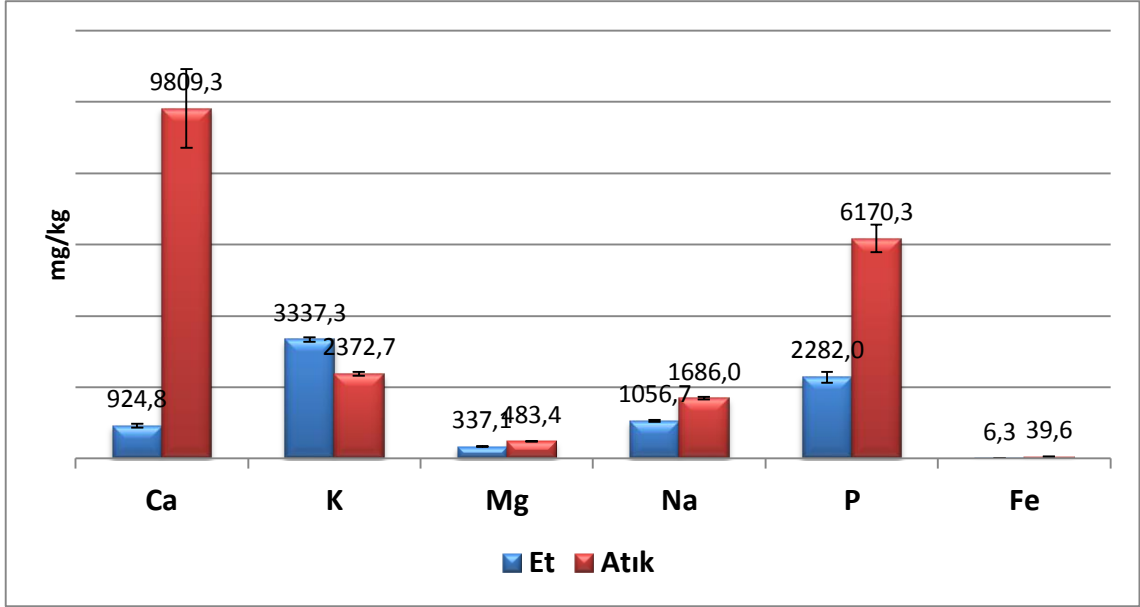
Atık materyali örneklerinde kalsiyum seviyesinin ete göre yaklaşık 10 kat, fosfor seviyesinin ise yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Balıktaki toplam kalsiyumun yaklaşık %99’u, fosforun ise %80’i iskelet sistemi ve pullarda bulunmaktadır (FAO, 1980). Dolayısıyla bu çalışmada kullanılan atık materyalde büyük oranda bulunan iskelet sistemi, tespit edilen bu yüksek değerlerin kaynağını oluşturmaktadır. Magnezyum ise kemiklerde, tüm organlarda, kas dokusunda ve hücre dışı sıvıda dağılmış olarak bulunduğundan, magnezyum içeriği et (337,3 mg/kg) ve atık (483,4 mg/kg) materyalinde birbirine yakın değerlerde, kemik dokunun büyük kısmı atık grubunda yer aldığından atık materyalinde biraz daha yüksek bulunmuştur. Örnek gruplarında 1 mg/kg dan fazla olan 6 mineralden sadece potasyum değeri, et örneğinde daha yüksek bulunmuştur. Bunun da nedeni hayvansal dokularda bulunan potasyumun yarıdan fazlasının kaslarda yer almasıdır (Armstrong, 1998).

Çizelge 4.2. Balık eti ve atıklarında mineral seviyeleri (mg/kg)

	Et	Atık
Kalsiyum (Ca)	924,83±59,37	9809,33±1103,40
Fosfor (P)	2282,00±151,16	6170,33±392,57
Potasyum (K)	3337,33±67,45	2372,67±58,16
Sodyum (Na)	1056,67±24,09	1686,00±35,37
Magnezyum (Mg)	337,07±6,38	483,37±17,09
Demir (Fe)	6,34±0,82	26,23±0,41
Alüminyum (Al)	0,92±0,08	3,93±0,28
Arsenik (As)	0,84±0,03	0,95±0,02
Bor (B)	0,72±0,02	0,75±0,03
Krom (Cr)	0,09±0,03	0,26±0,07
Bakır (Cu)	0,88±0,01	1,05±0,10
Mangan (Mn)	0,34±0,08	1,95±0,03
Nikel (Ni)	0,64±0,48	0,15±0,08
Selenyum (Se)	0,17±0,00	0,29±0,02
Kadmiyum (Cd)	TEDB* (0,027)	TEDB (0,027)
Kobalt (Co)	TEDB (0,015)	TEDB (0,015)
Kurşun (Pb)	TEDB (0,076)	TEDB (0,076)
Kalay (Sn)	TEDB (4,94)	TEDB (4,94)
Çinko (Zn)	TEDB (0,03)	TEDB (0,03)

*TEDB: Tespit edilebilir düzeyde bulunamamıştır. Tespit düzeyleri (mg/kg) parantez içinde verilmiştir

Hayvansal organizmalarda hemoglobin, miyoglobin, bazı enzimler ve sitokrom yapısında yer alan ve yaşamsal fonksiyonlarda görev alan demir (FAO, 2001); kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, magnezyuma göre ette daha düşük miktarda (6,3 mg/kg) tespit edilmiş, doku sıvısı açısından zengin olan atık materyalde ise 39,6 mg/kg düzeyinde bulunmuştur. Büyük kısmı hücre içinde bulunan potasyuma karşın, ekstrasellüler sıvılarda bulunan ve osmotik basıncın düzenlenmesinde, asit-baz dengesinin sağlanmasında, kasların uyarılmasında, karbonhidratların sindiriminde rol oynayan sodyum normal şartlarda balıklarda 300-1300 mg/kg düzeyinde bulunmaktadır (FAO, 1987; Murray ve Burt, 2001). Bu çalışmada sodyum, hamsi et örneklerinde 1056,7 mg/kg, atıklarda ise 1686,0 mg/kg düzeyinde bulunmuş, bu değerlerin potasyuma oranları ise ette %32, atık materyalde %71 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.3. Et ve atık materyalde >1 mg/kg düzeyindeki mineraller

Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde (Resmi Gazete, 29.12.2011/28157) gıda güvenliği açısından balıklarda bulunabilecek miktarlarına sınır getirilen kurşun ve kadmiyum, bu çalışmada tespit edilebilir düzeyin altında bulunmuştur. İz element olarak adlandırılan ve insanda oksidatif strese karşı vücudu koruyan, enfeksiyonlara karşı savunma sisteminde rol alan, büyüme ve gelişmeyi düzenleyen, %30'u kaslarda, kalanı ise karaciğer, böbrek ve kan dokusunda bulunan selenyum (FAO, 2001) ise ette 0,17 mg/kg, atıklarda 0,29 mg/kg düzeyinde belirlenmiş, istatistiksel olarak da farklılık doğrulanmıştır ($p < 0,05$). Et ve atık örneklerinde 1 mg/kg değerinin altında tespit edilen 13 elementten sadece bor ve nikel değerleri arasındaki farkın önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p > 0,05$).

4.1.4. Amino Asit Kompozisyonu

Balık eti ve atıklarında gerçekleştirilen toplam ve serbest amino asit analizi sonuçları Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Toplam amino asit miktarı, protein içeriği yüksek olan balık etinde, atık örneklerine göre daha yüksek bulunmuştur. Atık materyalde yalnızca glisin ve prolin, et örneklerine göre %13 ve %8 nispetinde yüksek tespit edilmiştir. Serbest amino asitler açısından ise durum tersine dönmüş, protein içeriği düşük olan atık materyali örneklerinde tespit edilen serbest amino asit değerleri, histidin dışında, et materyaline göre yüksek bulunmuştur. Örneğin serbest glutamin+glutamik asit, atık örneklerinde ete göre yaklaşık 10 kat (%996) daha yüksek değere sahiptir. Atık materyalin hidroliz öncesinde serbest amino asit bakımından zengin içerik göstermesi, hidrolizatların molekül ağırlık

dağılımlarına da yansımıştır. Sonuç olarak atık materyalin et materyaline toplam amino asit bakımından oranı %66 iken, toplam serbest amino asit açısından %195 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. Balık eti ve atıklarında kuru madde bazında toplam ve serbest amino asit kompozisyonu

Amino asitler	Toplam Amino Asit (g/100g örnek)		Serbest Amino Asit (mg/ 100g örnek)	
	Et	Atık	Et	Atık
Alanin	4,65	3,52	43,90	98,90
Glisin	3,38	3,82	10,80	28,80
Valin*	5,20	3,56	26,30	103,70
Lösin*	6,05	4,13	44,70	169,40
İzolösin*	5,33	3,21	34,30	116,20
Treonin*	2,92	1,80	7,60	35,70
Serin	2,58	1,64	8,40	38,20
Prolin	3,21	3,48	25,10	72,60
Asparajin+Aspartik asit	12,56	7,38	15,80	76,80
Metiyonin*	2,20	0,73	10,00	22,30
Hidroksiprolin	0,34	0,31	0,00	0,00
Glutamin+ Glutamik asit	10,32	7,49	11,00	109,60
Fenilalanin*	3,09	2,22	30,20	106,80
Lizin*	6,72	3,71	66,40	233,00
Histidin*	4,27	1,91	698,70	277,70
Tirozin*	2,33	1,26	25,20	79,40
Sistein*	0,80	0,00	0,00	0,00
TEAA**	38,95	18,09	943,60	1855,80
TAA***	75,91	50,13	1085,30	2116,90

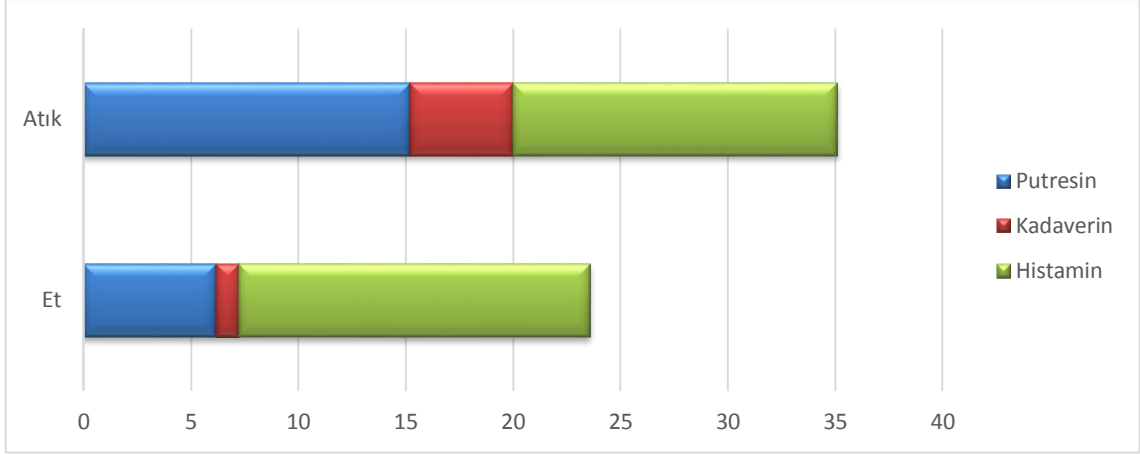
*Esansiyel amino asitler (FAO, 1985)

**Esansiyel amino asitlerin toplam miktarı

***Toplam amino asit miktarı

4.1.5. Biyojen Aminler

Biyojen amin analizleri kapsamında balık etinde putresin, kadaverin ve histamin değerleri sırasıyla $6,2 \pm 0,1$ mg/kg, $1,1 \pm 0,1$ mg/kg ve $16,4 \pm 0,2$ mg/kg olarak bulunmuştur. Atıklarda ise $15,2 \pm 0,5$ mg/kg putresin, $4,8 \pm 0,1$ mg/kg kadaverin ve $15,1 \pm 0,2$ mg/kg histamin değeri tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Balık eti ve atıklarında putresin, kadaverin ve histamin değerleri (mg/kg)

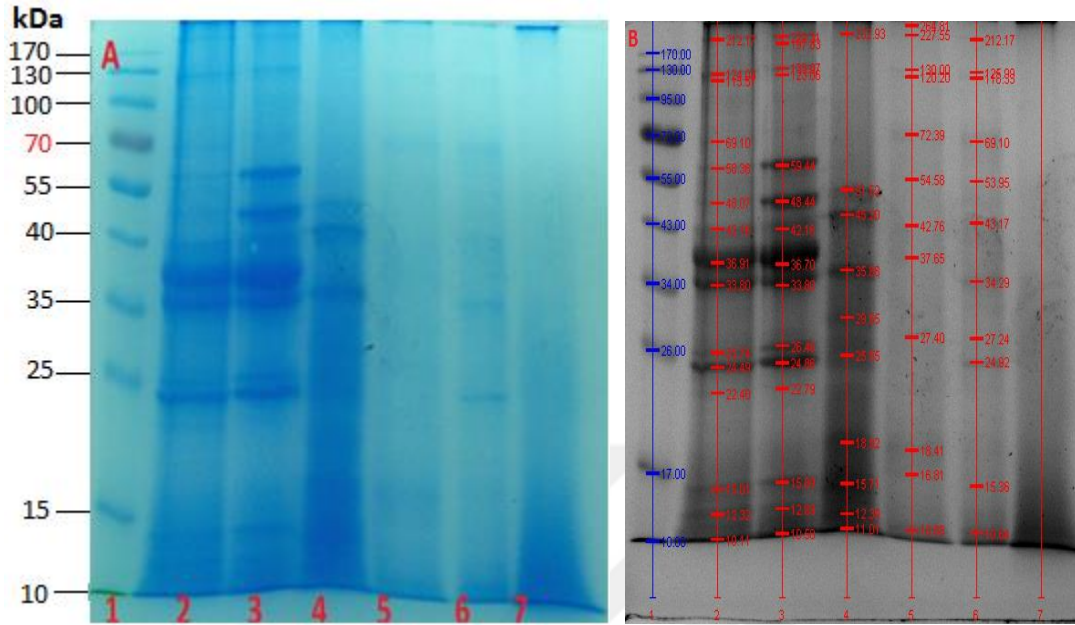
Hamsi, ortalama 6210 mg/kg serbest histidin amino asidi içeriği ile histamin zehirlenmesine (Scombrotoksin fish poisoning) neden olan riskli balık türleri içerisinde yer almaktadır. Balıklarda bozulma sürecinde bakteriyel dekarboksilasyon aktivitesine bağlı olarak histaminin yanı sıra putresin ve kadaverin miktarlarında da artış olmakta ve bu durum histamin toksiditesini arttırmaktadır (FAO ve WHO, 2013). Bu çalışmada hidrolizatların gıda güvenliği açısından kontrolünü sağlamak için hammaddede tespit edilen histamin, putresin ve kadaverin değerleri, her iki materyal grubunda istatistiksel açıdan önemli ($p < 0,05$) farklılıklar göstermiştir. Tespit edilen histamin değerinin yasal limitlerin (EC, 2005; TGK, 2011) altında olduğu (et örneklerinde 16,4 mg/kg, atık örneklerinde ise 15,1 mg/kg), üç biyojen aminin toplam değerleri bakımından ise atık örneğinin et örneğine göre daha yüksek değerde olduğu (35,1 mg/kg) tespit edilmiştir. Bu durum, atık grubunda, sindirim kanalı muhteviyatı bulunmasına ve ayrıca ete nazaran enzim çeşidi/miktarı ve mikroorganizma yükünün daha fazla olmasına bağlanmıştır.

4.1.6. SDS-PAGE

Üç farklı solüsyon (tuz, fosfat buffer ve SDS solüsyonları) ile ekstrakte edilen balık eti ve atıklarındaki proteinlerin SDS-PAGE bant profillerinde, görüntü kalitesi ve sayı açısından önemli farklılıklar gözlenmiştir. Fosfat buffer solüsyonunun en iyi bant görünümünü sağladığı, %1 SDS solüsyonu ile ekstrakte edilen örneklerde ise proteinlerin büyük oranda yitirildiği gözlenmiştir. Tuz solüsyonu kullanıldığında ise, SDS solüsyonundan iyi, fosfat buffer'dan düşük seviyede protein bantları elde edilmiştir.

SDS-PAGE uygulaması sonrasında, görüntüleme cihazının marker protein bantlarını baz alarak yaptığı hesaplamalar neticesinde et örneklerinde 10 kDa ile 212 kDa arasında

yaklaşık 15 adet belirgin protein bandı tespit edilmiştir. Atık örneklerinde ise 10 kDa ile 212 kDa molekül ağırlık aralığında daha az belirgin olan 8 adet bant gözlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Balık eti ve atık proteinlerinin SDS-PAGE mini jelde görüntüleri. (A) orijinal görüntü, (B) görüntüleme cihazı ile alınan görüntü ve marker baz alınarak cihaz tarafından atanan molekül ağırlıkları. (1. marker, 2. tuz solüsyonu ile ekstrakte edilen et, 3. fosfat buffer ile eksakte edilen et, 4. SDS solüsyonu ile ekstrakte edilen et; 5, 6 ve 7 aynı sıralamadaki solüsyonlarla ekstrakte edilen atıklar)

Et örneklerinde atık örneklerine göre yaklaşık 2 kat fazla sayıda protein bandı tespit edilmesi, özellikle miyofibriller proteinlerin et örneğinde daha fazla olmasına bağlanmıştır. Balık eti ve atıkları ile yapılan çalışmalarda tespit edilen protein bantlarının molekül ağırlıkları ve olası protein eşleşmeleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.

4.2. Hidrolizatların Tanımlayıcı ve Besleyici Özelliklerine Ait Bulgular

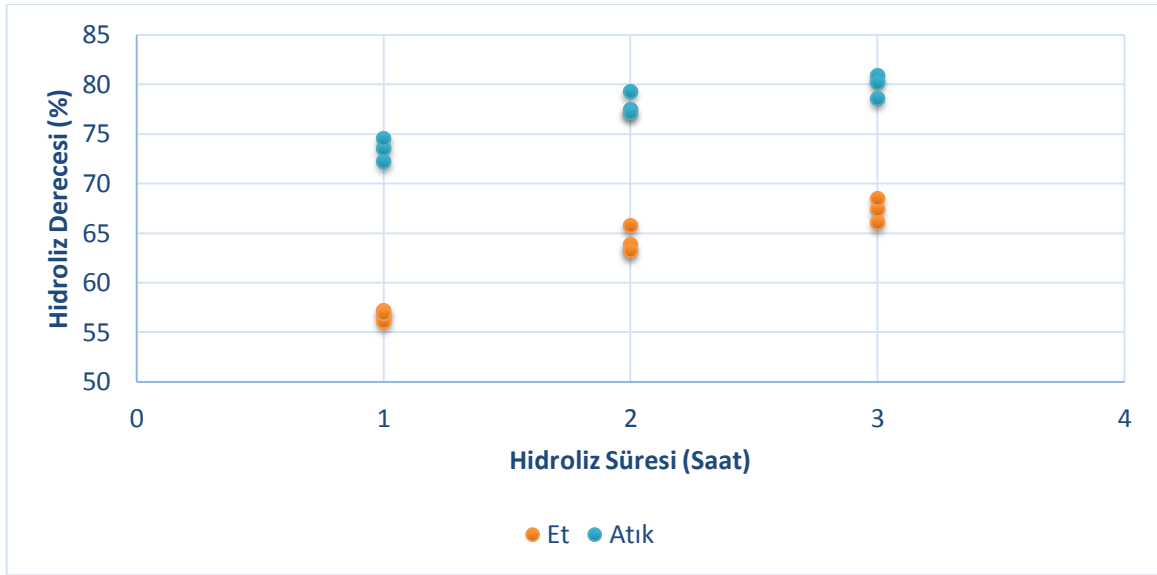
Bu çalışmada et (E) ve atık (A) materyalden elde edilen hidrolizatlar, kullanılan hidroliz süresi (1, 2 ve 3 saat) baz alınarak 6 grupta kategorize edilmiş ve A1, A2, A3, E1, E2, E3 şeklinde kodlanmıştır. Hidrolizat üretimi sırasında öncelikle hidroliz derecesi tespit edilmiş, daha sonra hidrolizatların tanımlayıcı ve besleyici özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 4.4. Balık eti ve atıklarının SDS-PAGE çalışmalarında elde bulgular

Protein Bandı Molekül Ağırlığı (kDa)	Hamsi Eti	Hamsi Atığı	Olası protein tanımı	Literatürde karşılığı (kDa)	Literatür
212,8	X	X	Miyozin ağır zinciri	200-217,7	Stefanson ve Hultin, 1994; Tejada, M., 2001; Azadian ve ark., 2012
126,9	X	X			
115,8	X	X	C Protein	117,7	Azadian ve ark., 2012
60,2	X				
48,0	X		Aktin	46,1-49,2	Azadian ve ark., 2012
42,1	X			42-47	Stefanson ve Hultin, 1994; Tejada, M., 2001; DeCourcy ve Dolan, 2009;
37,2	X		Troponin T	37	DeCourcy ve Dolan, 2009;
34,1	X	X	Tropomiyozin	30,2-35,5	Stefanson ve Hultin, 1994; DeCourcy ve Dolan, 2009; Azadian ve ark., 2012
25,6	X		Miyozin hafif zinciri	~ 20 15-25	Stefanson ve Hultin, 1994; DeCourcy ve Dolan, 2009; Azadian ve ark., 2012
24,6	X	X			
22,8	X		Troponin I	22-23	DeCourcy ve Dolan, 2009
17,2	X		Miyozin hafif zinciri (MLC) Troponin C (T-C)	18 (MLC) 18 (T-C)	Stefanson ve Hultin, 1994; DeCourcy ve Dolan, 2009
15,5	X	X	Miyozin hafif zinciri (MLC) Miyoglobin (M)	15-25 (MLC) 14-18 (M)	Azadian ve ark., 2012; Thiansilakul ve ark., 2011
13,0	X				
11,2		X			
10,6	X	X			

4.2.1. Hidroliz Derecesi (HD)

Protein hidrolizi sırasında ayrılan peptit bağlarının oranı olarak tanımlanan hidroliz derecesi, arzu edilen özelliklerde bir hidrolizat üretimi için temel kontrol noktası olarak kullanılmaktadır (Adler-Nissen, 1979). Et ve atık materyal gruplarına ait % hidroliz dereceleri, hidroliz süreleri bazında Şekil 4.6'da sunulmuştur.



Şekil 4.6. Hidrolizatların hidroliz süreleri bazında hidroliz dereceleri

Et materyali hidroliz dereceleri; 1, 2 ve 3 saatlik hidroliz sürelerine göre sırasıyla %56,7±0,3, %64,3±0,8, %67,3±0,7 olarak tespit edilmiş, atık örneklerinde bu değerler %73,5±0,7, %78,0±0,7 ve %79,9±0,7 şeklinde ve daha yüksek bulunmuştur. TCA'da çözünen protein değerleri et örneklerinde yüksek, atık örneklerinde nispeten düşük bulunmuştur. Bununla birlikte toplam proteine oranlandığında, düşük protein içeriğine sahip atık örneklerinin hidroliz derecesi nispeten yüksek bulunmuştur. Hidroliz derecesi özelliği üzerine materyal tipi ve hidroliz süreleri arasında önemli derecede ($p<0,05$) interaksiyon olduğu tespit edilmiştir.

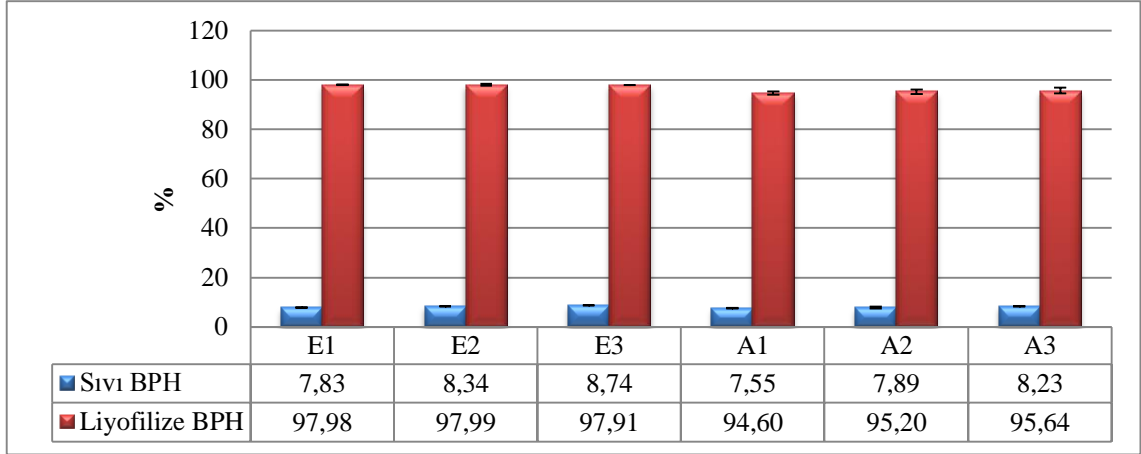
Bu çalışmada olduğu gibi literatürde hidroliz süresi ile hidroliz derecesi arasında doğrusal ilişki olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Benzer şekilde enzim miktarı artışı ile hidroliz derecesinin arttığını gösteren çalışmalara da rastlanmaktadır. Örneğin, Shahidi ve arkadaşları (1995) kapelin balığında (*Mallotus villosus*), 10-150 dakika aralığında, Alcalase enzimini 1-9 AU/100g protein E/S oranında kullanarak en yüksek hidroliz derecesini, sürenin ve E/S oranının en yüksek olduğu çalışmada elde etmişlerdir. pH stat yöntemi ile bu değer %30 olarak tespit edilmiştir. Klompong ve arkadaşları (2007),

%0,25 - %10 (m/m) Alcalase kullanarak *Selaroides leptolepis* türünden pH 8,5'de, 60°C'de 20 dakikaya kadar sürdürdükleri hidroliz sonrasında pH stat yöntemi ile enzim miktarı artışına paralel olarak hidroliz derecesini %15 - %40 arasında belirlemişlerdir. Thiansilakul ve arkadaşları (2007a) ise *Decapterus punctatus* türü ile yaptıkları çalışmada, %8 protein içeren balık/su karışımını 50°C'de, pH 8'de Alcalase enziminden %0,05-5,0 (m/m) oranında kullanarak 1 saat süresince hidrolize etmişlerdir. Kullanılan enzim miktarındaki artışa bağlı olarak hidroliz derecesi de artmış ve hidroliz derecesi TNBS metodu kullanılarak %20, %40 ve %60 olarak tespit edilmiştir. Elavarasan ve arkadaşları (2013) tarafından Alcalase enzimi %1 E/S oranında kullanılarak, *Catla catla* balığı 60°C'de, pH 9'da, 30 dakika süreyle hidroliz edilmiş ve pH stat yöntemi ile hidroliz derecesi %6,70 olarak bulunmuştur.

BPH çalışmalarında farklı hidroliz derecesi tespit yöntemleri ile hesaplanan %HD değerlerinin birbiri ile uyumlu olmadığı, özellikle TCA yöntemi kullanılarak hesaplanan %HD değerlerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu konuda Morais ve arkadaşları (2013) peynir altı proteinlerinin hidrolizinde 4 farklı hidroliz derecesi tespit yöntemini (formol titrasyon, TCA, ortofitalaldehit (OPA) ve ozmometri) karşılaştırmışlar ve en yüksek hidroliz derecesini TCA yöntemi ile elde etmişlerdir. TCA yöntemi kullanılarak hidroliz derecesinin tespit edildiği bir BPH çalışmasında, Amiza ve arkadaşları (2012), *Cobia (Rachycentron Canadum)* balığı fileto atıklarını (frame) Alcalase enzimi ile hidroliz etmişler, kullanılan enzim miktarı (%1,5, %2, %20, m/m) ve hidroliz süresi (120 dk, 180 dk, 300 dk) artışına bağlı olarak hidroliz derecelerini %53, %71 ve %96 olarak belirlemişlerdir.

4.2.2. Makro Besin Bileşenleri

Sıvı hidrolizatlarda yürütülen makro besin bileşenleri analizlerinde; et materyalde en düşük kurumadde (KM) değeri (%7,70) 1 saatlik hidrolizde, en yüksek KM değeri (%8,84) 3 saatlik hidrolizde elde edilmiştir. Atık hidrolizatlarında en küçük KM değeri (%7,5) 1 ve 2 saatlik hidrolizlerde, en yüksek KM değeri (%8,3) ise 3 saatlik hidrolizde elde edilmiştir. Et örneklerinin kurutulmuş hidrolizatlarında ise en küçük (%97,5) ve en büyük (%98,3) kurumadde değerleri 2 saatlik hidrolizde elde edilmiştir. Kurutulmuş atık hidrolizatlarının en küçük KM değeri (%94,0) 1 saatlik hidrolizde, en yüksek KM değeri (%97,0) ise 3 saatlik hidrolizde tespit edilmiştir. Sıvı ve kurutulmuş hidrolizatların grup bazında kurumadde değerleri Şekil 4.7'de grafikte gösterilmiştir. Kurutulmuş hidrolizatlardaki temel besin bileşenlerinin kurumadde bazında hesaplanan değerler Çizelge 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Sıvı ve kurutulmuş hidrolizatların % kuru madde (%KM) değerleri

Yürütülen varyans analizinde sıvı hidrolizatların KM değerleri üzerine materyal tipinin ve hidroliz sürelerinin ana faktörler olarak bireysel etkilerinin önemli olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Sıvı formdaki et hidrolizatlarının ortalama KM değerlerinin (%8,3) atık hidrolizatından büyük olduğu (%7,9); her iki materyal grubunda da hidroliz süresi arttıkça KM değerinin önemli derecede arttığı ($p<0,05$) görülmüştür. Materyal tipinin, çözünebilir protein miktarı üzerine etki ederek KM değerini etkilediği düşünülmektedir. Sıvı hidrolizatlarda KM değerleri üzerinde hidroliz süresinin sadece çözünebilir protein miktarı ile etki etmeyip, hidroliz sırasında kullanılan NaOH çözeltisi hacminin de önemli olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.5. Kurutulmuş hidrolizatların KM bazında makro besin bileşenleri

Hidrolizat Grubu	% Protein	% Kül	% Yağ	% Tuz
E1	83,36 ± 0,58	15,38 ± 0,08	1,03 ± 0,01	4,13 ± 0,24
E2	84,18 ± 0,36	15,54 ± 0,68	1,28 ± 0,04	4,24 ± 0,60
E3	84,71 ± 0,19	15,07 ± 0,45	0,94 ± 0,03	4,51 ± 0,47
A1	76,55 ± 0,67	14,13 ± 0,25	0,93 ± 0,01	5,02 ± 0,26
A2	75,47 ± 0,22	14,15 ± 0,11	0,91 ± 0,01	4,75 ± 0,22
A3	75,67 ± 0,34	14,13 ± 0,14	0,87 ± 0,02	4,63 ± 0,2

Liyofilizatörde kurutulmuş hidrolizatların %KM değerleri üzerine yalnızca materyal tipi (et, atık) etkisinin önemli olduğu ($p<0,05$), hidroliz süresinin ve interaksiyonun önem arz etmediği tespit edilmiştir. Et hidrolizatlarına göre atık hidrolizatlarının sıkı bir yapı

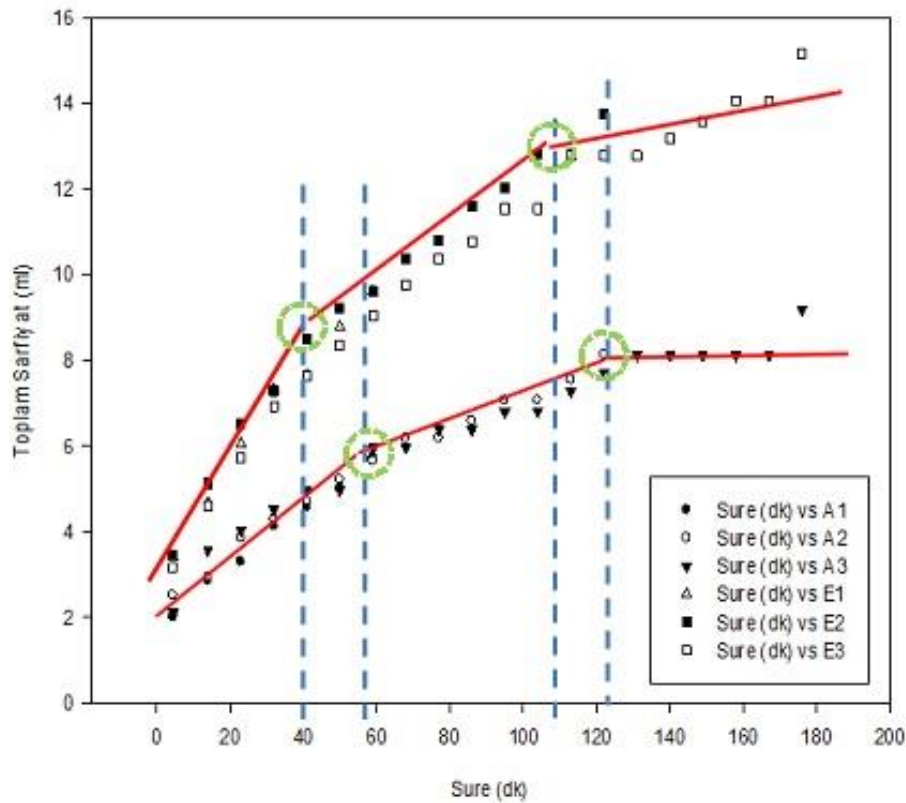
göstermesi sebebiyle rutubetin kolaylıkla uzaklaştırılmamasına bağlı olarak bu hidrolizat grubunda KM değerlerinin daha düşük düzeyde kaldığı düşünülmektedir.

Hidrolizatların protein içeriği üzerine materyal tipi ve hidroliz süresi faktörlerinin müşterek etkisinin (interaksiyon) önemli olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Et materyal grubunda 1 saat hidroliz ile 3 saat hidrolizle elde edilen hidrolizatların protein içerikleri arasındaki fark önemli bulunurken; atık materyal grubunda 1 ile 2 saat hidrolize tabi tutulan örnek grupları arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Hammadde olarak kullanılan et materyali, KM bazında %81,2 protein, atık materyali ise kurumadde bazında %55,6 protein içermekte olup, materyaldeki protein içeriği farklılığının hidrolizatlara yansıdığı görülmüştür. Et grubu hidrolizatlarda kurumadde bazında ortalama %85,08 atık grubu hidrolizatlarda ise daha düşük değerlerde %75,89 oranında protein tespit edilmiştir. Ancak materyaldeki proteine göre değerlendirildiğinde et hidrolizatlarındaki protein artışı %5 civarındayken, atık hidrolizatlarındaki değişimin yaklaşık %36 düzeyinde gerçekleştiği ve verimin bu materyal grubunda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler özellikle atık materyaldeki proteinin hidrolizle yüksek verimde geri kazanılabileceğini göstermektedir.

Kurumaddede % kül değerleri açısından, yalnızca materyal tipi faktörünün önemli farklılığa neden olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Kuru madde bazında ette %6,8 olan kül değeri, et hidrolizatlarında ortalama $\%15,33\pm0,21$ 'e yükselirken; atık materyalinde %19,1 olan kül değeri ise atık hidrolizatlarında ortalama $\%14,14\pm0,09$ 'a gerilemiştir. Atık materyalde bulunan toplam mineral içeriğinin hidrolizata yansımamasının temel nedeni, kül değerine katkı yapan kemik doku ve diğer çözünmeyen katı materyalin hidroliz sonrası santrifüjleme işlemi ile uzaklaştırılmasıdır. Ayrıca atıklara göre et materyalinin hidrolizinde yüksek miktarda kullanılan NaOH, et hidrolizatlarında toplam mineral içeriğinin göstergesi olan kül değerinin yüksek çıkmasını sağlamıştır. Bu katkı mineral kompozisyonunda da açıkça görülmektedir. Hidroliz esnasında kullanılan sodyum hidroksit miktarı bir taraftan hidrolizatın mineral içeriğine katkı yaparken diğer taraftan hidroliz hızındaki değişimleri de yansıtmaktadır. Şekil 4.8'de sunulan grafik, hidrolizlerde zamana bağlı olarak sarfedilen toplam NaOH miktarları (ml) ile elde edilmiştir. Burada et materyalinin hidroliz hızı, içerdiği yüksek miktarda proteine bağlı olarak tüm hidroliz süresince ve birim zamandaki değişim bazında atıklardan yüksek seyretmektedir. Grafikte gözlenen diğer husus, hidrolizin zamana karşı hız kaybetme (eğim açısından değişim) şablonunun et ve atıklarda farklı olmasıdır. Örneğin et hidrolizinde en yoğun hidroliz işlemi ilk 40 dakikada meydana gelmekte, azalma olmakla beraber 110. dakikaya kadar hidroliz etkin bir şekilde

sürmektedir. Atık hidrolizinde ise ete göre daha düşük hızda başlayan hidroliz ilk 60 dakika içerisinde yüksek seyretmekte, hidroliz hızı 60-120 dakika arasında orta hızda sürmekte, 120 dakikadan sonra önemli bir değişim gözlenmemekte yani reaksiyon durağan faza geçmektedir.

Kurumadde bazında %0,9 - %1,3 arasında dağılım gösteren yağın büyük bölümünün hidroliz sonrasında santrifüjleme işlemi ile ayrılması sağlanmıştır. Ancak fonksiyonel özellikler kısmında ifade edileceği gibi protein hidrolizi işleminin emülsiyon oluşturma kapasitesi üzerine etkileri ile bir miktar yağ emülsiyon halinde ayrılan hidrolizat fazında yer almıştır. Küçük değerlerde de olsa ortalamalar arasındaki farklar üzerine materyal tipi ve hidroliz süresi faktörlerinin interaksiyonunun önemli olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. Hidroliz süresince sarf edilen 2N NaOH çözeltisinin hidrolizat grupları bazında ortalama dağılımı

Hidrolizatların kuru maddede % tuz içeriği üzerine yalnızca materyal tipinin (et ve atık) etkisinin önemli olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiş olup; et hidrolizatlarının kuru maddede ortalama tuz miktarı $\%4,29\pm0,12$, atık hidrolizatlarının tuz içeriği $\%4,80\pm0,02$ seviyesinde bulunmuştur. Yürütülen hidroliz işleminde bir taraftan karıştırma yapılırken diğer taraftan ısı uygulanması, materyalin tuz içeriğinin sıvı forma geçmesine neden olmuş, hidrolizatların

kurutulması esnasında kayıp olmadığı için materyale göre daha yüksek değerlere ulaşılmıştır. Kuru madde bazında hidrolizatların tuz içeriği materyale göre kıyaslandığında her iki grupta ortalama 2,4 kat artış olduğu tespit edilmiştir.

4.2.3. Mineral Kompozisyonu

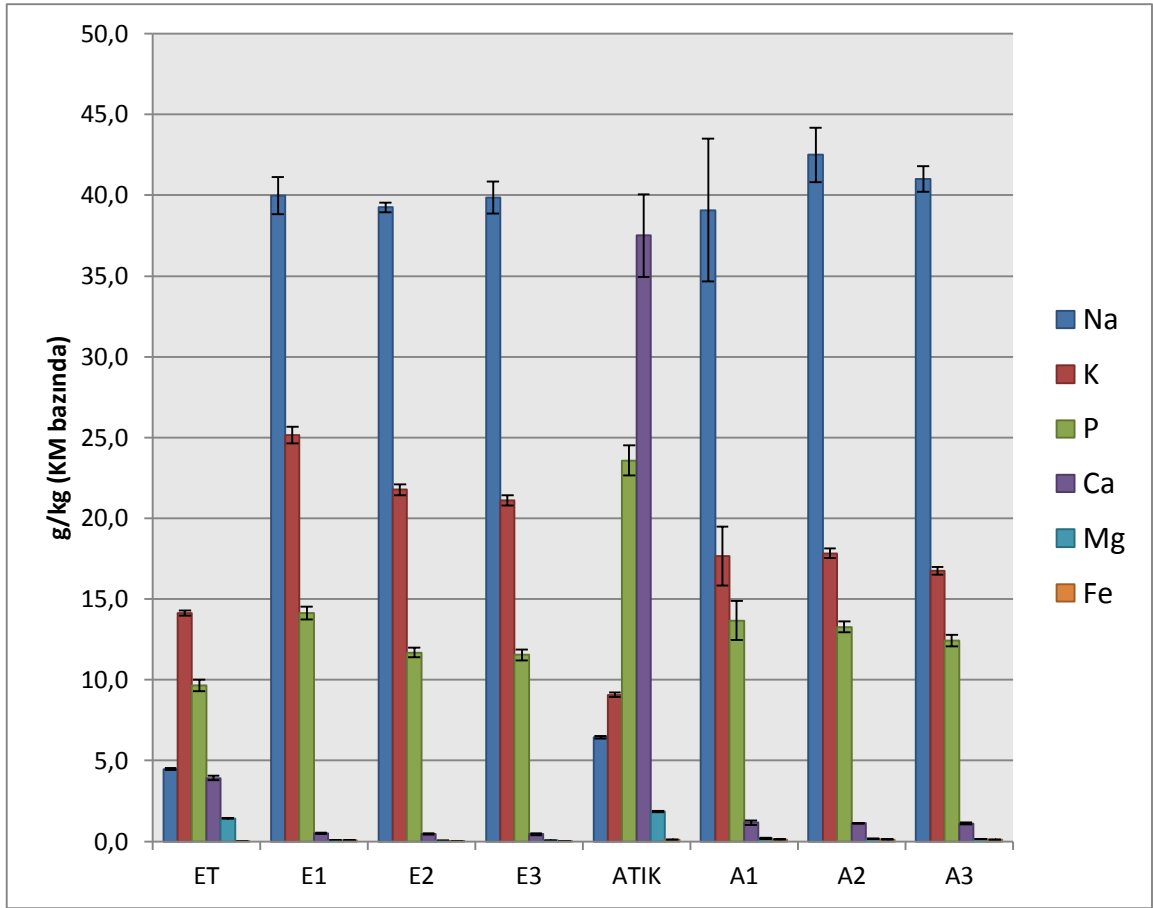
Üç tekrarlı yürütülen hidroliz işlemi sonucunda elde edilen sıvı hidrolizatlarda ICP-OES sistemi kullanılarak tespit edilen 19 mineral madde Çizelge 4.6’da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Balık eti ve atık hidrolizatlarında mineral kompozisyonu (mg/kg)

Mineraller	E1	E2	E3	A1	A2	A3
Çinko	4,1±0,2	4,4±0,3	4,7±0,4	7,3±0,3	5,6±0,7	6,4±1,1
Demir	4,2±1,2	3,2±0,6	3,4±0,7	9,2±2,2	9,3±1,1	9,3±0,5
Fosfor	1106,3±42,8	974,7±27,3	1008,8±51,3	1032,6±165,3	1048,0±90,2	1023,7±52,3
Kalsiyum	39,0±3,7	38,1±4,2	39,0±7,9	87,4±18,3	88,1±4,3	91,2±8,2
Magnezyum	5,4±0,8	3,4±0,9	4,3±1,36	14,5±4,6	12,6±1,2	11,5±0,9
Potasyum	1968,0±26,1	1814,3±28,6	1846,3±28,0	1334,0±24,4	1407,0±30,8	1379,0±38,1
Sodyum	3129,7±84,7	3273,3±89,6	3484,7±117,2	2951,0±87,1	3353,7±61,6	3375,0±89,8
Alüminyum	0,74±0,09	0,68±0,09	0,55±0,02	2,41±0,25	1,87±0,14	1,80±0,08
Arsenik	1,29±0,01	1,23±0,04	1,28±0,05	0,88±0,16	0,89±0,06	0,93±0,12
Bakır	0,43±0,08	0,62±0,59	0,21±0,03	0,46±0,13	0,39±0,04	0,44±0,07
Nikel	0,48±0,11	0,69±0,33	0,69±0,25	0,84±0,26	0,62±0,11	0,76±0,18
Selenyum	0,38±0,02	0,36±0,04	0,34±0,03	0,49±0,13	0,57±0,04	0,54±0,07
Bor	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	0,87±0,55	0,43±0,07	0,30±0,04
Kurşun	0,34±0,02	0,33±0,02	0,35±0,04	0,36±0,07	0,33±0,04	0,32±0,05
Mangan	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B
Kobalt	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B
Krom	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B
Kadmiyum	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B
Kalay	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B	T.E.D.B

TEDB: Tespit edilebilir düzeyde bulunamamıştır. Tespit düzeyleri (mg/kg)= B: 0,15; Cd: 0,027; Sn: 4,94; Co: 0,15; Cr: 0,09; Mn: 0,09

Yürütülen mineral analizi sonuçlarına göre et ve atıklarda Cd, Co, Sn, Pb ve Zn değerleri tespit limitinin altında bulunurken, hidrolizat örneklerinde Cd, Co, Sn, Cr, Mn değerleri ile yalnızca et hidrolizatlarında bor değerleri ölçüm limitinin altında tespit edilmiştir. Hidroliz işlemi sonrasında özellikle çözünmeyerek hidroliz sonunda atılan dokularda bulunan minerallerde azalma görülmüş, hidroliz esnasında büyük oranda hidrolizat sıvı fazına geçen minerallerde ise artış görülmüştür. Kuru madde bazında 1 mg/kg düzeyinin üzerinde bulunan mineraller Şekil 4.9’da grafikte gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Et ve atık materyalleri ile bunlara ait hidrolizatlarda yüksek düzeyde bulunan minerallerin dağılımı

Şekil 4.9’da sunulan grafikte görüldüğü üzere sodyum elementi miktarında, et ve atık materyal ile hidrolizatlar arasında büyük değişim olmuştur. Et hidrolizatlarında ortalama sodyum miktarının ete göre yaklaşık 9 kat, atık hidrolizatlarında ise atık materyaline göre 6 kattan fazla artış göstermesinin temel sebebi, pH stat yöntemine göre yürütülen hidroliz işleminde pH değerini sabit tutabilmek amacıyla kullanılan sodyum hidroksit çözeltilisidir. Farklı materyal hidrolizatlarının sodyum değerleri arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Kas dokusunda yoğun olarak bulunan potasyum, doğal olarak ette daha fazla iken hidroliz sonrası bir miktar kayba uğramıştır. Ete göre atık materyalinde daha düşük potasyum bulunmakla birlikte büyük oranda hidrolizata geçmesi ile hidrolizatlarda yaklaşık 2 kat artış gözlenmiştir. Bu artışta katı maddelerin hidroliz sonrası ayrılması ile birlikte kuru madde içindeki oranının artması etkili olmuştur. Potasyum değerleri açısından grup ortalamaları üzerine materyal tipi ve hidroliz süresi interaksyonunun önemli olduğu tespit edilmiştir ($p>0,05$). Balıkta toplam kalsiyumun yaklaşık %99’u, fosforun ise %80’i iskelet sistemi ve pullarda bulunduğundan (FAO, 1980), bu elementler başlangıçta atık

materyalde ete göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak hidroliz sonrası katı materyalin uzaklaştırılması ile birlikte kalsiyum miktarları bakımından atık hidrolizatlarında yaklaşık 33 kat, et hidrolizatlarında ise yaklaşık 8 kat azalma gözlenmiştir. İstatistiksel olarak kalsiyum ortalamaları arasındaki farklılıkların materyal tipinden kaynaklandığı tespit edilmiştir ($p<0,05$). Fosfor miktarları açısından materyale göre et hidrolizatlarında ortalama %28 artış gözlenirken, atık hidrolizatlarında ortalama %44 seviyesinde bir azalma kaydedilmiştir. Hidrolizat grupları arasında fosfor ortalamaları arasındaki fark önemli değilken ($p>0,05$), aynı grup içinde hidroliz süresinin farklılıklar üzerine önemli etkisinin bulunduğu ($p<0,05$) saptanmıştır. Vücutta büyük kısmı kemik dokuda bulunan magnezyum, hidrolizatlarda hidroliz materyaline oranla önemli derecede azalma göstermiştir ($p<0,05$). Ayrıca et ve atık hidrolizat grup ortalamaları arasındaki farkın önemli olduğu ($p<0,05$), kurumadde bazında $163,6\pm 15,0$ mg/kg ortalama ile atık hidrolizatlarının et hidrolizatlarına göre yaklaşık 3 kat daha fazla magnezyum içerdiği tespit edilmiştir. Aynı tablo hidrolizatların demir içeriğinde de gözlenmiştir. Atık hidrolizatlarının kurumadde bazında ortalama $117,8\pm 4,9$ mg/kg demir bulunurken, et hidrolizatlarında $43,9\pm 9,0$ mg/kg tespit edilmiştir. Hidrolizatlar arasındaki farklılıklar üzerine sadece materyal tipinin etkisinin olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir.

4.2.4. Amino Asit Kompozisyonu

Balık protein hidrolizatlarının sahip olduğu amino asit kompozisyonu; hidrolizatların besleyici değeri ve fonksiyonel özellikleri üzerinde önemli rol oynamaktadır (Satos ve ark., 2011). Bu çalışmada hidrolizatlarda yürütülen amino asit analizi sonuçları kuru madde bazında hesaplanmış; toplam amino asitler Çizelge 4.7’de, serbest amino asitler ise Çizelge 4.8’de sunulmuştur. Hidrolizatların toplam amino asit bileşimi, et ve atık materyalin amino asit içeriğine paralel olarak şekillenmiştir. Ancak hidrolizat eldesi sırasında protein içermeyen yapılar ayrıldığından amino asit miktarlarında bir artış olmuştur. Ayrılan kısımların nispeten az olduğu et hidrolizatlarında hammaddeye göre ortalama toplam amino asit miktarında artış yaklaşık %8 olarak kaydedilirken, bu oran atık hidrolizatlarında %36 gibi dikkat çekici bir seviyede gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.7. Balık eti ve atık hidrolizatlarında toplam amino asit değerleri (KM'de g/100g hidrolizat)

	E1	E2	E3	A1	A2	A3
Alanin	5,39	5,94	4,89	4,88	4,29	4,28
Glisin	3,31	3,89	3,45	4,55	3,80	3,86
Valin*	4,36	5,37	4,90	4,41	4,63	4,35
Lösin*	5,66	7,08	6,11	5,05	4,91	4,81
İzolösin*	5,27	4,89	4,60	4,23	5,05	4,15
Treonin*	2,58	3,07	2,79	2,46	2,03	2,19
Serin	2,27	2,22	2,47	1,99	1,80	2,06
Prolin	2,99	3,70	3,32	4,05	3,82	3,66
Asparajin+Aspartik asit	11,36	10,46	12,14	10,14	10,90	11,05
Metiyonin*	1,12	2,30	2,00	1,67	1,68	1,50
Hidroksiprolin	1,23	0,46	0,28	0,18	2,35	0,76
Glutamin+Glutamik asit	17,07	15,15	15,65	11,93	11,00	9,87
Fenilalanin*	2,36	3,06	2,66	2,05	2,39	2,37
Lizin*	7,54	9,17	7,44	7,46	5,79	4,89
Histidin*	5,47	5,79	5,58	3,64	3,56	2,95
Tirozin*	1,60	2,15	1,93	0,52	1,91	1,75
Sistein*	0,47	0,63	0,40	0,54	0,49	0,36
Toplam esansiyel amino asit miktarı	36,43	43,50	38,39	32,03	32,44	29,32
Toplam amino asit miktarı	80,05	85,33	80,58	69,75	70,42	64,85

*Esansiyel amino asitler

Çizelge 4.8. Balık eti ve atık hidrolizatlarında serbest amino asit değerleri (KM'de mg/100g hidrolizat)

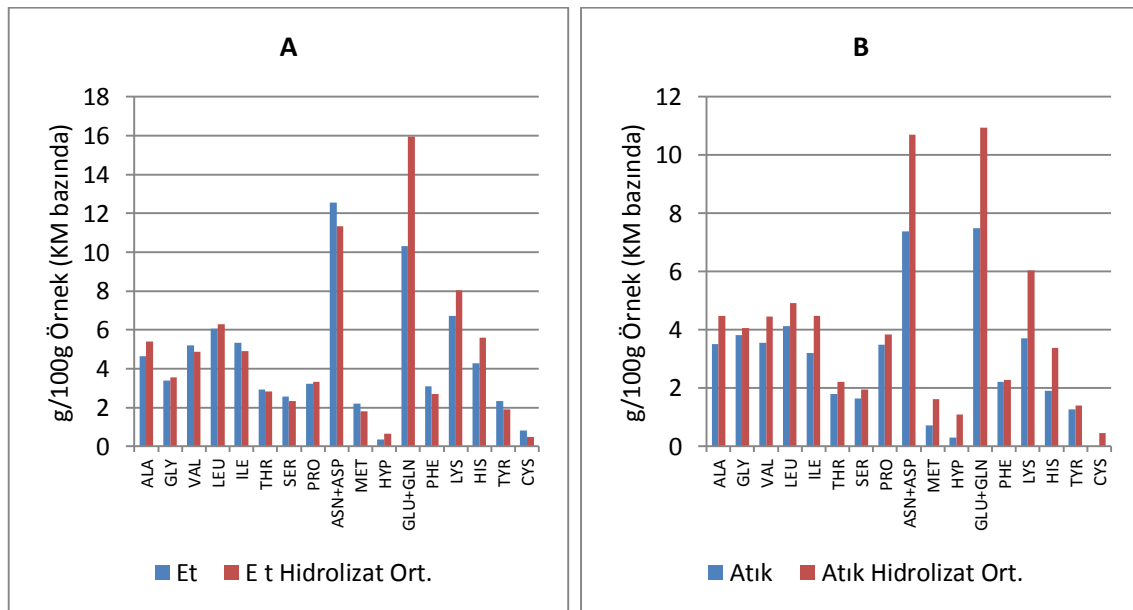
	E1	E2	E3	A1	A2	A3
Alanin	67,2	70,3	71,2	145,5	151,2	146,9
Glisin	19,2	18,9	20,0	42,6	46,4	50,4
Valin*	40,5	40,0	41,6	168,4	172,1	182,6
Lösin*	70,7	74,0	79,2	348,3	380,4	356,6
İzolösin*	41,1	41,7	44,4	178,5	185,0	196,0
Treonin*	14,2	13,3	14,7	54,2	52,1	56,6
Serin	13,8	13,8	14,4	49,8	45,9	49,9
Prolin	39,6	36,8	37,7	103,9	110,5	110,0
Asparajin+Aspartik asit	9,1	9,8	9,2	90,8	96,2	94,3
Metiyonin*	37,7	39,8	44,0	127,5	134,2	132,5
Hidroksiprolin	2,9	6,6	6,9	4,9	4,5	5,0
Glutamin+Glutamik asit	37,7	39,8	41,1	146,7	136,7	134,7
Fenilalanin*	53,7	54,4	57,1	259,4	264,4	270,6
Lizin*	146,1	167,1	177,9	430,7	434,8	390,1
Histidin*	1402,4	1308,6	1328,1	601,8	579,2	615,3
Tirozin*	46,9	47,7	49,8	198,6	203,8	211,4
Sistein*	2,3	2,5	2,2	17,9	19,1	22,3
Toplam esansiyel amino asit miktarı	1855,8	1789,1	1839,1	2385,3	2425,2	2434,0
Toplam amino asit miktarı	2045,2	1985,1	2039,6	2969,5	3016,7	3025,2

*Esansiyel amino asitler

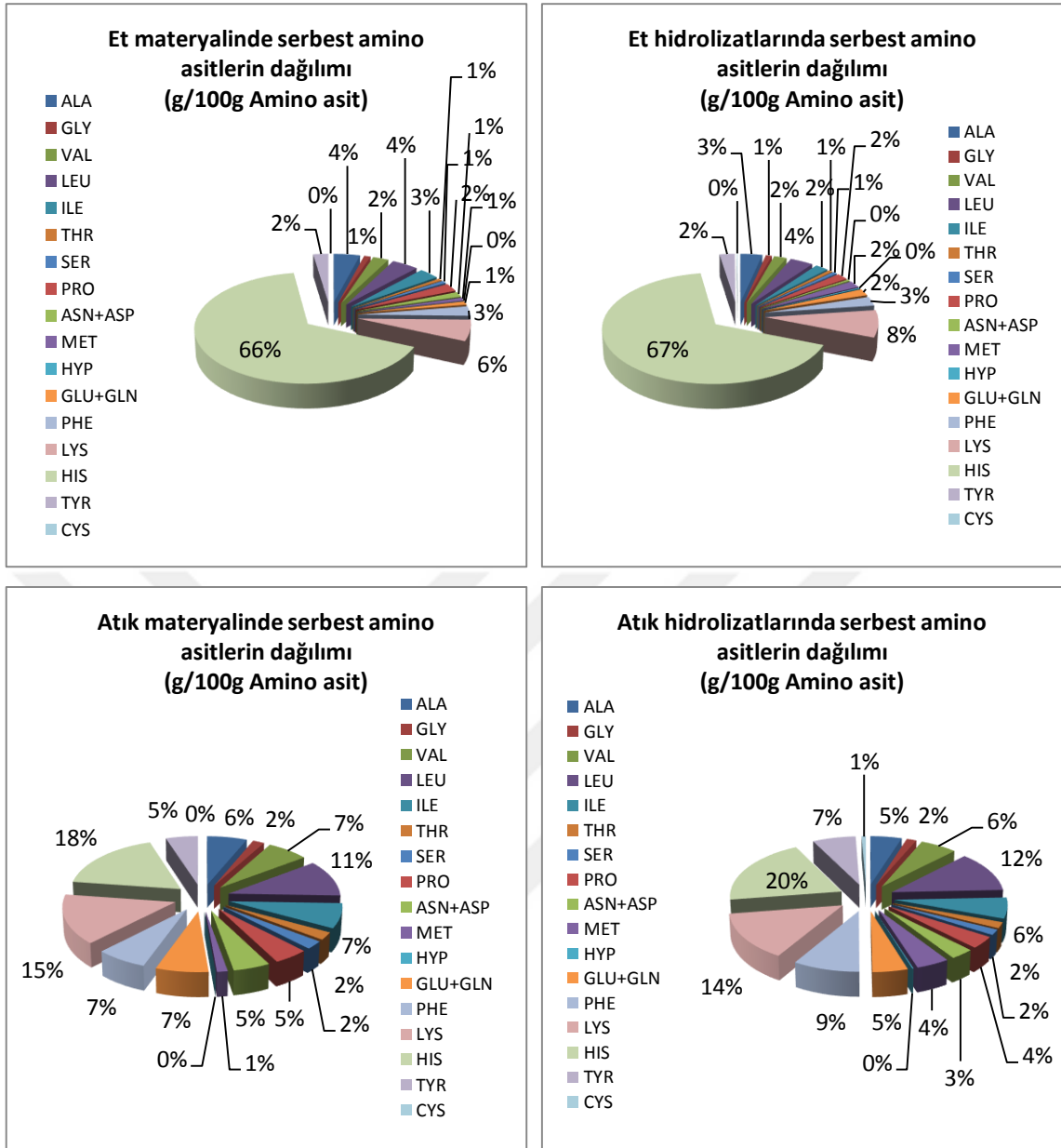
Bu çalışmada toplam amino asit miktarları bakımından et ve atık hidrolizatlarında bir sıralama yapıldığında ilk 5 amino asit; Glutamin+Glutamik asit, Asparajin+Aspartik asit, Lizin, Lösin ve Alanin olmaktadır (Şekil 4.10). Tespit edilen yüksek miktardaki bu amino asitler, hammadde farklılığına bağlı olarak literatürdeki diğer çalışmalarla farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, Roslan ve arkadaşları (2014)'nın tilapya balığı atık hidrolizatları ile yaptıkları çalışmada amino asitler; Glutamik asit, Glisin, Aspartik asit, Alanin ve Lizin şeklinde sıralanmıştır. Thiansilakul ve arkadaşları (2007b) ise, *Decapterus maruadsi* balığı protein hidrolizatlarında yüksek düzeyde bulunan amino asitleri sırasıyla; Arjinin, Lizin, Histidin, Lösin ve Serin şeklinde tespit etmişlerdir.

Literatürdeki benzer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da en düşük düzeyde bulunan amino asit Sistein olmuştur (Batista ve ark., 2010; See ve ark., 2011; Roslan ve ark., 2014).

Esansiyel amino asitlerin (FAO, 1985), kuru madde bazında toplam amino asitlerin yaklaşık yarısına denk geldiği (et hidrolizatlarında ortalama %48,0, atık hidrolizatlarında ortalama %45,7) tespit edilmiştir. Esansiyel amino asitler; kuru madde bazında et hidrolizatlarında ortalama 39,4 g/100g, atık hidrolizatlarında 31,2 g/100g olarak hesaplanmıştır. Esansiyel amino asitlerin materyal ile hidrolizatlar arasındaki değişimi pozitif yönde olmuştur. Bu artış et hidrolizatlarında %1,3 seviyesinde iken, atık hidrolizatlarında çok yüksek seviyede (%72,9) gerçekleşmiştir.



Şekil 4.10. Toplam amino asitlerin dağılımı (A: et materyali ve et hidrolizatları ortalaması; B: atık materyali ve atık hidrolizatları ortalaması)



Şekil 4.11. Hamsi et ve atıkları ile hidrolizatlarında serbest amino asitlerin % dağılımı

Hidroliz işleminin önemli etkilerinden biri de serbest amino asit seviyeleri üzerine olmuştur. Et ve atık hidrolizatlarındaki serbest amino asitlerin miktarı, türetildikleri substrattaki serbest amino asitlerden %91 oranında yüksek bulunmuştur. Bu değişim nispetinde et materyalinde serbest amino asit miktarı %1,06 iken et hidrolizatlarında artarak ortalama %2,02 seviyesine ulaşmış, atık materyalinde %1,57 olan serbest amino asit içeriği ise atık hidrolizatlarında ortalama %3,00 olarak tespit edilmiştir. Serbest amino asitlerin hidrolizatlarında % dağılımına bakıldığında et hidrolizatlarındaki serbest amino asitlerin yaklaşık 2/3' lük kısmını histidin aminoasidinin oluşturduğu, hidroliz öncesi oransal dağılımın et hidrolizatlarına yansıdığı gözlenmiştir. Atık ve atık hidrolizatlarında, ete göre

daha homojen bir dağılım elde edilmiş, serbest amino asitlerin yaklaşık yarısının histidin, lizin, fenilalanin ve lösin amino asitlerinden oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.11).

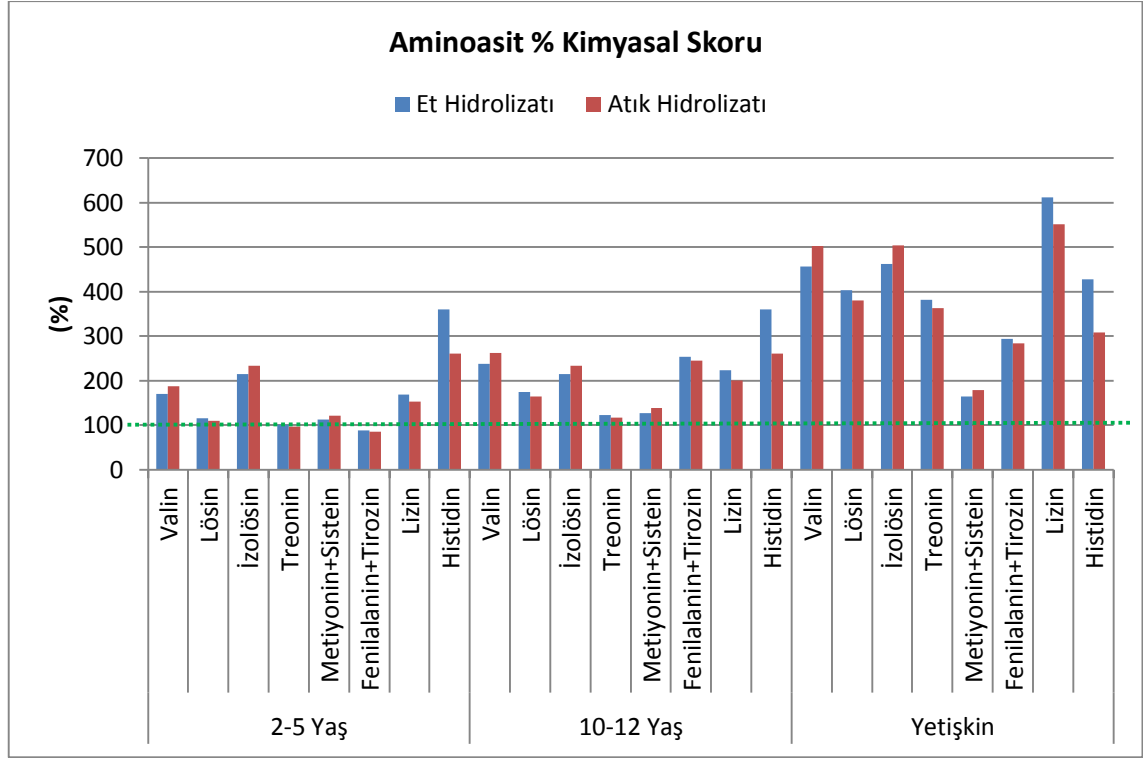
Çizelge 4.9. Farklı yaş grupları için önerilen amino asitler ve bu amino asitlerin hidrolizatlardaki miktarları (mg/g protein)

Amino asit	Yaş Gruplarına Göre Önerilen Referans Model (FAO, 1985)			Aminoasit İçeriği (Ort.)	
	2-5 Yaş	10-12 Yaş	Yetişkin	Et Hidrolizatları	Atık Hidrolizatları
Valin	35	25	13	59,4	65,4
Lösin	66	44	19	76,5	72,1
İzolösin	28	28	13	60,0	65,5
Treonin	34	28	9	34,3	32,6
Metiyonin+Sistein	25	22	17	28,0	30,4
Fenilalanin+Tirozin	63	22	19	55,8	53,8
Lizin	58	44	16	98,0	88,2
Histidin	19	19	16	68,5	49,4

Proteinlerin besleyici değeri, içerdikleri esansiyel amino asitlerin ihtiyacımızı karşılama kapasitesi ile ölçülmektedir (Roslan ve ark., 2014). Kimyasal skor; ele alınan proteinin 1 gramında bulunan amino asitlerin (mg), önerilen amino asit miktarına % oranı şeklinde belirli amino asitler için hesaplanmakta ve elde edilen skor, ihtiyacı karşılama düzeyini göstermektedir (Seligson ve Mackey, 1984). FAO tarafından farklı yaş gruplarına göre önerilen amino asit modeli (FAO, 1985) ile farklı hidroliz sürelerinde elde edilen et ve atık hidrolizatlarının ortalama toplam amino asit miktarları Çizelge 4.9'da sunulmuştur. Çizelge 4.9'da yer alan verilere göre hesaplanan et ve atık hidrolizatları amino asit % kimyasal skorları, Şekil 4.12'de grafik şeklinde verilmiştir (Seligson ve Mackey, 1984). Kimyasal skorun %100 olması, ilgili yaş grubu için önerilen amino asit miktarının tam olarak karşılandığını göstermektedir.

Esansiyel aminoasitler açısından hidrolizatların ihtiyacı karşılama potansiyelinin çok yüksek olduğu; 2-5 yaş grubu çocuklar için yalnızca Fenilalanin+Tirozin değerinde karşılama düzeyinin %87 düzeyinde kaldığı, yetişkin grubunda valin, lösin, izolösin, lizin ve histidin aminoasitlerinin ihtiyaç duyulan miktarların 4 ila 6 katı düzeyinde bulunduğu tespit edilmiştir. Yetişkin grubu için kimyasal skor ortalama değeri et hidrolizatlarında %400, atık hidrolizatlarında %384 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada elde edilen bu veriler, literatürde sazan balığı derisi hidrolizatları (Wasswa ve ark., 2007), Catla balığı iç organları

hidrolizatları (Bhaskar ve ark., 2008) ve tilapya balığı işleme atıklarından elde edilen hidrolizatların (Roslan ve ark., 2014) içerdikleri esansiyel aminoasitler ile kıyaslanmıştır. Gereksinimi karşılama düzeyleri bakımından, hamsi et ve atık hidrolizatlarının besleyici değer açısından önemli derece üstün özelliklere sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.12. Hidrolizatların farklı yaş grupları için önerilen aminoasit ihtiyacını karşılama durumu

4.2.5. Biyojen Aminler

Sıvı hidrolizatlarda HPLC yöntemi ile yürütülen biyojen amin analizleri kapsamında putresin, kadaverin ve histamin seviyeleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Hamsi et ve atıkları ile hidrolizatlarında tespit edilen biyojen aminlerin karşılaştırılabilir kılınması için kuru madde üzerinden hesaplamalar yapılmıştır (Çizelge 4.11)

Et ve et hidrolizatlarının kuru maddedeki biyojen amin değerleri üzerinden yürütülen istatistiksel değerlendirmede farklı hidroliz sürelerinin hidrolizatların kadaverin ve histamin değerleri arasında fark oluşturmadığı ($p>0,05$), et materyalinin kadaverin değerinin et hidrolizatlarından önemli derecede ($p<0,05$) düşük, histamin değerinin ise hidrolizatlardan önemli derecede ($p<0,05$) yüksek olduğu belirlenmiştir. Putresin açısından et materyali ve E1 hidrolizat grubunun, E2 ve E3 hidrolizatlarından önemli derecede ($p<0,05$) yüksek olduğu belirlenmiştir.

Atık materyali ve atık hidrolizatlarının kuru maddedeki değerleri incelendiğinde; kadaverin ve histamin değerleri açısından atık ve hidrolizatları arasında önemli seviyede fark olmadığı ($p>0,05$), atık materyalinin putresin içeriğinin ise hidrolizatlardan önemli seviyede ($p<0,05$) yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Sıvı hidrolizatların putresin, kadaverin ve histamin seviyeleri (mg/kg)

Hidrolizat Grubu	Putresin	Kadaverin	Histamin
E1	1,74±0,21	4,17±0,56	3,22±0,13
E2	1,17±0,10	4,16±0,61	3,03±0,21
E3	1,03±0,03	4,38±0,47	3,41±0,51
A1	3,81±0,15	2,58±0,79	6,00±0,42
A2	3,75±0,16	1,70±0,32	5,13±1,24
A3	3,97±0,20	2,73±0,86	3,98±1,26

Çizelge 4.11. Hamsi et ve atıkları ile hidrolizatlarına ait biyojen amin değerleri (KM'de mg/kg)

Hidrolizat Grubu	Putresin	Kadaverin	Histamin
Et Materyali	26,05±0,22	4,54±0,29	69,21±0,48
E1	22,30±1,71	53,44±4,75	41,20±1,29
E2	14,09±0,79	49,99±4,60	36,38±1,27
E3	11,78±0,19	50,10±2,99	39,07±3,71
Atık Materyali	57,99±1,20	18,34±0,19	57,82±0,13
A1	50,41±1,29	34,17±5,96	79,42±3,50
A2	47,60±1,34	21,74±2,93	65,60±11,00
A3	48,27±1,08	33,32±6,33	48,27±8,53

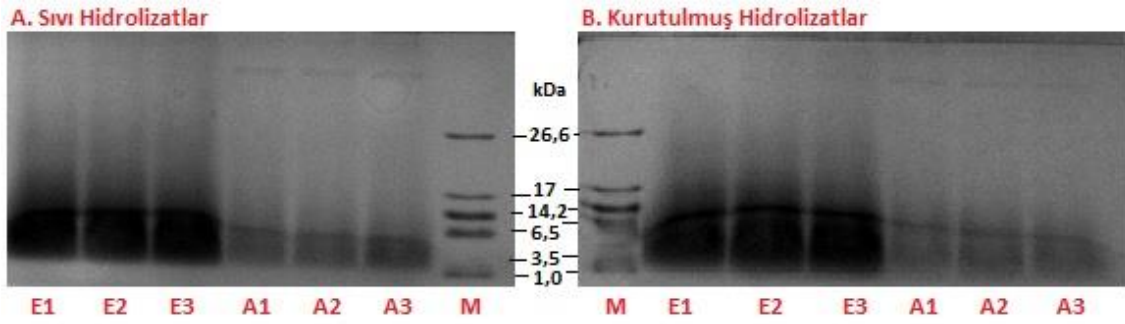
Günümüzde biyojen aminler için oluşturulan yasal düzenlemelerde, yalnızca histamin limit değeri verilmektedir. Aslında bakteriyel bozulma sürecinde ortaya çıkan putresin ve kadaverin gibi diğer putreaktif aminlerin de vücutta histamini metabolize eden sistemleri perdeleyerek toksiditeyi arttırdıkları bilinmektedir. Bu yaklaşımla, çalışmada analiz edilen bu üç aminin KM'deki toplam değerleri de incelenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde bu üç aminin toplam değerleri bakımından et ve et hidrolizatları arasında önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Aynı şekilde KM'de putresin, kadaverin ve histamin değerleri toplamı bakımından atık ve atık hidrolizatları arasında da önemli fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Atık hidrolizatlarında bu üç aminin ortalaması 142,7 mg/kg, et

hidrolizatlarında ise 106,0 mg/kg olarak hesaplanmış, istatistiksel açıdan bu iki değer arasındaki farkın da önemli ($p < 0,05$) olduğu tespit edilmiştir.

Balık ürünlerinde yüksek düzeyde histamin, hasat sonrası uygun şekilde muhafaza edilmeyen balıklarda, serbest histidin amino asitinin bakteriyel dekarboksilasyonu yoluyla oluşmaktadır. Aynı şekilde kadaverin lizin amino asitinden; putresin ise ornitin ve arjinin üzerinden meydana gelmektedir (Santos, 1996; Shalaby, 1996; Krizek ve Kalac, 1998). Yasal düzenlemelerde toksidite sınırı 100 mg/kg (yaş ağırlık) olarak bildirilen histamin, bu değerlerin üzerinde zehirlenmelere sebep olabilmektedir. Histamin zehirlenmesi sıklıkla *Scombridae* ve *Scomberesocidae* familyalarına ait scombroid balıklarla ilişkilendirildiğinden ortaya çıkan zehirlenmeler “Scombrototoxic” balık zehirlenmeleri olarak adlandırılmaktadır (Taylor, 1986). Bu familyalar içinde yer alan orkinos, palamut, uskumru, kolyoz ve zargana gibi balıkların dışındaki bazı balıklar da sahip oldukları zengin serbest amino asit içeriği ile scombroid zehirlenmeleri içinde anılmaktadır. Bunların en önemlileri sardalya, hamsi, lüfer, mahi-mahi, merlin, somon ve ringa türü balıklardır (Flick ve ark., 2001). Yüksek düzeyde histamin oluşturan bakteriler, mezofilik enterik bakteriler olduğundan; histamin ve diğer aminlerin oluşumu, yüksek sıcaklık derecelerinde ($>15-20$ °C) oldukça hızlı seyretmektedir (Ababouch, 1991; Lehane ve Olley, 2000; Flick ve ark., 2001). Bu bilgiler çerçevesinde anılan balık türlerinin kullanımında biyojen amin içerikleri büyük önem arz etmektedir. Bu durum aynı zamanda atıkların kullanımı için muhafazanın önemini vurgulamaktadır. Çalışmamızda histamin değerleri KM bazında dahi en yüksek 79,4 mg/kg değeri gösterdiğinden güvenli bulunmaktadır. Ancak çalışma kapsamında daha önce başka bir hammadde ile yürütülen ön denemelerde, ayıklanmış hamsi etinde histamin değeri, $22,0 \pm 1,7$ mg/kg iken, aynı hammaddeye ait atıklarda $124,2 \pm 4,2$ mg/kg gibi yüksek değer tespit edilmiştir. Atıklar; bakteriyel yükü, sindirim enzimlerinin yüksek oluşu ve çalışmamızda da gösterildiği gibi serbest amino asitlerin ete göre iki kat daha fazla bulunuşu ile biyojen amin oluşumu konusunda iyi bir materyal konumundadır. Bu veriler, atıkların herhangi bir işleme yöntemi için hammadde olarak kullanım amacı bulunması durumunda, muhafazasının büyük bir dikkatle yürütülmesinin önemini vurgulamaktadır.

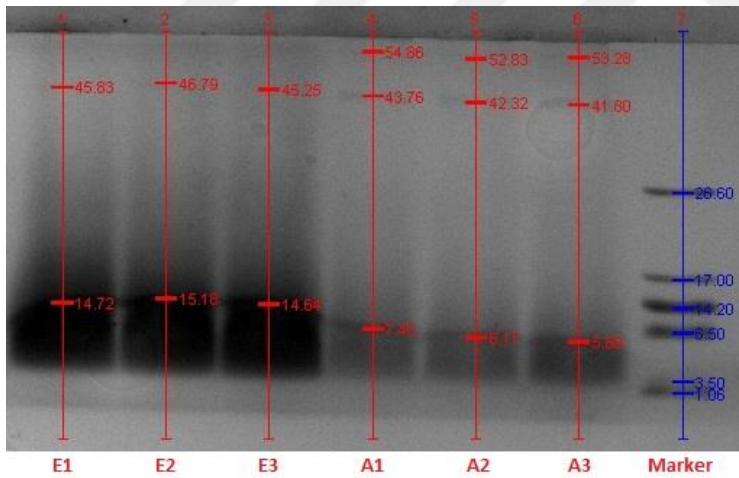
4.2.6. SDS-PAGE

Hidrolizatlardaki protein içeriğinin molekül ağırlıkları bazında dağılımlarını görmek üzere SDS-PAGE çalışması gerçekleştirilmiştir. Sıvı ve kurutulmuş hidrolizatlar ayrı ayrı çalışılmış, SDS-PAGE ile elde edilen görüntülerinin benzer şekilde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Farklı hidrolizat çözeltilerinin SDS-PAGE görüntüleri. M- ultra low molecular weight marker; E- et hidrolizatları, A- atık hidrolizatları; 1, 2 ve 3- hidroliz süreleri (saat)

Görüntüleme cihazının işaretleyici bantların molekül ağırlıklarını baz alarak yaptığı hesaplamada et hidrolizatlarında yaklaşık 45 kDa düzeyinde bir bant, atık hidrolizatlarında ise yaklaşık 42 ve 53 kDa seviyelerinde iki bant tespit edilmiştir. Et hidrolizatlarında 15 kDa seviyesinin altında, atık hidrolizatlarında ise 6,5 kDa seviyesinin altında yığılma gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Hidrolizatlardaki proteinlerin molekül ağırlık dağılımları

Soussi ve arkadaşları (2007) tarafından sardalya balığı atıklarından elde edilen farklı hidroliz derecelerine sahip hidrolizatlarda, bu çalışmadakine benzer şekilde 30 kDa ve 55 kDa seviyelerinde iki protein bandı tespit edilmiştir. Diğer proteinler ise 14,2 kDa seviyesinin altında majör bant oluşturmuş, hidroliz derecesi en yüksek hidrolizatta yığılma daha belirgin olmuştur. Sathivel ve arkadaşları (2005)'nin somon balığı Alcalase hidrolizatlarının SDS-PAGE çalışmasında; 25 dakikalık hidrolizde birkaç bant gözlenirken 75 dakikalık hidrolizde proteinlerin büyük oranda 13 kDa seviyesinin altında toplandığı

tespit edilmiştir. Liceaga-Gesualdo ve Li-Chan (1999), Atlantik ringa balığı Alcalase hidrolizatlarının elektroforetik görüntüsünde, bu çalışmadaki hamsi atık hidrolizatlarına benzer şekilde 6,5 kDa seviyesinde majör bir bant gözlemlemişlerdir. Pacheco-Aguilar ve arkadaşları (2008) tarafından Pasifik berlam balığından Alcalase enzimi ile elde edilen hidrolizatlarda protein bantları düşük hidroliz derecesinde 19 kDa'dan başlarken hidroliz derecesi arttıkça başlama seviyesi 10 kilodaltona kadar inmiştir. Bu çalışmada gerçekleştirilen hidroliz işleminde, seçilen enzim ve reaksiyon şartlarının iyi oluşturulmasına bağlı olarak 1 saatlik reaksiyon süresinde proteinlerin iyi derecede hidrolize olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle yukarıda verilen bazı çalışmalarda olduğu gibi artan hidroliz sürelerinde (2 ve 3 saat) farklı bir elektroforetik tablo gözlenmemiş, ancak hidroliz süresi arttıkça özellikle atık hidrolizatlarında 7 kDa'dan 5 kDa seviyelerine düşme ve bu seviyelerin altında toplanan protein içeriğinde hissedilir bir yoğunlaşma gözlenmiştir.

4.3. Hidrolizatların Fonksiyonel Özelliklerine Ait Bulgular

Hidrolizatlar, fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi amacıyla; protein çözünürlüğü, emülsifiye aktivitesi, emülsiyon stabilitesi, köpük genişlemesi ve köpük stabilitesi, su tutma kapasitesi ve yağ tutma kapasitesi açısından incelenmiştir.

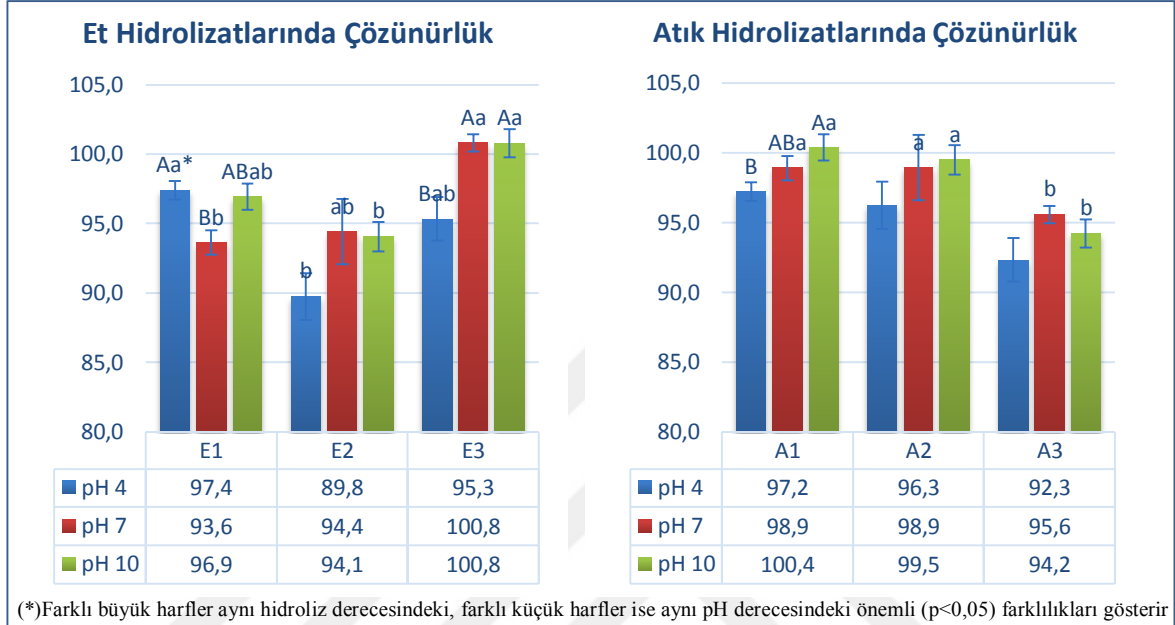
4.3.1. Hidrolizatların Protein Çözünürlüğü

Hidrolizatların protein içeriğinin çözünürlük özelliği 3 farklı pH derecesinde (4, 7 ve 10) incelenmiş, çözünen protein değerleri Şekil 4.15'de sunulmuştur.

Materyal tipi, hidroliz süresi ve pH değerlerinin etkisi altında şekillenen protein çözünürlüğü özelliği üzerinde materyal tipi ve hidroliz süreleri etkileşiminin (interaksiyon) önemli olduğu, her bir hidroliz süresinde et ve atık hidrolizatlarının çözünürlük değeri ortalamalarının önemli seviyede farklılık gösterdiği ($p<0,05$) tespit edilmiştir.

Literatürde izoelektrik noktasına yakın olan pH 4 düzeyinde çözünürlüğün daha düşük olduğu, PH 6 ve üzerinde nispeten artış olduğu; aynı pH derecesinde hidroliz derecesi ile doğru orantıda çözünürlüğün arttığı; %90'ın üzerinde ise çözünürlük değerlerinde diğer faktörler açısından önemli farklılıkların olmadığı bildirilmektedir (Diniz ve Martin, 1997; Gbogouri ve ark., 2004; Klompong ve ark., 2007; Souissi ve ark., 2007; Thiansilakul ve ark., 2007b; Pacheco-Aguilar ve ark., 2008; Santos ve ark., 2011). Bu çalışmada; çözünürlük değerleri %90 ile %100 arasında değişim göstermiş, tüm veri grupları açısından ortalama %96,5 çözünürlük değeri elde edilmiştir. Hidroliz süreleri ile Materyal tipi interaksyonuna ve pH değerlerine göre önemli farklılıklar ($p<0,05$) elde edilmesine karşın artan veya azalan

bir eğilim tespit edilmemiştir. Bu çalışmada kullanılan hidroliz şartlarına bağlı olarak en düşük hidroliz süresinde dahi etkin bir hidroliz gerçekleşmiş, %97 düzeyinde çözünürlüğe sahip hidrolizat üretimi sağlamıştır. Hidrolizat üretiminde materyal tipi ve hidroliz süresinin çözünürlük düzeyine belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür.



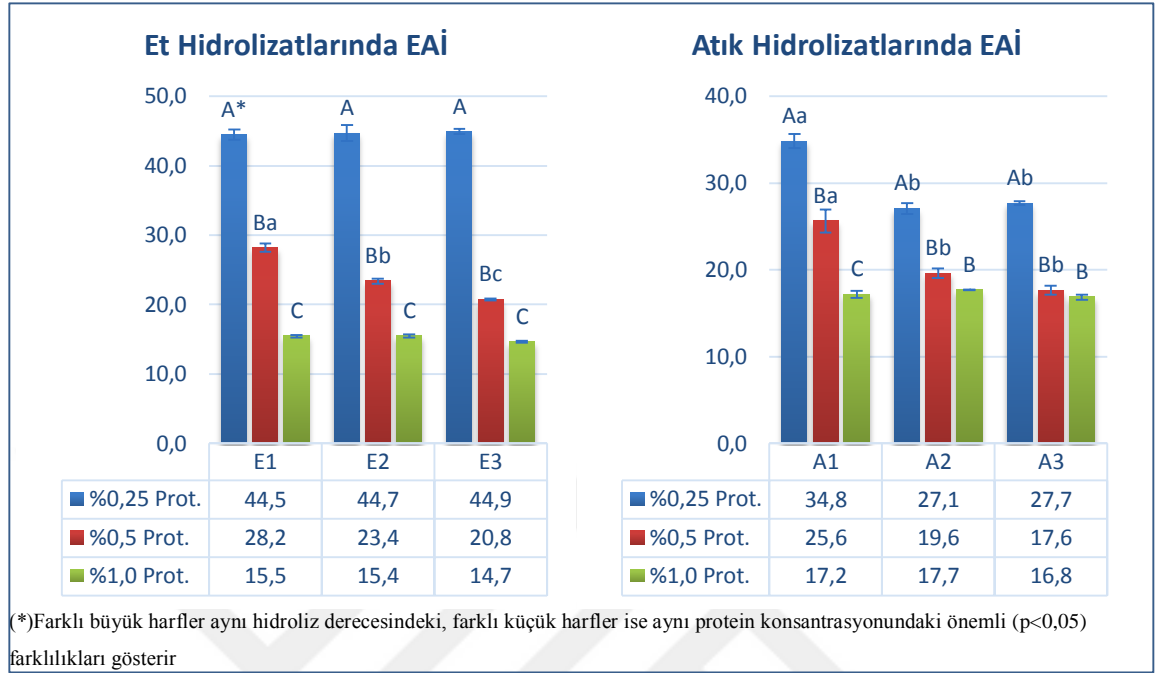
Şekil 4.15. Et ve atık hidrolizatlarının protein çözünürlüğü (%)

4.3.2. Hidrolizatların Emülsifikasyon Aktivitesi

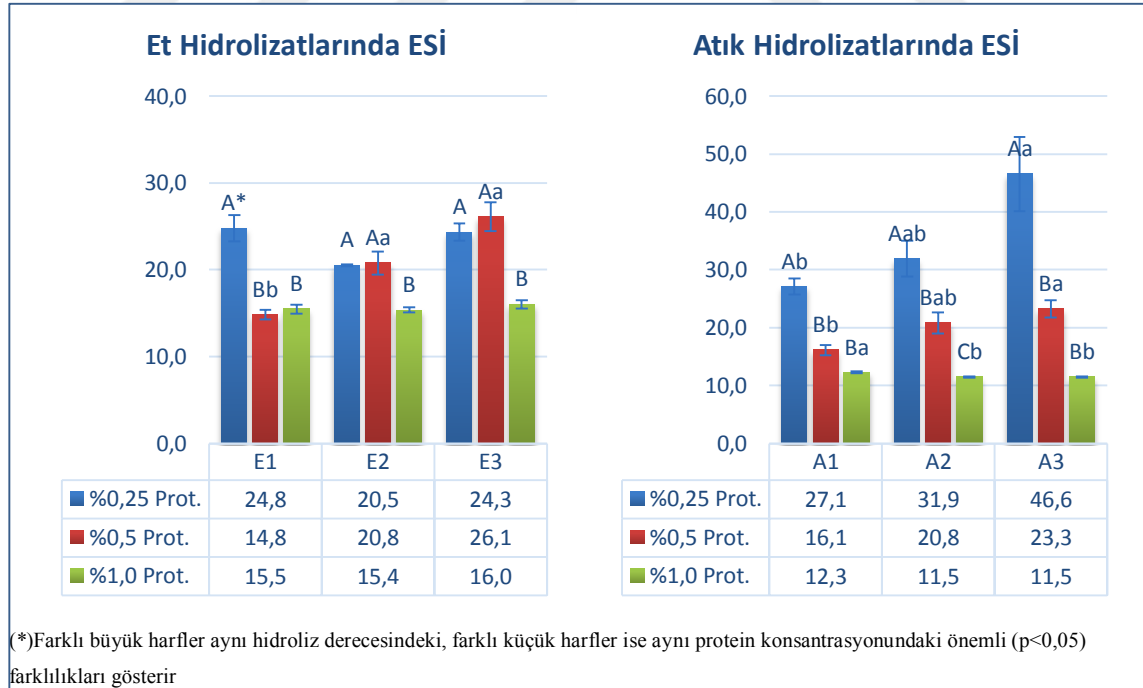
Linder ve arkadaşları (1996)'na göre hidrolizatların emülsiyon mekanizması; peptitlerin homojenizasyon esnasında oluşan yağ damlacıklarının yüzeyine tutunarak koruyucu bir membran oluşturması ve birbirleriyle birleşmesinin önlenmesi şeklinde ifade edilmektedir. Ayrıca bu özelliğin, hidrolizatların yüzey-aktif maddeler olmasına ve sahip oldukları hidrofobik ve hidrofilik gruplarla yağ ve su moleküllerinin emülsiyon oluşturmalarını desteklemesine bağlanmaktadır. Bu çalışmada hidrolizatların emülsifikasyon aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Emülsifiye Aktivite İndeksi (EAI) ve Emülsiyon Stabilite İndeksi (ESI) özellikleri incelenmiştir.

Protein içeriklerine göre EAI (m^2/g) değerleri; et hidrolizatlarında 14,7 ile 44,9 arasında, atık hidrolizatlarında 16,8 ile 34,8 arasında elde edilmiştir. Bu özellik açısından deneme deseninde yer alan materyal tipi, hidroliz süresi ve analiz prosedürüne uygun olarak oluşturulan protein konsantrasyonu faktörlerinin grup ortalamaları üzerine müşterek etkilerinin (interaksiyon) önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Et hidrolizatlarının tamamında ve A1 hidrolizat grubunda protein konsantrasyonu arttıkça EAI değerlerinin

düştüğü, tüm gruplarda %0,25 protein içeriğindeki EAI değerlerinin diğerlerine göre önemli derecede yüksek bulunduğu görülmüştür ($p < 0,05$) (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Hidrolizatların emülsifiye aktivite indeksi değerleri (m^2/g)



Şekil 4.17. Hidrolizatların emülsiyon stabilite indeksi değerleri (dk.)

Protein içeriği %0,25 olan hidrolizatlarda ESI değerleri bakımından atık hidrolizatları ortalamasının (35,2 dk.), et hidrolizatları ortalamasından (23,2 dk.) önemli derecede yüksek

olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Protein içeriği %1,0 olan örneklerde ise et hidrolizatlarının ESİ değerleri ortalamasının (15,6 dk.) atık hidrolizatları ortalamasından (11,8 dk.) yüksek olduğu ($p<0,05$); %0,5 protein içeren hidrolizat grupları arasında önemli bir fark olmadığı ($p>0,05$) tespit edilmiştir. Elde edilen ESİ ortalamaları bakımından grup farklılıkları üzerine Materyal Tipi x Hidroliz Süresi x Protein Konsantrasyonu faktörlerinin interaksyonunun önemli olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

Çalışmamızda literatüre paralel olarak protein miktarı en düşük örnek gruplarında en yüksek EAİ ve ESİ değerleri elde edilmiştir (Gbogouri ve ark., 2004; Thiansilakul ve ark., 2007b; Muzaifa ve ark., 2012). Protein konsantrasyonundaki artışa göre emülsifiye özelliklerinde artış olabilmesi için ortamdaki tüm protein yapılarının emülsifiye aktivitesi içinde olması gerekmektedir. Çünkü hesaplama yapılırken oluşan turbitenin absorbansı, protein konsantrasyonuna oranlanmaktadır. Elde edilen veriler göstermektedir ki; artan protein konsantrasyonuna göre belli bir dereceye kadar emülsifiye özelliklerinde artış olmakta, yağ partiküllerine bağlanan proteinlerden fazlası ortama verildiğinde, bu protein yapıları etkisiz kalmakta ve totalde EAİ ve ESİ değerlerinin düşmesine neden olmaktadır.

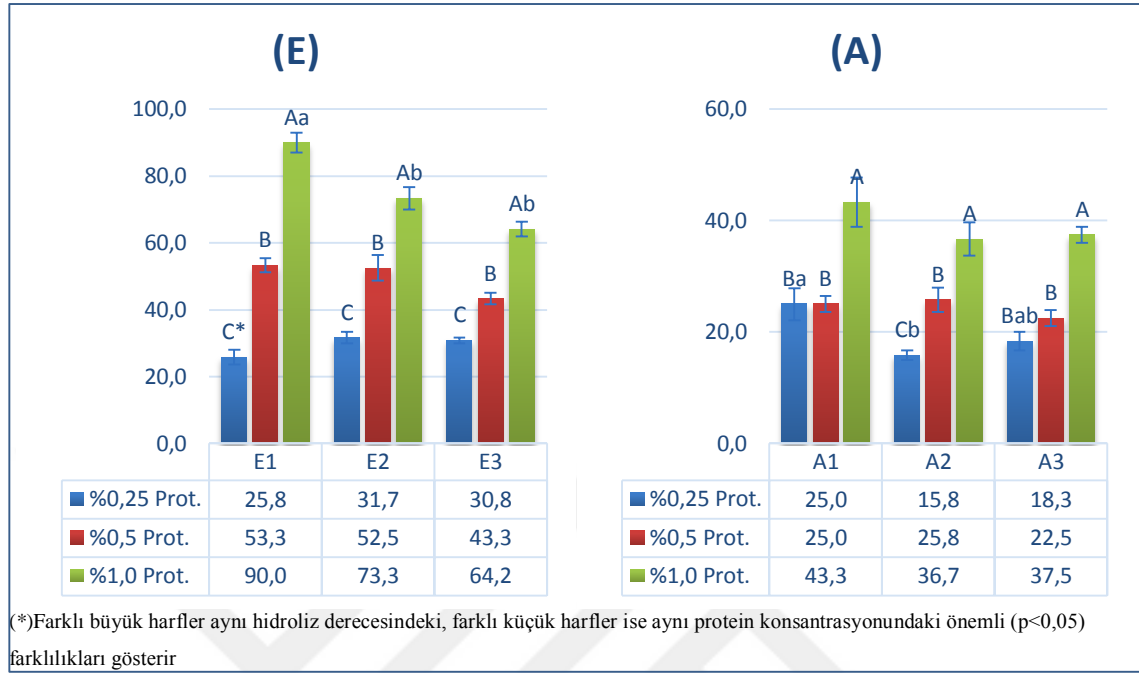
Bazı çalışmalarda emülsifiye aktivitesinin hidroliz derecesi ile ters orantılı olduğu (Klompong ve ark., 2007; Wasswa ve ark., 2007), bazılarında ise hidroliz derecesinin etkisi bulunmadığı tespit edilmiştir (Gbogouri ve ark., 2004). Bu çalışmada hidroliz süresine göre EAİ ve ESİ değerleri belirgin bir eğilim göstermemekle birlikte, aynı hidrolizat grubunda 1 saatlik hidroliz süresine ait örneklerin diğer hidrolizatlarla aynı veya onlardan daha yüksek değerde oldukları görülmüştür. Literatürde balık veya atıkları ile yapılan çalışmalar incelendiğinde en yüksek EAİ değeri 40 m²/g (Muzaifa ve ark., 2012) iken bu çalışmada et hidrolizatlarında 45 m²/g olarak bulunmuştur. Literatürde en yüksek 36 dk (Thiansilakul ve ark., 2007b) olarak belirlenen ESİ değeri bu çalışmada atık hidrolizatlarında 47 dk olarak tespit edilmiştir. Bu verilere göre et hidrolizatlarının emülsifiye aktivitesi, atık hidrolizatlarının ise emülsiyon stabilitesinin üstün özellikte olduğu görülmüştür.

4.3.3. Hidrolizatların Köpük Oluşturma Özellikleri

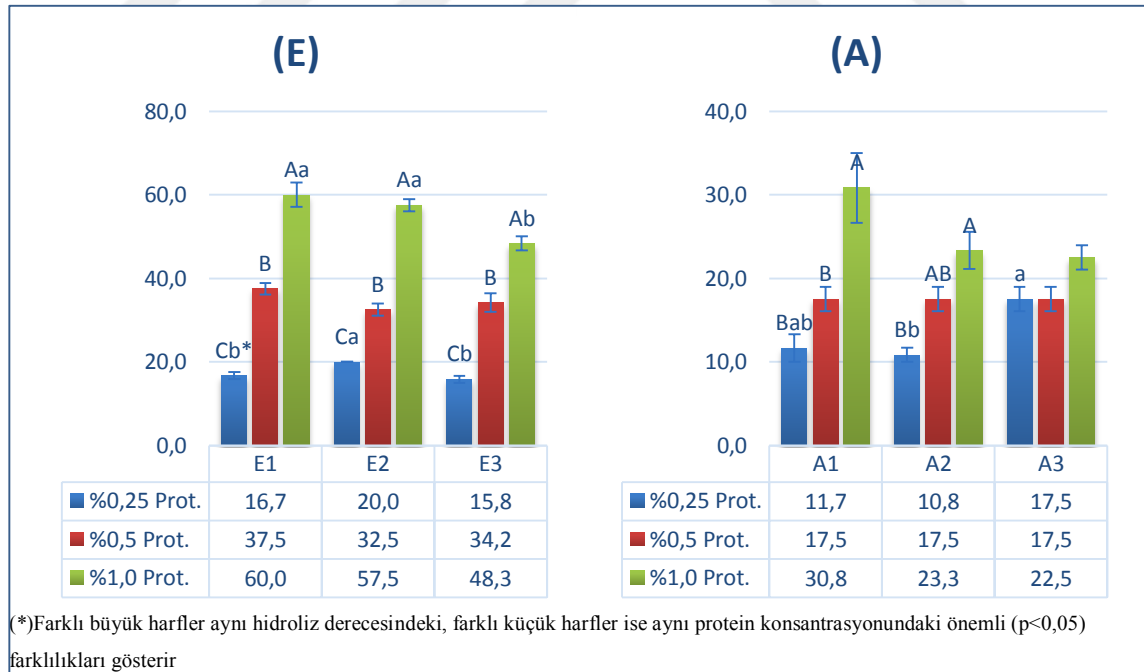
Hidrolizatların %0,25, %0,5 ve %1,0 protein içeren sulu çözeltilerinin karıştırılmasıyla oluşan köpüğün hacmi köpük genişlemesi (KG) değeri, oluşan köpüğün 1 saat sonraki hacmi ölçülerek köpük stabilitesi (KS) değerleri elde edilmiştir.

Elde edilen verilerin istatistiksel analizinde EAİ ve ESİ değerleri gibi KG değerleri bakımından da grup ortalamaları arasında farklılıklarda Materyal Tipi x Hidroliz Süresi x Protein Konsantrasyonu faktörlerinin interaksyonunun önemli olduğu ($p<0,05$) tespit

edilmiştir. KS özelliğinde üçlü interaksiyon tespit edilmemiş, ancak bu üç faktör arasında ikili interaksiyonların önemli olduğu ($p<0,05$) görülmüştür.



Şekil 4.18. Hidrolizatların köpük genişleme özelliği (%)



Şekil 4.19. Hidrolizatların köpük stabilitesi özelliği (%)

KG özelliği bakımından en yüksek ortalamalar, %1,0 protein içeriği olan örneklerde E grubunda %75,8; A grubunda %39,2 olarak tespit edilmiştir. Et ile atık hidrolizatlarının

aynı protein konsantrasyonundaki ortalama KG değerleri arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). A1 ve A3 dışındaki örnek gruplarında, protein konsantrasyonu arttıkça KG değerleri de önemli düzeyde artmıştır (şekil 4.18).

Köpük stabilitesi değerlerindeki değişim KG özelliği ile benzerlik göstermiş, en yüksek %KS değeri %1,0 protein içeren örneklerde E grubu için ortalama %55,3; A grubu için ise %25,6 olarak elde edilmiştir (şekil 4.19). KS özelliği bakımından tüm E grubu örneklerin A grubu örneklerden yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Bu iki grupta ise en yüksek değerler en yüksek protein içeriğinde elde edilmiştir ($p<0,05$). Hidroliz süreleri bakımından incelendiğinde sadece 1 ve 3 saatlik hidrolizatlar arasında önemli farklılık olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Literatürde hidroliz derecesindeki artışa göre köpürme özelliğinde ve stabilitesinde düşme olduğunu bildiren bazı çalışmalar (Klompong ve ark., 2007; Souissi ve ark. 2007) olmasına rağmen çalışmamızda bu durum net olarak gözlenmemiştir. Literatürde incelenen çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da protein konsantrasyonu arttıkça köpürme özelliklerinde artış gözlenmiştir (Thiansilakul ve ark., 2007b; Muzaifa ve ark., 2012). Et hidrolizatlarının %90 KG ve %60 KS gibi bariz bir şekilde yüksek köpürme özelliklerine sahip olduğu, atık hidrolizatlarının da %43 KG ve %30 KS gibi daha düşük değerlerde bu özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

4.3.4. Hidrolizatların Yağ ve Su Tutma Özellikleri

Hidrolizatların yağ tutma kapasitesi (YTK) ve su tutma kapasitesi (STK) değerleri Çizelge 4.12'de verilmiştir. Literatürle uyumlu olarak YTK ve STK bakımından et ve atık örneklerinde hidroliz sürelerinin önemli bir etki yaratmadığı ($p>0,05$) tespit edilmiş (Diniz ve Martin, 1997; Sathivel ve ark., 2005; Souissi ve ark., 2007), ancak bu özellik üzerine materyal tipi ve hidroliz süresi arasında interaksiyonun önemli olduğu ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Atık hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesi ortalamasının (3,3 ml/g) et örneklerinkine (3,1 ml/g) göre önemli derecede ($p<0,05$) yüksek olduğu belirlenmiştir.

Su tutma kapasitesi özelliği bakımından et ve atık örnek grupları arasındaki farkın önemli olmadığı, hiçbir faktörün bu özellik üzerine etki etmediği görülmüştür ($p>0,05$). STK ve YTK özelliği bakımından da tüm hidrolizat ortalamaları (3,3 / 3,2 ml/g) arasındaki farkın önemli olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Çizelge 4.12. Hidrolizatların yağ ve su tutma kapasiteleri

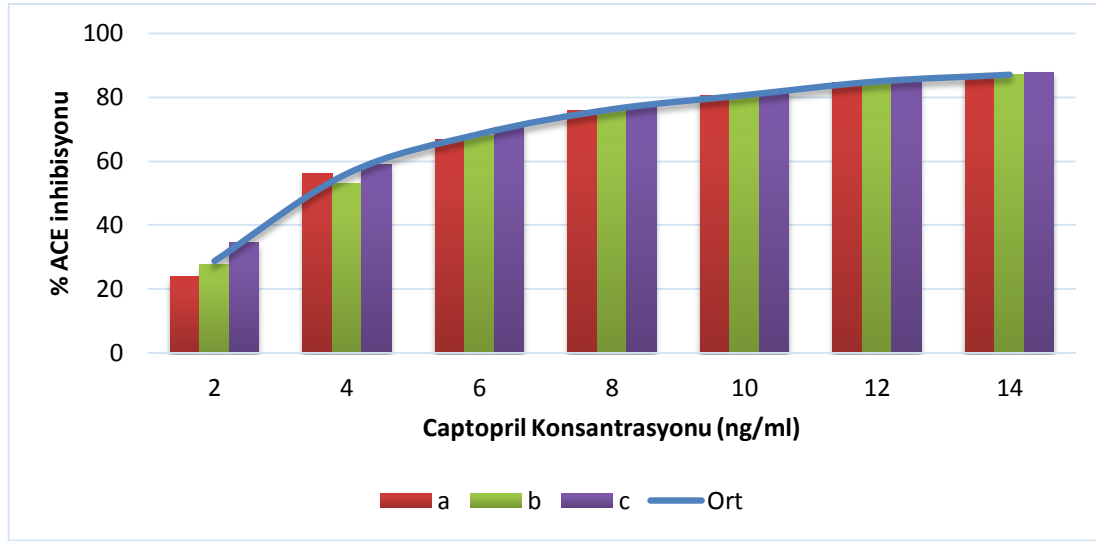
Hidrolizat Grubu	Yağ Tutma Kapasitesi (ml/g)	Su Tutma Kapasitesi (ml/g)
E1	3,0±0,0	3,3±0,1
E2	3,0±0,0	3,3±0,1
E3	3,2±0,0	3,3±0,1
A1	3,3±0,1	3,3±0,1
A2	3,4±0,1	3,3±0,2
A3	3,1±0,0	3,1±0,1

Literatürde yağ ve su tutma kapasiteleri üzerine hidroliz derecesinin etkisi konusunda farklı sonuçlarla karşılaşılmaktadır. Hamsi çalışma sonuçlarına benzer şekilde köpekbalığı eti ve sardalya balığı yan ürünleri hidrolizatlarının yağ ve su tutma kapasitelerinin hidroliz derecesi ile ilişkili olmadıkları ($p>0,05$) tespit edilirken (Diniz ve Martin, 1997; Souissi ve ark., 2007), sazan balığı derisi hidrolizatlarında su tutma kapasitesinin hidroliz derecesi ile doğru orantıda arttığı, buna karşın yağ tutma kapasitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Wasswa ve ark., 2007). Sathivel ve arkadaşları (2005) ise somon balığı kafası hidrolizatlarında en küçük yağ bağlama kapasitesi değerini en yüksek hidroliz derecesinde elde etmişler, su bağlama kapasitesini ise üç hidroliz derecesinde de aynı düzeyde bulmuşlardır. Yürütülen çalışmalar genel olarak değerlendirildiğinde; hidrolizatların yağ ve su tutma kapasitelerinin hammadde, enzim ve reaksiyon şartlarının etkisi altında şekillendiği ve tamamen bu şartlara özgü değerler gösterdiği düşünülmektedir. Bu sebeple farklı çalışmalar arasında ilişki kurulamamaktadır.

4.4. Hidrolizatların Biyoaktif Özelliklerine Ait Bulgular

Hamsi eti ve atıklarının hidrolizatlarında biyoaktif özellikler kapsamında anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibisyonu aktivitesi (antipertensif etki) ve antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Antioksidan özelliği kapsamında DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi ve Fe^{+2} şelatlama özelliği test edilmiştir. Biyoaktif özellikler üzerine etki eden faktörlerden biri de peptitlerin boyutudur. Bu nedenle üretilen hidrolizat gruplarının (A1, A2, A3, E1, E2, E3) bir kısmı ultrafiltrasyona tabi tutulmuş; analizler, filtre edilmiş (<5 kDa) ve edilmemiş (orijinal) örneklerde gerçekleştirilmiştir. Analizlerde diğer faktörlerin yanı sıra ultrafiltrasyon faktörünün etkisi de araştırılmıştır. Literatürde, biyoaktif analizlerin sonuçları farklı birimlerle sunulmakta ve bu durum karşılaştırma konusunda problem oluşturmaktadır.

Bu çalışmada biyoaktif analizler, yorumlama aşamasında kolaylık sağlaması açısından sonuçlar farklı şekillerde ifade edilebilecek şekilde tasarlanmıştır.



Şekil 4.20. Captopril etken maddesinin konsantrasyona bağlı %ACE inhibisyonu grafiği

4.4.1. Hidrolizatların ACE İnhibisyon Aktivitesi

Hidrolizatların, renin anjiotensin sisteminde (RAS) kilit görev üstlenmiş anjiotensin-I dönüştürücü enzimi (ACE) inhibisyon aktivitesi analizleri, 5 farklı hidrolizat konsantrasyonunda gerçekleştirilerek % inhibisyon ve IC₅₀ değerleri elde edilmiştir. Ayrıca yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan ilaç etken maddesi Captopril de analiz edilerek, hidrolizatların ACE inhibisyonu, Captopril eşiti olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.20’de farklı konsantrasyonlardaki Captopril etken maddesine ait %ACE inhibisyon grafiği, Çizelge 4.13’de ise hidrolizatların ACE inhibisyonu aktivite değerleri sunulmuştur.

Hidrolizatların 5 farklı konsantrasyonda %ACE inhibisyon aktivite değerleri ve KM bazında 1 mg/ml’lik konsantrasyonlarına karşılık gelen %ACE inhibisyon aktiviteleri istatistiksel olarak analiz edilmişlerdir. Hidrolizat konsantrasyonu ile ACE inhibisyon aktivitesi arasında doğrusal ilişki olduğu ve tüm örnek gruplarında her bir konsantrasyona ait ACE inhibisyon aktivitesi değerinin diğerlerinden önemli derecede farklı ($p < 0,05$) olduğu görülmüştür. Örnek grupları, ultrafiltrasyona tabi tutulanlar (<5 kDa) ve filtre edilmeyenler (orijinal) olarak iki ayrı şekilde kendi içinde analiz edilmişlerdir. Ultrafiltrasyondan geçirilen hidrolizatlardan A1 ve E1 arasındaki farkın önemli olmadığı ($p > 0,05$), ancak A2 grubunun E2 grubundan ve A3 grubunun E3 grubundan önemli derecede ($p < 0,05$) düşük ACE inhibisyon aktivitesi gösterdikleri tespit edilmiştir. Et ve atık hidrolizatları içinde hidroliz sürelerinin etkisinin önemli olmadığı ($p > 0,05$) tespit edilmiştir.

Filtre edilmemiş orijinal numunelerde de hidroliz sürelerinin %ACE inhibisyonu üzerinde etkisinin önemli olmadığı ($p>0,05$), ancak her hidroliz süresi için (1, 2 ve 3 saat) A örneklerinin E örneklerinden önemli derecede ($p<0,05$) düşük inhibisyon aktivitesi sergiledikleri tespit edilmiştir.

Filtrasyon faktörü dikkate alınarak yürütülen analizde ise filtre edilen numune gruplarının, filtre edilmemiş orijinal numunelerden önemli derecede yüksek ($p<0,05$) ACE inhibisyonu aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. Hidrolizatların KM bazında ACE inhibisyonu aktivitesinin yüzde (%), Captopril eşiti ve IC_{50} değerleri

Hidrolizat Grubu	% ACE inhibisyonu (1 mg/ml)		1 mg/ml hidrolizatın eşiti nM Captopril		IC_{50} (mg/ml)	
	<5 kDa	Orijinal	<5 kDa	Orijinal	<5 kDa	Orijinal
A1	59,50±0,64 ^A	45,34±2,29 ^{Bb}	25,75±0,48	15,24±1,70	0,72±0,02	1,18±0,09
A2	60,79±0,88 ^{Ab}	49,57±1,14 ^{Bb}	26,70±0,65	18,38±0,84	0,70±0,01	1,01±0,05
A3	58,55±1,86 ^{Ab}	48,89±1,65 ^{Bb}	25,04±1,38	17,87±1,23	0,76±0,03	1,04±0,07
E1	62,44±0,75 ^A	53,82±1,14 ^{Ba}	27,93±0,55	21,53±0,85	0,68±0,01	0,84±0,05
E2	65,44±0,79 ^{Aa}	54,39±0,59 ^{Ba}	30,15±0,58	21,95±0,43	0,62±0,01	0,82±0,03
E3	62,91±0,90 ^{Aa}	56,35±1,12 ^{Ba}	28,28±0,67	23,41±0,83	0,63±0,02	0,74±0,05

(A, B) Aynı satırdaki farkın önemli olduğunu ($p<0,05$) gösterir

(a, b) Aynı sütundaki aynı hidroliz sürelerine sahip A ve E arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğunu gösterir

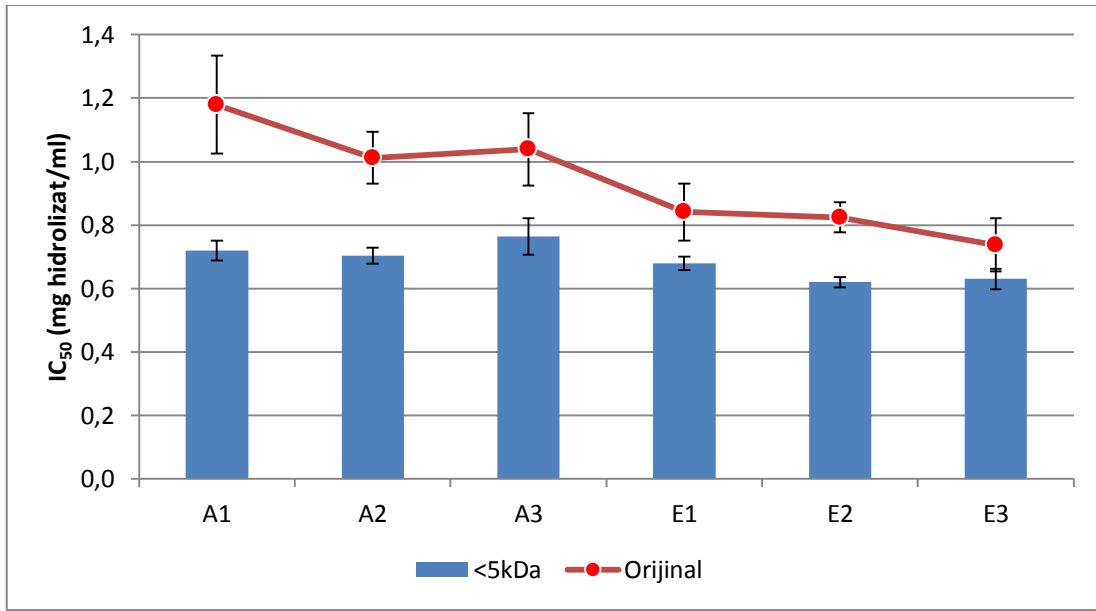
(x, y, z) Aynı sütundaki aynı materyal grubunda hidroliz süreleri arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğunu gösterir

Hidrolizatların ACE inhibisyonu aktivitelerinin istatistiksel olarak analizinde özetle aşağıdaki konularda 4 önemli sonuç elde edilmiştir:

- ACE inhibisyon aktivitesi ile hidrolizat konsantrasyonu arasında doğrusal ilişki bulunmaktadır.
- Tüm A ve E gruplarında, düşük molekül ağırlığına sahip (<5 kDa) hidrolizat örnekleri, filtre edilmemiş hidrolizatlardan yüksek ACE inhibisyon aktivitesine sahiptir. Bir başka deyişle, peptitlerin boyutu küçüldüğünde ACE inhibisyon aktivitesi artmıştır.

- c) Bir istisna dışında (A1 ve E1; <5 kDa) tüm filtre edilmiş ve edilmemiş gruplar içinde; A grubu hidrolizatlar, E grubu hidrolizatlardan daha düşük ACE inhibisyon aktivitesi göstermişlerdir.
- d) Ayrıca filtrasyon durumundan bağımsız olarak, A ve E hidrolizat gruplarının kendi içinde, hidroliz sürelerinin ACE inhibisyon aktivitesine etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Yukarıdaki tespitlerden özellikle filtrasyon etkisi, Şekil 4.21’de IC_{50} değerleri ile çizilen grafikte de net olarak görülmektedir.



Şekil 4.21. Hidrolizatların ACE inhibisyon aktivitesi IC_{50} konsantrasyonları (mg/ml)

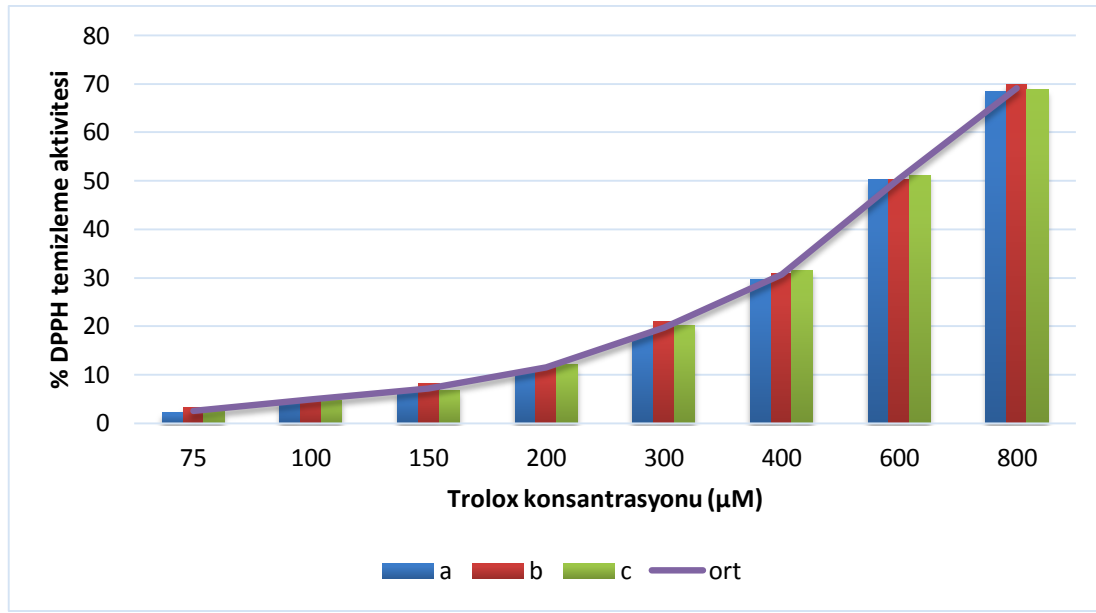
Bu çalışmada en yüksek ACE inhibisyon aktivitesini, ultrafiltrasyondan geçirilmiş E1, E2 ve E3 hidrolizatları göstermiş; IC_{50} değerleri sırasıyla 0,68, 0,62 ve 0,63 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu değerler Byun ve Kim (2001) tarafından ultrafiltrasyondan geçirdikleri <1 kDa peptit içeriğine sahip morina jelatin hidrolizatlarının IC_{50} değerine (0,63 mg/ml) yakın bulunmuştur. Aynı çalışmada, bu çalışma sonuçları ile örtüşür şekilde, daha büyük boyutlu peptit içeriğine sahip hidrolizatların ACE inhibisyon aktivitesi daha düşük bulunmuştur. Ahn ve arkadaşları (2012), somon balığı işleme atıkları hidrolizatları ile yaptıkları çalışmada, en yüksek ACE inhibisyon aktivitesini, Alcalase enzimi kullandıkları hidrolizatlarda 1 mg/ml konsantrasyon için %56 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada filtre edilmemiş hamsi eti hidrolizatlarının bu seviyede olduğu, atık hidrolizatlarının ise ortalama %47,9 ile bu seviyenin altında kaldığı belirlenmiştir. Filtre edilmiş (<5 kDa) A grubu

hidrolizatlar ortalama %59,6 değeriyle, E grubu hidrolizatlar ise ortalama %63,6 değeriyle daha yüksek aktivite göstermişlerdir. Çalışmamızda hidroliz sürelerinin ACE inhibisyon aktivitesine etkisi tespit edilememiştir. Theodore ve Kristinsson (2007), kanal yayın balığı protein izolatlarından protamex enzimi ile hazırladıkları %5 hidroliz derecesindeki hidrolizatın, %15 ve %30 HD'ne sahip hidrolizatların ACE inhibisyon aktivitesinden daha yüksek aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu üç hidroliz derecesindeki örneklerden çözünür fraksiyonları izole edip test ettiklerinde ise bu defa %30 HD znr fraksiyonunun en yüksek aktiviteyi gösterdiğini tespit etmişler ve bu tespitleri ilgi çekici olarak nitelendirmişlerdir. Bu çalışmada hamsi et ve atık hidrolizatları tüm hidroliz derecelerinde ortalama %96,5 düzeyinde çözünürlük gösterdiklerinden, çözünebilir protein fraksiyonu açısından ACE inhibisyonu etkisini değerlendirme durumu olmamıştır. Roslan ve arkadaşları (2014), 1-26 kDa aralığında molekül ağırlığına sahip Nil tilapya balığı işleme atıkları hidrolizatlarının gösterdiği %88,3 gibi yüksek ACE inhibisyonu aktivitesini kuk boyutlu peptitlere ve hidrofobik aminoasitlerin yoğunluğuna bağlamışlardır. Pihlanto-Leppala (2001)'ya göre ACE inhibisyon aktivitesi ile aminoasit dizilimi arasında yüksek ilişki bulunmaktadır. Özellikle triptofan, tirozin, fenilalanin, prolin aminoasitlerinden oluşan ve C-terminalinde hidrofobik aminoasit bulunan tripeptitlerin, ACE'nin aktif bölgesindeki üç alt katalitik bölge ile etkileşime girdiklerinden güçlü inhibisyon etkisi gösterdikleri bildirilmiştir. Hidrofobisite sıralamasında güçlü hidrofobik aminoasitler olarak nitelendirilen Leu, Ile, Phe, Trp, Val, Met amino asitlerinin, çalışmamızda elde edilen atık hidrolizatlarında toplam aminoasitlerin ortalama %26'sını, et hidrolizatlarında ise %25'ini oluşturması elde edilen ACE inhibisyon aktivitesine katkılarının önemli düzeyde olduğunu düşündürmektedir. Meisel (1997) ise C terminalinde Pro, Lys veya Arg kalıntılarında birinin bulunması halinde ACE inhibisyon aktivitesinin güçlendiğini rapor etmiştir. Ahn ve arkadaşları (2012), somon işleme atıkları hidrolizatlarını, ACE inhibisyon aktivitesini arttırmak amacıyla saflaştırma işlemine tabi tutmuşlar, kapsamlı bir saflaştırma prosedürü ile en aktif peptidi izole etmişlerdir. IC₅₀ değeri 6,79 µg/ml ile güçlü bir aktivite gösteren peptit, Phe-Asn-Val-Pro-Leu-Tyr-Glu olarak tanımlanmıştır. Saflaştırılarak tanımlanması yapılan diğer aktif iki peptitle birlikte üç peptit dizisinde Val ve Pro kalıntılarının bulunduğu grlmştir.

4.4.2. Hidrolizatların Antioksidan Aktivitesi

Hidrolizatların antioksidan aktivitesi kapsamında DPPH radikali temizleme aktivitesi ile Fe⁺² şelatlama aktivitesi test edilmiştir.

DPPH radikali temizleme aktivitesi sonuçları, %DPPH temizleme aktivitesi ve Trolox eşdeğeri olarak iki şekilde hesaplanmıştır. Trolox (E vitamininin suda çözünebilir analogu), güçlü antioksidan özellik gösterdiğinden, trolox eşdeğeri olarak ifade edilen değer yüksek olması antioksidan aktivitenin yüksek olduğunu göstermektedir. Farklı konsantrasyonlardaki Trolox'un %DPPH temizleme aktivitesi grafiği Şekil 4.22'de; hidrolizatların DPPH temizleme aktivitesi yüzde ve trolox eşiti şeklinde Çizelge 4.14'de sunulmuştur.



Şekil 4.22. Trolox maddesinin konsantrasyona bağlı %DPPH temizleme aktivitesi

Hidrolizatların stabil %DPPH serbest radikali temizleme aktivitesi; hidrolizat tipi, hidroliz süresi ve filtrasyon etkisi bakımından istatistiksel olarak incelenmiştir. Bu kapsamda filtre edilmiş ve edilmemiş grupların kendi içinde ve ikisi birlikte varyans analizleri gerçekleştirilmiştir. Ultrafiltrasyona tabi tutulan “<5 kDa” grubunda, A1 ve A2 örneklerinin aralarında önemli bir fark olmaksızın ($p>0,05$) A3 örneğinden; aynı şekilde E1 ve E2 örneklerinin de E3 örneklerinden yüksek aktivite gösterdikleri ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Ayrıca tüm hidroliz sürelerinde (1, 2 ve 3 saat), A örneklerinin tüm E örneklerinden yüksek aktivite ($p<0,05$) gösterdiği görülmüştür. Filtre edilmemiş orijinal hidrolizat örneklerinden A grubunda hidroliz süresi artışı ile ters orantıda DPPH temizleme aktivitesinde önemli seviyede ($p<0,05$) azalma kaydedilmiştir. E grubunda ise 1 saatlik hidrolizle elde edilen örneklerin 2 ve 3 saatlik örneklerden önemli derecede ($p<0,05$) yüksek aktivite gösterdiği, 2 ve 3 saatlik hidroliz ürünleri arasında DPPH temizleme aktivitesi

bakımından fark olmadığı ($p>0,05$) tespit edilmiştir. Ayrıca tüm hidroliz seviyelerinde A grubu hidrolizatların E grubuna göre önemli derecede yüksek ($p<0,05$) aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Ultrafiltrasyon işleminin, DPPH temizleme aktivitesine etkisi önemli ($p<0,05$) bulunmuş; tüm numune tiplerinde (A1, A2, A3, E1, E2, E3), “<5 kDa” örneklerin filtre edilmemiş örneklerden yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Kuru madde bazında 1mg/ml konsantrasyondaki hidrolizatlara ait %DPPH temizleme aktivitesi Şekil 4.23’de grafik şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.14. Hidrolizatların KM bazında yüzde (%) ve trolox eşiti olarak DPPH temizleme aktiviteleri

Hidrolizat Grubu	% DPPH temizleme aktivitesi (1 mg hidrolizat/ml)		μ M Trolox eşiti DPPH temizleme aktivitesi (1 mg hidrolizat/ml)	
	<5 kDa	Orijinal	<5 kDa	Orijinal
A1	21,29 \pm 0,05 ^{Aax}	14,18 \pm 0,13 ^{Bax}	257,43 \pm 0,52	164,54 \pm 1,36
A2	20,95 \pm 0,05 ^{Aax}	13,65 \pm 0,03 ^{Bay}	256,19 \pm 0,53	158,50 \pm 0,34
A3	19,98 \pm 0,22 ^{Aay}	12,74 \pm 0,01 ^{Baz}	242,61 \pm 2,33	148,02 \pm 0,11
E1	16,61 \pm 0,21 ^{Abx}	11,51 \pm 0,13 ^{Bbx}	210,32 \pm 2,21	136,08 \pm 1,40
E2	16,58 \pm 0,08 ^{Abx}	10,55 \pm 0,07 ^{Bby}	205,77 \pm 0,84	124,38 \pm 0,75
E3	15,77 \pm 0,09 ^{Abby}	10,65 \pm 0,10 ^{Bby}	195,31 \pm 0,90	125,36 \pm 1,04

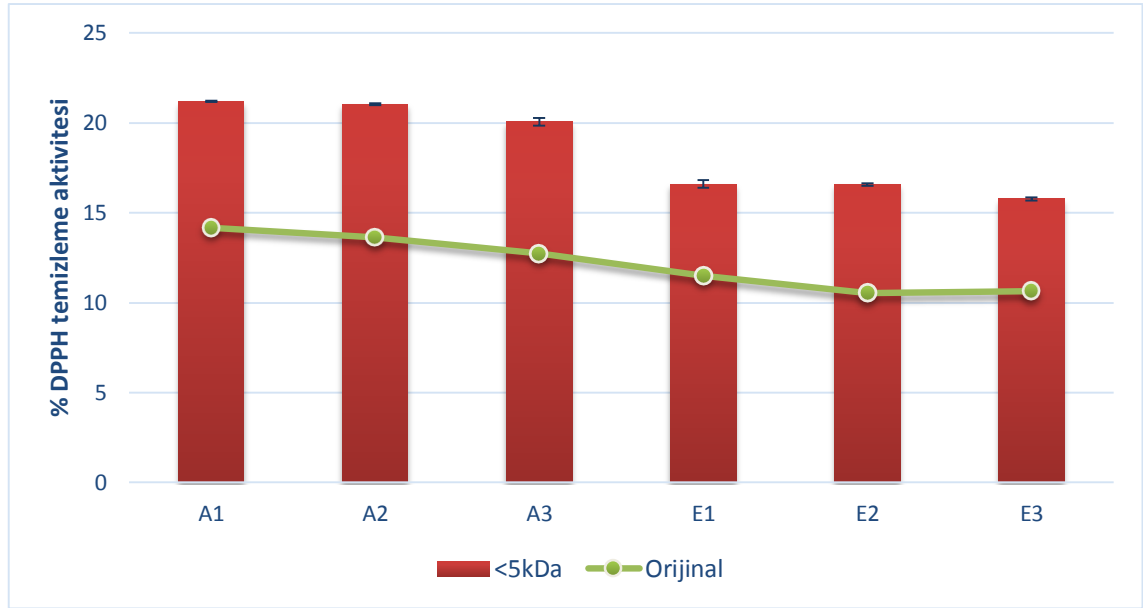
(A, B) Aynı satırdaki farkın önemli olduğunu ($p<0,05$) gösterir

(a, b) Aynı sütundaki aynı hidroliz sürelerine sahip A ve E arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğunu gösterir

(x, y, z) Aynı sütundaki aynı materyal grubunda hidroliz süreleri arasındaki farkın önemli ($p<0,05$) olduğunu gösterir

Çalışma materyali hamsi eti ve işleme atıkları hidrolizatlarında, biyoaktif özelliklerden ACE inhibisyon aktivitesi ile DPPH radikali temizleme aktivitesi karşılaştırıldığında bazı farklılıklar göze çarpmaktadır. Genel itibariyle et hidrolizatları ACE inhibisyonu bakımından atık hidrolizatlarından yüksek aktivite gösterirken; DPPH radikali temizleme aktivitesi açısından atık hidrolizatları, et hidrolizatlarına göre net bir üstünlük sergilemiştir. Ultrafiltrasyon işlemi, hidrolizatların ACE inhibisyonu ve DPPH temizleme aktivitelerinde önemli derecede iyileşmeye sebep olmuştur. Ancak orijinal numuneye göre filtre edilen numunelerde gözlenen bu artış; ACE inhibisyon aktivitesinde %11,6 ila %31,2 aralığında iken, DPPH radikali temizleme aktivitesinde çok daha yüksek oranda %43,4 ila %58,1 arasında gerçekleşmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda et hidrolizatlarının yüksek ACE inhibisyon aktivitesinin, temel olarak içerdiği miyofibriller proteinlerden; atık hidrolizatlarının yüksek DPPH temizleme aktivitesinin ise yoğun olarak içerdikleri düşük

molekül ağırlıklı (Sen, 2005) sarkoplazmik proteinlerden (enzimler, hemoglobin vb.) kaynaklandığı düşünülmektedir.

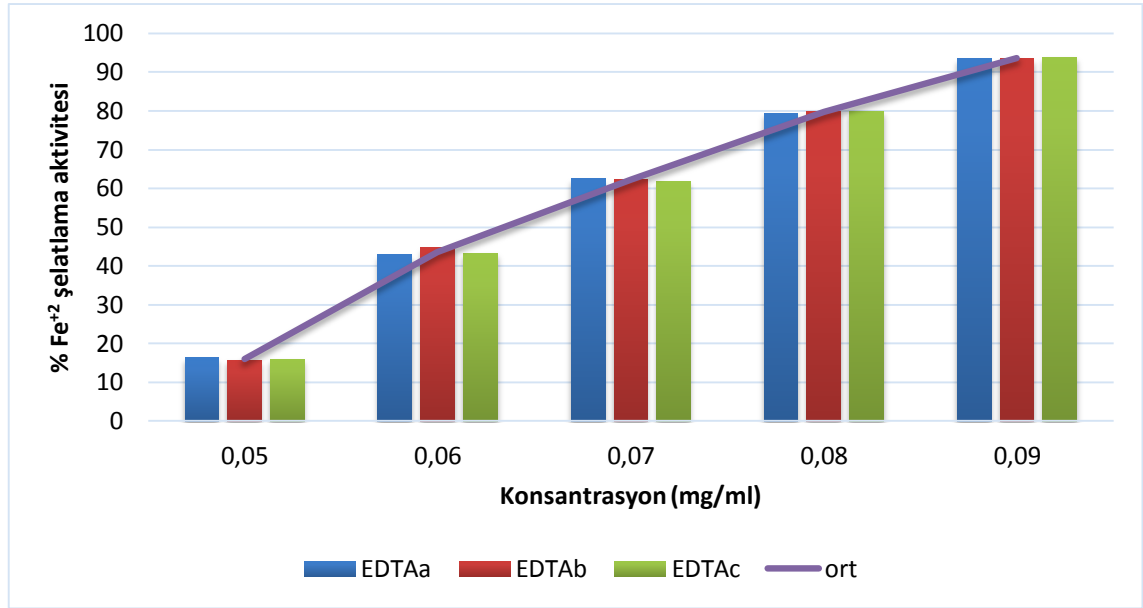


Şekil 4.23. Hidrolizatların %DPPH temizleme aktivitesi (1mg hidrolizat/ml, KM bazında)

Hsu (2010) tarafından yürütülen çalışmada, orkinos koyu renkli etinden üretilen hidrolizatlarda tespit edilen en yüksek DPPH temizleme aktivitesi değeri, %13,66, hamsi atık hidrolizatları ortalaması ile birebir örtüşmektedir. DPPH temizleme aktivitesi bakımından gözlenen bu benzerlik, koyu renkli etten üretilen hidrolizatların yapı bakımından hamsi atık hidrolizatları ile benzerlik gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Je ve arkadaşları (2007)'nin yürüttükleri çalışmada; 6 farklı enzimle orkinos omurgasından elde ettikleri atık ürünü hidrolizatların antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Bu kapsamda DPPH, hidroksil ve süperoksit serbest radikallerini temizleme aktiviteleri içinde hidrolizatların en yüksek hidroksil radikali temizleme aktivitesi %65,23 - %83,25 gösterdiği, Alcalase hidrolizatlarının %4,82 ile düşük seviyede DPPH radikali temizleme aktivitesi sergiledikleri rapor edilmiştir. Bu çalışmada ise orijinal hamsi eti hidrolizatlarında ortalama %10,90, atık hidrolizatlarında ise ortalama %13,52 gibi anılan çalışmadakinden yaklaşık 3 kat daha yüksek DPPH temizleme aktivitesi bulunmuştur. Bu farklılığın, substratın yapısal özellikleri ve hidroliz şartlarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada E/S oranı %0,5 ve en uzun hidroliz süresi 3 saat olarak uygulanmıştır. Anılan çalışmada ise E/S oranı iki kat fazla (%1,0) iken hidroliz, sekiz saat sürdürülmüştür. Bu durumda proteolitik parçalanmanın ileri düzeyde gerçekleşmesine bağlı olarak boyut olarak

küçülen veya serbest aminoasit formuna geçen protein moleküllerinin daha düşük DPPH temizleme aktivitesi sergilediği düşünülmektedir. Bu çalışmada özellikle hamsi eti hidrolizatlarında, hidroliz süresindeki artışın bu aktiviteyi negatif yönde etkilemesi, bu düşünceyi desteklemektedir. Benzer şekilde Klompong ve arkadaşları (2007), Alcalase hidrolizatlarında hidroliz derecesi arttıkça DPPH temizleme aktivitesinin önemli seviyede ($p < 0,05$) azaldığını kaydetmişlerdir. Sardalya balığı baş ve iç organlarından hidrolizat üretilen başka bir çalışmada (Souissi ve ark., 2007) ise %10,16 olan en yüksek hidroliz derecesinde %41 DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi elde edilmiş, SDS-PAGE ile bu hidrolizatın protein içeriğinin yoğun bir şekilde 14,2 kDa hattının altına yığıldığı tespit edilmiştir. Hamsi ile yapılan bu çalışmada, benzer şekilde protein içeriği 15 kDa'dan küçük olan et hidrolizatları, protein içeriği düşük daha küçük boyutlu (<6,5 kDa) olan atık hidrolizatlarına göre düşük DPPH aktivitesi gösterdiklerinden; iki çalışma arasında hidrolizatların molekül ağırlık dağılımı ile antioksidan aktivitesi arasında ilişki kurulamamıştır. Balık protein hidrolizatlarının DPPH temizleme aktivitesi araştırmalarında; Elavarasan ve arkadaşları (2013), Alcalase ile hint sazını (*Catla catla*) hidrolizatlarında %32, Jeevitha ve arkadaşları (2014) sardalya balığı (*Sardinella longiceps*) tripsin hidrolizatında en yüksek %14,03, Bougateg ve arkadaşları (2010) ise sardalya balığı (*Sardinella aurita*) işleme atıklarında en yüksek değeri ham enzim uygulaması ile %26,88 olarak tespit etmişlerdir. Bu sonuçlar kullanılan substrat ve enzimatik reaksiyon şartlarına göre DPPH temizleme aktivitesinde farklılıklar olabileceğini açıkça göstermektedir. Ayrıca Shamloo ve arkadaşları (2012)'nin tilapya balığı ile yaptıkları çalışmada 3 farklı enzim ve 6 farklı hidroliz süresinde en yüksek DPPH temizleme aktivitesini Alcalase enzimi ile elde etmişler; yarım saatte 46,23 mg/ml olan IC_{50} değeri, 4 saatlik hidroliz süresinde 4,45'e ulaşmıştır. Hidroliz süresi uzatıldıkça aktivitenin artması, bu çalışmadaki hamsi hidrolizatları verileri ve Klompong ve arkadaşları (2007) tarafından elde edilen sonuçlarla çelişmektedir. Bu da göstermektedir ki, her substrat ve enzim kombinasyonunda hidroliz süreleri bu aktivite üzerinde farklı sonuçlar doğurabilmektedir. Mendis ve arkadaşları (2005) tarafından antioksidan aktivite açısından peptitlerin hidrofobisitesinin önemli olduğu, bunun yanında hidrofobik aminoasitin terminalde yer alıp almamasının da (pozisyonu) büyük önem arz ettiği, ayrıca N-terminalde histidin aminoasidinin yer almasının antioksidan aktivitesinin artmasına büyük katkı yaptığı bildirilmiştir. Bununla birlikte Gly, Leu, Phe ve Pro aminoasitlerinin peptitlerde yer almasının, antioksidan aktivite açısından pozitif etki oluşturduğu rapor edilmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde; ürettiğimiz her iki hidrolizat grubunda (A ve E) bu dört aminoasidin serbest formda olanlar çıkarıldıktan sonra (bir peptit

dizisinde yer alanların) toplam aminoasitlerin yaklaşık %20'sine denk geldiği ve bu haliyle analiz edilmeyen antioksidan özellikler için de potansiyel oluşturduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.24. EDTA'nın konsantrasyona bağlı % Fe⁺² şelatlama aktivitesi

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) çoğu, mitokondrial elektron taşıma ve diğer metabolik reaksiyonlar esnasında yan ürün olarak oluşmaktadır. Ayrıca ROS, metal katalizli oksidasyon reaksiyonların zorunlu ara ürünü olarak da meydana gelmektedir. Bir geçiş metal iyonu olan Fe⁺² elektron vererek veya alarak serbest radikal oluşumunu devam ettirme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle bir metal iyonu yakalayıcı ajanla (şelatlama ajanı) demir iyonlarının tutulması, doğrudan ROS oluşumunu azaltabilmektedir (Sudan ve ark., 2014). Çalışmamızda hidrolizatların antioksidan aktivitesinin bir başka açıdan test edilmesi amacıyla Fe⁺² şelatlama aktivitesi analizleri gerçekleştirilmiştir. Fe⁺² şelatlama aktivitesi analizi sonuçları, IC₅₀ ve EDTA (etilendiamin tetraasetikasit) eşiti olarak hesaplanmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan EDTA'nın 5 farklı konsantrasyonda gösterdiği % Fe⁺² şelatlama aktivitesi değerleri grafik olarak Şekil 4.24'de sunulmuştur. Hidrolizatların Fe⁺² şelatlama aktivitesine ait verileri ise Çizelge 4.15'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.15. Hidrolizatların KM bazında IC₅₀ ve EDTA eşiti olarak Fe⁺² şelatlama aktiviteleri

Hidrolizat Grubu	1 mg/ml hidrolizatın Fe ⁺² şelatlama aktivitesi eşiti µM EDTA		IC ₅₀ (mg hidrolizat/ml)	
	<5 kDa	Orijinal	<5 kDa	Orijinal
A1	221,96±1,58 ^{Aaz}	151,34±0,06 ^{Bbz}	0,94±0,02	1,71±0,01
A2	242,70±1,77 ^{Aax}	238,70±0,51 ^{Bay}	0,64±0,03	0,72±0,01
A3	232,35±1,54 ^{Bay}	244,04±0,86 ^{Aax}	0,81±0,02	0,62±0,01
E1	209,88±1,34 ^{Abz}	167,71±1,17 ^{Baz}	1,12±0,02	1,58±0,01
E2	225,40±1,40 ^{Abx}	208,27±1,18 ^{Bby}	0,91±0,02	1,12±0,06
E3	217,30±2,18 ^{Bby}	239,50±1,10 ^{Abx}	1,03±0,03	0,70±0,02

(A, B) Aynı satırdaki farkın önemli olduğunu (p<0,05) gösterir

(a, b) Aynı sütundaki aynı hidroliz sürelerine sahip A ve E arasındaki farkın önemli (p<0,05) olduğunu gösterir

(x, y, z) Aynı sütundaki aynı materyal grubunda hidroliz süreleri arasındaki farkın önemli (p<0,05) olduğunu gösterir

Hidrolizatların demir şelatlama aktivitesinin istatistiksel analizinde 1 mg/ml (KM bazında) hidrolizata karşılık gelen µM EDTA konsantrasyonu değerleri kullanılmıştır. “<5 kDa” örnek grubu kendi içinde değerlendirildiğinde; hem A, hem de E grubu örneklerde farklı hidroliz sürelerine (1-2, 1-3, 2-3) ait örnekler arasındaki fark önemli (p<0,05) bulunmuştur. Ayrıca her hidroliz süresinde (1, 2, 3 saat) A ve E grubu örneklerin Fe⁺² şelatlama aktivite değerleri arasındaki farkın önemli olduğu (p<0,05), aynı hidroliz derecesindeki A örneklerinin, E örneklerinden daha yüksek (p<0,05) aktivite gösterdikleri görülmüştür. Filtre edilmemiş orijinal örneklerde de aynı şekilde her örnek grubu (A ve E) ve her hidroliz süresinin Fe⁺² şelatlama aktivitesi üzerinde önemli (p<0,05) derecede etki yarattığı tespit edilmiştir. Aynı hidroliz süresi ve aynı numune cinsine (A ve E) sahip örneklerin filtre edilmiş ve edilmemiş örneklerinin tümünde fark önemli (p<0,05) bulunmuştur. Tüm faktörler dahil edilerek yürütülen istatistiksel değerlendirmede en yüksek Fe⁺² şelatlama aktivitesini, aralarında önemli fark olmaksızın (p>0,05), filtre edilmiş A2 hidrolizatı ile orijinal A3 hidrolizatının gösterdiği tespit edilmiştir.

İstatistiksel analiz sonuçlarını özetlersek;

- Filtre edilmiş grup (<5 kDa) içinde atık hidrolizatları, et hidrolizatlarından yüksek Fe⁺² şelatlama aktivitesi göstermişlerdir. Filtre edilmemiş hidrolizatlarda ise 1 saatlik hidroliz örnekleri hariç, atık hidrolizatları et hidrolizatlarından yüksek aktivite sergilemişlerdir.
- Filtre edilmiş örneklerde A ve E grubunda en yüksek aktivite 2 saatlik hidrolizde (A2, E2), en düşük aktivite 1 saatlik hidrolizde (A1, E1) tespit edilmiştir. Filtre

edilmemiş örneklerde ise A ve E grubunda hidroliz süresi arttıkça, Fe⁺² şelatlama aktivitesi artmıştır.

Yapılan bu tespitler doğrultusunda, antioksidan özelliğini gösteren DPPH temizleme aktivitesi ile Fe⁺² şelatlama aktivitesi bulguları karşılaştırılarak Çizelge 4.16'da sunulmuştur. Çizelge 4.16'da özetlenen sonuçlar, arzu edilen antioksidan aktivite mekanizmasına uygun tasarım için bir kılavuz oluşturmaktadır. Örneğin DPPH temizleme aktivitesinin yüksek olması arzulaniyor ise verilen hidroliz şartlarında atıkların 1 saat hidroliz edilerek ultrafiltrasyondan geçirilmesi, amaçlanan yüksek Fe⁺² şelatlama aktivitesi ise atıkların 3 saat hidroliz edilerek ultrafiltrasyondan geçirilmeden kullanılması ya da 2 saatlik atık hidrolizatına ultrafiltrasyon uygulanması uygun olacaktır.

Çizelge 4.16. Hidrolizatların DPPH temizleme ve Fe⁺² şelatlama aktivitelerinin karşılaştırılması

Faktör Özellik	Hidrolizat tipi (Atık, Et)	Hidroliz süresinde artış	Ultrafiltrasyon yapılması
DPPH temizleme aktivitesi	Atık hidrolizatlarında yüksek	Genel azalış (orijinal E2-E3 dışında)	<5 kDa hidrolizatlarda yüksek (pozitif etki)
Fe ⁺² şelatlama aktivitesi	Genel olarak atık hidrolizatlarında yüksek (orijinal A1 ve E1 dışında)	Orijinal hidrolizatlarda artış, <5 kDa örneklerde ise 1<2>3 şeklinde	Hidroliz süresi ile ilişkili. En yüksek aktivite, filtre edilmemiş A3 ve filtre edilmiş A2 hidrolizatlarına ait

Thiansilakul ve arkadaşları (2007b), yağı uzaklaştırılmış japon istavrit balığı (*Decapterus maruadsi*) etinin Flavourzyme hidrolizatlarında benzer şekilde DPPH temizleme ve Fe⁺² şelatlama aktivitesini araştırmışlar; sırasıyla % 59,9 ve %58,2 değerlerini elde etmişlerdir. Literatürde sık karşılaşılan bir problem olarak, verilerin hangi örnek konsantrasyonlarına ait olduğu verilmediğinden, hamsi hidrolizatları verileri ile kıyaslanamamıştır. Ancak anılan çalışmada her iki özellik için birbirine yakın değerler elde edildiği görülmüştür. Bu çalışmada en yüksek Fe⁺² şelatlama aktivitesi orijinal örneklerde %59,1 (A3), filtre edilen örneklerde ise %58,5 (A2) olarak; DPPH temizleme aktivitesi ise orijinal örneklerde en yüksek %14,2 (A1), filtre edilmiş örneklerde %21,3 (A1) olarak tespit edilmiştir. Bu haliyle DPPH temizleme aktivitesi, şelatlama aktivitesine göre oransal olarak önemli seviyede düşüktür. Bu farklılığın, çalışmada kullanılan substrat (hamsi et ve atık

proteinleri) ve reaksiyon şartları ile şekillenen peptitlerin fizikokimyasal özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü substratın birincil aminoasit dizilimi ve enzimin peptit bağlarını koparma yeri, oluşan daha küçük peptitleri belirlemektedir. Örneğin Arg-Ser-Leu ile Leu-Ser-Arg tripeptitleri, aminoasit içeriği aynı olmakla birlikte dizilimden kaynaklanan farklı fonksiyonel ve biyoaktif özellikler gösterebilmektedir (Li-Chan, 2004; Ryan ve ark., 2011; Wilson ve ark., 2011).

Klompong ve arkadaşları (2007) yağı uzaklaştırılmış *Selaroides leptolepis* balığının Alcalase ve Flavourzyme enzim hidrolizatlarında, hidrolizat derecesi artışıyla birlikte metal şelatlama aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından; gıdalarda Fe, Cu, Co gibi geçiş metalleri bulunmasının hem otooksidasyon, hem de hidroperoksitin uçucu bileşiklere yıkım oranını etkilediğini, geçiş metallerinin bir elektron vericisi olarak hızlı bir şekilde peroksitlerle reaksiyona girerek alkoksil radikallerin oluşumuna neden olduğunu vurgulamışlardır. Dong ve arkadaşları (2008), benzer şekilde Alcalase ve Flavourzyme kullanarak elde ettikleri gümüş sazanı hidrolizatlarında; hidroliz süresi ile metal şelatlama aktivitesinin arttığını, Alcalase hidrolizatlarının daha yüksek aktivite sergilediklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından hidrolizin peptit bağlarını ayırarak asidik ve bazik aminoasitlerle karboksilik ve amino grupların konsantrasyonunda artışa sebep olduğunu, bu oluşumların pro-oksidan serbest metal iyonlarını bağlayarak hidroksil radikal sistemden çıkarttıklarını rapor etmişlerdir. Araştırmacıların elde ettikleri en yüksek şelatlama aktivitesi değeri (%18,6); bu çalışmada filtre edilmemiş hamsi et ve atık hidrolizatları ortalaması olan %42,3'den ve tüm filtre edilmiş numunelerin ortalaması olan %50,2'den önemli derecede düşük bulunmuştur.

4.5. Yürütülen Anket Çalışmasına Ait Bulgular

Çalışma kapsamında; yaş, cinsiyet, eğitim ve meslek grupları gibi faktörlerin homojen olarak dağıldığı 250 denek üzerinde anket çalışması yürütülmüştür. Beş sorudan oluşan sorularla katılımcıların, balık işleme atıklarından elde edilen ürünleri tüketme eğilimleri belirlenmeye çalışılmıştır. Evet/hayır yanıt şekli ile bu konudaki yaklaşımların net olarak alınması amaçlanmıştır. İlk soruda diğer faktörler dışarıda tutularak tüketicilerin balık işleme atıklarından üretilen ürünlere nasıl yaklaştıkları belirlenmeye çalışılmıştır. Sonraki sorularla; bu ürünlerin sağlık açısından yararlı olmaları durumunda, güvenilir gıda kapsamında olmaları durumunda ve yetkili kuruluşlar tarafından onaylanması durumunda nasıl bir tutum sergiledikleri incelenmiştir. Beşinci soru ise ilk 4 sorudan birine evet diyen, yani herhangi bir sebeple bu ürünleri tüketebilir durumdaki kişilere yöneltilmiştir. Bu soruya

alınan yanıtlar çerçevesinde; ürüne özgü duyuşal özelliklerin, tüketicilerin tercihlerini ne düzeyde etkilediği belirlenmeye çalışılmıştır. Anket kapsamında sorulan sorular ve yanıtların dağılımı Çizelge 4.17’de sunulmuştur.

Çizelge 4.17. Balık işleme atıklarından elde edilen ürünlere tüketicilerin yaklaşımı

Soru	Evet yanıtı sayısı	Yanıtsız	Toplam yanıt sayısı	Evet yanıtının toplam yanıtlar içinde oranı (%)
Balık işleme atıklarından (baş, iç organlar, kırpıntı et, omurga, deri vb.) elde edilen ürünleri gıda veya gıda katkı maddesi olarak tüketir misiniz?	24	2	248	9,7
Sağlık açısından yararlı olduğu bilimsel çalışmalarla kanıtlandığında, balık işleme atıklarından elde edilen ürünleri gıda veya gıda katkı maddesi olarak tüketir misiniz?	135	-	250	54,0
Güvenilir gıda kapsamında olduğu bilimsel çalışmalarla kanıtlandığında, balık işleme atıklarından elde edilen ürünleri gıda veya gıda katkı maddesi olarak tüketir misiniz?	132	1	249	53,0
Yetkili resmi kuruluşlardan onay aldığında, balık işleme atıklarından elde edilen ürünleri gıda veya gıda katkı maddesi olarak tüketir misiniz?	135	1	249	54,2
Balık işleme atıklarından elde edilen ürünleri tüketiminzde, renk, tat, koku, kıvam gibi duyuşal özellikler sizin bu kararınızı değiştirmenizde etkili olur mu?	152	-	177	85,9

Anket kapsamında alınan yanıtlar değerlendirildiğinde, tüketicilerin balık işleme atıklarından elde edilen ürünleri tüketme konusunda çok da istekli olmadıkları görülmektedir. İşleme atıklarından üretilen ürünleri tüketmem diyenlerin oranı %90,3 olarak belirlenmiştir. Burada tüketicileri etkileyen iki temel konu vardır. Bunlardan ilki “atık” olarak ifade edilen birşeyi tüketme düşüncesi, ikincisi ise hakkında görüş belirteceği ürünü çevresinde görmemesi yani yabancı olmasıdır. Bu nedenle ilkinde salt olarak “tüketir misiniz” sorusuna hayır tüketmem diyen katılımcılar, sonraki sorularla ürün özellikleri konusunda bilgi düzeyi arttıkça evet yanıtları vermeye başlamışlardır. Örneğin ürünün “sağlıklı” olduğu kanıtlandığında tüketilebilirlik oranı %54,0 olmuştur. Ürünün “güvenilir” yani tükettiğinde kendisine zarar vermeyeceğini bildiğinde ise benzer şekilde

%53,0 oranında tüketilebileceği ifade edilmiştir. Bu iki yanıtta benzer şekilde ürünün yetkili makamlar tarafından “onaylanması” durumunda da %54,2 oranında tüketilebileceği şeklinde yanıtlanmıştır. Burada dikkat çekici bir başka bilgi ortaya çıkmıştır. İlk soruya tüketmem diyen 224 katılımcıdan 144’ü yani %64,3’ü sağlıklı, güvenilir ve onaylı olma özelliklerinden en az birinden etkilenerek fikirlerini değiştirmişler ve bu ürünleri tüketebileceklerini beyan etmişlerdir. Son soru ise bu ürünleri tüketebilir nitelikteki katılımcıların üzerinde ürüne ait duygusal özelliklerin etkisini ortaya koymuştur. Bu ürünleri tüketme istekleri üzerinde duygusal özelliklerin %85,9 gibi büyük bir öneme sahip olduğu katılımcılar tarafından beyan edilmiştir.



BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; hamsi eti ve işleme atıklarında bulunan proteinlerin enzimatik hidrolizle geri kazanılması, elde edilen hidrolizatların takviye edici gıda, gıda katkı maddesi ve farmakolojik olarak kullanım potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda araştırma materyali olan hidrolizatların besleyici, fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri incelenmiştir.

Ayrıca çalışma sonucunda yürütülen bir anket faaliyeti ile tüketicilerin su ürünleri işleme atıklarından üretilen gıdalar konusundaki yaklaşımları tespit edilmeye çalışılmıştır.

5.1. Sonuçlar

1) Hamsi işleme atıklarının, tüm balık kütlelerinin ortalama %32,4'ünü oluşturduğu ve bu kısmın %14,5 düzeyinde protein içerdiği tespit edilmiştir. Hamsi etinde (fileto) ise protein içeriği %19,2 olarak belirlenmiştir. Yağ içeriği açısından durum tersine dönmüş, atık materyalde yağ içeriği %6,6 iken, ette %2,8 olarak tespit edilmiştir.

2) Hamsi atık materyalinin kalsiyum seviyesi ete göre yaklaşık 10 kat, fosfor seviyesi 3 kat, sodyum seviyesi ise 1,6 kat daha yüksek tespit edilmiştir. Materyallerde yüksek seviyede bulunan 6 minerale sadece potasyum değerinin, et materyalinde atık materyale göre daha yüksek (1,4 kat) olduğu tespit edilmiştir. Et materyalinde en yüksek seviyede bulunan mineral fosfor (2282 mg/kg) iken, atık materyalde kalsiyum (9809 mg/kg) olarak saptanmıştır.

3) Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği'nde yer alan kurşun ve kadmiyum değerleri, ette ve atık materyalde tespit edilebilir limitin altında bulunmuştur.

4) Protein içeriği yüksek olan et materyalde, toplam amino asit değerleri atık materyale göre yüksek bulunmuştur. Atık materyalde ise, serbest histidin dışında, serbest amino asit değerleri ete göre daha yüksek oranda (%225 - %996) tespit edilmiştir. Toplam aminoasit bakımından atık/ete oranı yaklaşık 0,7 iken, serbest aminoasit bakımından bu değer yaklaşık 2 olarak hesaplanmıştır.

5) Histamin; et materyalinde 16,4 mg/kg, atık materyalinde 15,1 mg/kg olarak tespit edilmiştir. Putresin, kadaverin ve histaminden oluşan putreaktif biyojen amin içeriği ise, ette 23,7 mg/kg iken atıklarda 35,1 mg/kg olarak belirlenmiştir.

6) SDS-PAGE çalışmasında ekstraksiyonda kullanılan 3 farklı çözüldenden en iyi sonucu fosfat tampon vermiştir. Yürütülen çalışmalarda et ekstraktlarında 10,6-212,8 kDa

aralığında 15 bant, atık ekstraktlarında ise aynı moleküler kütle aralığında 8 bant tespit edilmiştir.

7) Bu çalışmada hamsi eti ve atıkları için enzimatik protein hidrolizi prosesi tanımlanmış, tanımlanan hidroliz şartları çerçevesinde kullanılacak enzim miktarı; 1 ton hamsi atığı için 608 ml, 1 ton hamsi eti için ise 832 ml olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada elde edilen % atık oranı üzerinden yapılan hesaplamayla, 5 ton hamsinin işleme atığını hidroliz etmek için gereken enzim miktarı 1 litre olarak bulunmuştur.

8) %10 TCA'da çözünen protein üzerinden hesaplanan hidroliz derecesinin, hidroliz süresi artışına bağlı olarak arttığı; et hidrolizatlarında en yüksek değer %67,3 iken atık hidrolizatlarında %79,9 olduğu tespit edilmiştir.

9) Hidrolizatların kurumadde (KM) değerleri üzerinde; hidrolizde kullanılan NaOH çözeltisinin ve hidroliz derecesiyle artış gösteren protein içeriğinin etkili olduğu görülmüştür. Tüm hidrolizatların ortalama KM değeri %8,1 iken liyofilizasyon sonrasında %96,6'ya yükselmiştir. Liyofilize et hidrolizatlarının KM değeri (%98,0), atık hidrolizatları ortalamasından (%95,2) önemli derecede yüksek bulunmuştur.

10) Hamsi etinden %32 verimle hidrolizat üretilirken; işleme atıklarından hidrolizat üretiminde verim, %28 olarak hesaplanmıştır. Hidrolizle; et materyalindeki proteinin yaklaşık %31'i, atıklardaki proteinin ise yaklaşık %39'u geri kazanılmıştır.

11) Üretildikleri materyallerdeki protein içeriklerine paralel olarak; et hidrolizatlarının protein içeriği, atık hidrolizatlarına göre yüksek bulunmuştur. Kuru madde bazında protein içerikleri ette %81,2 iken et hidrolizatlarında ortalama %85,1; atık materyalinde %55,6 iken atık hidrolizatlarında ortalama %75,9 olarak tespit edilmiştir. Hidrolizle etin protein miktarı %5 artarken, atıklardaki protein artışı %36 olmuştur.

12) Hidroliz işlemi sırasında kullanılan NaOH çözeltisi, hidrolizatların kül değerlerinin materyale göre artmasına; hidroliz sonrasında santrifüj ile katı kısımların ayrılması ise hidrolizatlarda kül değerlerinin düşmesine neden olmuştur. Ette %6,8 olan kül değeri et hidrolizatlarında ortalama %15,3'e yükselmiş; atık materyalinde %19,1 olan kül değeri ise atık hidrolizatlarında daha düşük seviyede, %14,1 olarak tespit edilmiştir.

13) pH stat yöntemine göre yürütülen hidroliz işlemi sonrasında oluşturulan zamana bağlı NaOH sarfiyatı grafiğinde, et ve atık hidrolizatlarının farklı modeller sergilediği tespit edilmiştir. Buna göre et örneklerinin hidrolizi ilk 40 dakikada çok hızlı bir şekilde seyredirken, 40-110 dakika arasında hızda azalma tespit edilmiş, bununla beraber hidrolizin etkin bir şekilde devam ettiği de görülmüştür. Atık materyalin hidroliz hızı, ete göre düşük olmakla beraber ilk 60 dakikada en yüksek seviyede seyretmiş, 60-120 dakika arasında

gittikçe azalan hızda devam etmiş, 120 dakika ile hidrolizin bitirildiği 180 dakika arasında dikkate değer bir reaksiyon (pH azalması veya NaOH sarfiyatı) gözlenmemiştir.

14) Et ve atık materyallerindeki tuz, hidroliz sırasında çözünerek büyük oranda hidrolizatlara geçmiştir. Tuz içeriğinde azalma olmamış, yağ ve katıların hidrolizatlarda yer almaması nedeniyle hem et hem de atık hidrolizatlarında %2,4 oranında artış gözlenmiştir. Et hidrolizatlarında ortalama %4,3 seviyesinde, atık hidrolizatlarında ortalama %4,8 düzeyinde tuz içeriği tespit edilmiştir.

15) Hidroliz sırasında çözünmeyen ve hidroliz sonrasında uzaklaştırılan katı fazda yer alan kalsiyum, magnezyum, fosfor gibi minerallerde önemli kayıplar meydana gelmiştir. Kemik dokunun yoğun olduğu atık materyalden elde edilen hidrolizatlarda; kalsiyum 33 kat, magnezyum 11 kat, fosfor ise 1,8 kat azalış göstermiştir. Buna karşın hidroliz sırasında sodyum hidroksit kullanıldığından, hidrolizatların sodyum seviyesinde artış olmuştur. Hidroliz reaksiyonunun nispeten yüksek seviyede gerçekleştiği et hidrolizatlarında, sodyum miktarının ortalama 8,9 kat, atık hidrolizatlarında ise 6,3 kat arttığı belirlenmiştir.

16) Yürütülen hidroliz işlemi sonrasındaki toplam aminoasit bileşenlerinin bazılarında oransal değişimler meydana gelmiştir. Atık hidrolizatlarında, lizin %63, Glutamin+Glutamik asit %46 ve Asparajin+Aspartik asit %45 düzeyinde artmıştır. Et hidrolizatlarında dikkat çekici artış (%55), Glutamin+Glutamik asit miktarında gözlenmiştir.

17) Et hidrolizatlarında toplam amino asit içeriğinin %48'inin, atık hidrolizatlarında ise %46'sının esansiyel amino asitlerden oluştuğu tespit edilmiştir. Hamsi et ve atıkları ile hidrolizatları arasında esansiyel amino asit içeriği açısından değişiklik gözlenmiş; et hidrolizatlarında %1,3, atık hidrolizatlarında ise ortalama %73 artış tespit edilmiştir. Amino asitlerin değerlendirilmesinde kullanılan kimyasal skorun ortalama değeri, et hidrolizatlarında %400, atık hidrolizatlarında ise %384 gibi yüksek düzeylerde hesaplanmıştır. Hidrolizatlardaki valin, lösin, izölösin, lizin ve histidin miktarlarının, FAO tarafından yetişkinler için önerilen miktarlardan, 4 ila 6 kat daha yüksek düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

18) Hidroliz prosesinin en önemli etkilerinden biri serbest amino asit miktarları üzerinde olmuştur. Et ve atık hidrolizatlarındaki serbest amino asitlerin miktarı, türetildikleri proteinlerin hidrolize olmasına bağlı olarak yaklaşık iki kat (%91 oranında) artmıştır.

19) KM bazında et hidrolizatlarında histamin değeri 38,9 mg/kg, atık hidrolizatlarında ise 64,4 mg/kg olarak tespit edilmiş; bu değerlerin yaş ağırlık için verilen 100 mg/kg limit değerinin altında kaldığı görülmüştür. Et hidrolizatlarındaki putresin, kadaverin ve

histaminin toplam değeri (KM'de 106,0 mg/kg), atık hidrolizatları toplam biyojen amin değerinden (KM'de 142,7 mg/kg) önemli derece düşük bulunmuştur.

20) Enzimatik protein hidrolizi sonucunda et ve atıklarda bulunan proteinlerin büyük bölümü küçük boyutlu peptitlere ve serbest amino asitlere parçalanmıştır. Bunun sonucu olarak SDS-PAGE çalışmasında; et hidrolizatlarında yaklaşık 15 kDa seviyesinin, atık hidrolizatlarında ise ortalama 6,5 kDa seviyesinin altında yığılma gözlenmiştir.

21) Tüm hidrolizatların protein çözünürlüğü ortalaması %96,5 olarak tespit edilmiş, bu çözünürlük değerlerinde pH ve hidroliz dereceleri ile çözünürlük arasında belirgin ilişki kurulamamıştır.

22) Emülsifikasyon özellikleri kapsamında et hidrolizatları ortalama 45 m²/g EAI değeriyle, atık hidrolizatları ise 47 dk. ESI değeriyle üstün özellik sergilemişlerdir. Hidrolizat/yağ çözeltilerinde; hidrolizat konsantrasyonundaki artışın, belli bir seviyeden sonra emülsiyon oluşturma ve emülsiyon stabilitesi üzerine etki etmediği görülmüştür.

23) Et hidrolizatlarının köpük oluşturma ve köpük stabilitesi özelliği bakımından atık hidrolizatlarına göre önemli derecede üstün özellik sergilediği; genel olarak her iki hidrolizat grubunda hidrolizat konsantrasyonuna paralel olarak bu özelliklerin arttığı görülmüştür.

24) Et ve atık hidrolizatlarının su tutma kapasitesileri arasında önemli bir farklılık tespit edilmezken, atık hidrolizatlarının yağ tutma özelliğinin et hidrolizatlara göre önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Yağ ve su tutma özellikleri üzerine hidroliz süresinin etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

25) Hidrolizatların ACE inhibisyon aktivitesinde moleküler boyutun önemli olduğu, membran filtreden geçirilen (<5 kDa) hidrolizatların, orijinal hidrolizatlara göre önemli derecede yüksek aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Hidroliz sürelerinin aynı materyal grubu hidrolizatlarda ACE inhibisyon aktivitesine etki etmediği; filtre edilen (<5 kDa) hidrolizat gruplarında 1 saatlik hidroliz örnekleri dışında, E grubu hidrolizatların A grubu hidrolizatlardan yüksek ACE inhibisyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Filtre edilmiş hidrolizatların 1 mg/ml konsantrasyonunda ortalama ACE inhibisyon aktivitesi A grubunda %59,6, E grubunda ise %63,6 olarak tespit edilmiştir.

26) ACE inhibisyon aktivitesi bakımından üstünlük sergileyen et hidrolizatları, DPPH temizleme aktivitesi değerleri bakımından atık hidrolizatlarının gerisinde kalmışlardır. DPPH temizleme aktivitesinin 1 saatlik hidrolizde en yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir. Tüm hidrolizat örneklerinde ultrafiltrasyondan geçirilen örneklerin (<5 kDa) ACE inhibisyon aktivitesinde olduğu gibi daha yüksek DPPH temizleme aktivitesi gösterdiği görülmüştür. Ancak ultrafiltrasyona bağlı aktivite değerlerindeki iyileşmenin

ACE inhibisyon özelliğinde gözlenenden çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. En yüksek DPPH temizleme aktivitesi, ultrafiltrasyondan geçirilen hidrolizatlarda, 1 mg/ml hidrolizat konsantrasyonu için A örnek grubunda %21,3, E örnek grubunda ise %16,6 olarak hesaplanmıştır.

27) Fe⁺² şelatlama aktivitesi açısından en yüksek değerler, atık hidrolizatlarından (<5kDa grubunda A2, orijinal A3) elde edilmiştir. Atık ve et hidrolizatlarında IC₅₀ cinsinden en yüksek değerler, filtre edilmemiş A3 örneğinde 0,62 mg/ml ve E3 örneğinde 0,70 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Filtre edilmemiş örneklerde hidroliz süresi arttıkça aktivite artarken, <5 kDa grubunda en yüksek değerler 2 saatlik hidroliz örneklerinden elde edilmiştir. Gerek filtre edilmiş, gerekse filtre edilmemiş örneklerde en yüksek değerler karşılaştırıldığında; DPPH temizleme aktivitesinde olduğu gibi, atık hidrolizatların et hidrolizatlarından daha yüksek aktivite sergilediği görülmüştür.

28) Araştırma kapsamında yürütülen anket çalışmasına göre tüketicilerin balık işleme atıklarından üretilen ürünleri tüketmeye karşı %90 düzeyinde olumsuz tavır sergiledikleri belirlenmiştir. Ancak bu ürünlerin sağlıklı/güvenilir/onaylı olma durumlarından en az birinin olumsuz görüşleri etkilediği, ilk önce tüketmem diyenlerin %64'ünün bu görüşlerini değiştirdikleri görülmüştür. Ayrıca tüketme eğiliminde olan katılımcılardan %86'sı, ürünün duyuşal özelliklerinin tüketim ile ilgili yaklaşımları üzerinde büyük önem taşıdığını belirtmişlerdir.

5.2. Öneriler

1) Balık eti ve atıklarının enzimatik hidrolizinde Alcalase® enzimi çok küçük miktarlarda dahi etkin bir katalizleme gerçekleştirdiğinden, fiyat/fayda bakımından kullanımı önerilmektedir.

2) Hidroliz sürecinin reaksiyon hız tablosuna ve hidroliz süresinin incelenen özelliklere etki seviyesine bakıldığında, her iki materyal grubu için temel olarak 1 saatlik hidrolizin yeterli geldiği görülmüştür. Ancak Fe⁺² şelatlama aktivitesi gibi belirli bir biyoaktif özellik ön plana çıkarılmak isteniyor ise ilave süreler düşünölmelidir.

3) Yapısındaki amino asitlerin yarısı esansiyel olan %75 düzeyindeki protein içeriği ile atık hidrolizatları; özellikle çocukların, sporcuların ve tıbbi olarak proteince zengin beslenme ihtiyacı olan kişilerin beslenmesinde takviye edici gıda olarak kullanılabilir.

4) Hamsi et ve atık hidrolizatlarının gıda katkı maddesi olarak kullanımında, sahip oldukları balıksı kokunun etkisizleştirilmesi için ya su ürünleri üretiminde kullanılması ya da ilave deodorizasyon işlemine tabi tutulması önerilmektedir.

5) Atık hidrolizatlarında tespit edilen biyoaktif özellikler (1 mg/ml için; %60 ACE inhibisyon kapasitesi, %21 DPPH temizleme aktivitesi ve %59 Fe⁺² şelatlama aktivitesi), bu çalışmanın en dikkat çekici sonuçlarını oluşturmuştur. Hamsi işleme atıklarından endüstriyel boyutta hidrolizat üretimini teşvik edecek olan bu biyoaktif özelliklerin, en etkin düzeyde elde edilebilmesi için ileri saflaştırma yöntemlerine ihtiyaç bulunmaktadır.

6) Hamsi hidrolizatlarının farmakolojik özellikleri yönünden kullanımında; içerdikleri yüksek düzeydeki sodyum elementine dikkat edilmeli, sodyumun azaltılmasını veya giderilmesini sağlayacak yöntemler araştırılmalıdır.

7) Balık işleme atıklarının ikincil üretim için materyal olarak kullanımında, öncelikle işleme atıklarının mikrobiyal bozulmasını geciktirecek ya da önleyecek tedbirler planlanmalıdır. Ayrıca işleme atıklarının miktar açısından ikincil üretime yeter düzeyde olması durumunda, doğrudan ikincil üretime yönlendirecek kesintisiz sistemler tasarlanmalıdır. Aksi takdirde atıkları biriktirmek için maruz kalınan uzun muhafaza süreleri ile maliyet artacaktır.

8) Özellikle hamsi işlemeciliğinde atıklar uygun şekilde kontrol edilmediğinde yüksek düzeyde biyojen amin oluşumu söz konusu olacağından, hammadde ve son ürün histamin yönünden mutlaka kontrol edilmelidir. Ayrıca hidrolizatların insan gıdası olarak kullanımı amaçlandığında gıda güvenliği kapsamındaki diğer kimyasal bulaşan analizleri (örneğin ağır metaller) ile son üründe mikrobiyolojik analizlerin yapılması gerekmektedir. Balık işleme atıklarından üretilen ürünlere tüketicilerin tedirgin yaklaşımları bilindiğinden, insanların kötü deneyimlerle tamamen karşı durmalarına meydan vermemek için bu tür ürünlerin güvenilirliği konusunda hassasiyet gösterilmelidir.

9) Hidrolizat üretiminde önemli bir basamak olan kurutma, ürün kalitesinin korunması amacıyla çoğunlukla liyofilizasyon ile gerçekleştirilmekte, bu durum zaman ve maliyet açısından sıkıntı yaratmaktadır. Bu nedenle kurutma işleminde liyofilizasyonla kalite açısından rekabet edecek, daha hızlı ve düşük maliyetli yöntemlerin araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Ababouch, L., 1991. Histamin Food Poisoning: An Update. *Fish Technology News*, 11: 3-9.
- Adler-Nissen J., 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (6): 1252-1262.
- Adler-Nissen, J., 1986. *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London. 427 p.
- Aehle W., 2004. *Enzymes in Industry: Production and Applications (2nd Ed.)*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 484 p.
- Ahn C-B., Jeon Y-J., Kim Y-T, Je J-Y., 2012. Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Salmon Byproduct Protein Hydrolysate by Alcalase Hydrolysis. *Process Biochemistry*, 47: 2240–2245.
- Amiza M.A., Kong Y.L., Faazaz A.L., 2012. Effects of Degree of Hydrolysis on Physicochemical Properties of Cobia (*Rachycentron Canadum*) Frame Hydrolysate. *International Food Research Journal* 19 (1): 199-206.
- Annadurai D., Sadeeshkumar R., Vijayalaksmi M., Pirithiviraj N., 2012. Studies on Growth of Marine Bacteria Using Marine Fish Waste Medium. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3 (4): 910-913
- AOAC 2003. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Official Method 990.03: Protein (Crude) in Animal Feed Combustion Method, Final Action 2002.
- Arason S., Karlsdottir M., Valsdottir T., Slizyte R., Rustad T., Falch E., Eysturskard J., Jakobsen G., 2009. Maximum Resource Utilisation-Value Added Fish By-Products. Nordic Innovation Centre Project Number: 04275, 128 p.
- Armstrong D.L., 1998. Potassium for Agriculture. *Better Crops*, 82 (3): 1-40.
- Arvanitoyannis I.S., Kassaveti A., 2008. Fish Industry Waste: Treatments, Environmental Impacts, Current and Potential Uses. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 726-745.

- Azadian M., Moosavi-Nasab M., Abedi E., 2012. Comparison of Functional Properties and SDS-PAGE Patterns Between Fish Protein Isolate and Surimi Produced From Silver Carp. *European Food Research and Technology*, 235: 83-90.
- Barret A.J., Rawlings, N.D., 2001. Proteinases. Peptide and Protein Group Colloquium Organized and Edited by A. J. Rivett (University of Leicester). 638th Meeting held at Reading University (10- 12 April), United Kingdom, 707-715.
- Batista I., Pires C., 2011. Feasibility Study Production of Protein Hydrolysates from Sardine By- Products. Co-financed with the support of the European Union ERDF Atlantic Area Programme.
- Batista I., Ramos C., Coutinho J., Bandarra N.M., Nunes M.L., 2010. Characterization of Protein Hydrolysates and Lipids Obtained from Black Scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-Products and Antioxidative Activity of the Hydrolysates Produced. *Process Biochemistry* 45: 18-24.
- Batra N., Walia M., 2014. Production and Characterization of Alkaline Protease From Bacteria Strains Isolated From Cotton Field. *African Journal of Microbiology Research*, 8 (7): 702-709.
- Belitz H.-U., Grosch W., Schieberle P., 2009. Fish, Whales, Crustaceans, Mollusks. In: *Food Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 617-639.
- Bergmeyer H.U., 1979. *Enzyme Nomenclature 1978*. Published for The International Union of Biochemistry by Academic Press, 6- 26.
- Bhaskar N., Benila T., Radha C., Lalitha R.G., 2008. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Catla (*Catla catla*) For Preparing Protein Hydrolysate Using a Commercial Protease. *Bioresource Technology* 99: 335-343.
- Bhunja B., Basak B., Dey A., 2012. A Review on Production of Serine Alkaline Protease by *Bacillus spp.*. *J Biochem Tech*, 3 (4): 448-457.
- Bougatef A., Nedjar-Arroume N., Manni L., Ravallec R., Barkia A., Guillochon D., Nasri M., 2010. Purification and Identification of Novel Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Sardinelle (*Sardinella aurita*) by-Products Proteins. *Food Chemistry*, 118: 559-565.

- Büyüktüncel E., 2013. Toplam Fenolik İçerik ve Antioksidan Kapasite Tayininde Kullanılan Başlıca Spektrofotometrik Yöntemler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17: 93-103.
- Byun H.-G., Kim S.-K., 2001. Purification and Characterization of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) Skin. *Process Biochemistry*, 36: 1155-1162.
- Cera E. D., 2009. Serine Proteases. *IUBMB Life*, 61 (5): 510-515.
- Chalamaiah M., Dinesh Kumar B., Hemalatha R., Jyothirmayi T., 2012. Fish Protein Hydrolysates: Proximate Composition, Amino Acid Composition, Antioxidant Activities and Applications: A Review. *Food Chemistry*, 135: 3020-3038.
- Cheung I.W.Y., Cheung L.K.Y., Tan N.Y., Li-Chan E.C.Y., 2012. The Role of Molecular Size in Antioxidant Activity of Peptide Fractions from Pacific Hake (*Merluccius productus*) Hydrolysates. *Food Chemistry*, 134: 1297-1306.
- Clemente A., 2000. Enzymatic Protein Hydrolysates in Human Nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11 (7): 254-262.
- Damodaran S., 1997. Food Proteins: An overview. In: Damodaran S., Paraf A., Eds. *Food Proteins and Their Applications*. New York, Marcel Dekker. 1-24.
- Decker E.A., Welch B., 1990. Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food. *J. Agric. Food Chem.*, (38): 674-677.
- DeCourcy K., Dolan E., 2009. Fralin Life Science Institute Protein Electrophoresis Kit Information Manual. 65 p.
- deMan J.M., 1999. *Enzymes in Principles of Food Chemistry* (3rd ed.). A Chapman & Hall Food Science Book, an Aspen Publication, Maryland. 389-427.
- Diniz F.M., Martin A.M., 1997. Effects of the Extent of Enzymatic Hydrolysis on Functional Properties of Shark Protein Hydrolysate. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 30, 266-272.
- Dong S., Zeng M., Wang D., Liu, Z., Zhao Y., Yang H., 2008. Antioxidant and Biochemical Properties of Protein Hydrolysates Prepared from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107: 1485-1493.

- EC, 2002. Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002. Laying Down the General Principles And Requirements Of Food Law, Establishing The European Food Safety Authority And Laying Down Procedures In Matters Of Food Safety.
- EC, 2005. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005. On Microbiological Criteria for Foodstuffs.
- EC, 2006. Commission Directive 2006/13/EC of 3 February 2006. Amending Annexes I and II to Directive 2002/32/EC Of The European Parliament And Of The Council On Undesirable Substances In Animal Feed As Regards Dioxins And Dioxin-Like PCBs.
- EC, 2009. Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and Of the Council of 21 October 2009. Laying Down Health Rules As Regards Animal By-Products And Derived Products Not Intended For Human Consumption And Repealing Regulation (EC) No 1774/2002 (Animal By-Products Regulation).
- EC, 2012. Commission Implementing Regulation (EU) No 505/2012 of 14 June 2012. Amending and correcting Regulation (EC) No 889/2008 Laying down Detailed Rules for the Implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on Organic Production and Labelling of Organic Products With Regard To Organic Production, Labelling and Control.
- Eerola S., Hinkkanen R., Lindfors E., Hirvi T., 1993. Liquid Chromatographic Determination of Biogenic Amines in Dry Sausages. *J. AOAC Int.*, 76: 575-577.
- Elavarasan K., Kumar N.V., Shamasundar B.A., 2013. Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (*Catla catla*) As Influenced by the Nature of Enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1-8.
- Erkoyuncu İ., Erdem M., Samsun O., Özdamar E., Kaya Y., 1994. Karadenizde Avlanan Bazı Balık Türlerinin Et Verimi, Kimyasal Yapısı ve Boy-Ağırlık İlişkisinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. *İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 8 (1-2): 181-191.

- Fallah M., Bahram S., Javadian S.R., 2015. Fish Peptone Development Using Enzymatic Hydrolysis of Silver Carp By-Products as a Nitrogen Source in *Staphylococcus aureus* Media. *Food Science & Nutrition*; 3 (2): 153–157.
- FAO, 1980. Fish Feed Technology. Food and Agriculture Organization of the United Nations ADCP/REP/80/11. Retrieved May 18, 2016, from <http://www.fao.org/docrep/X5738E/x5738e00.htm#Contents>.
- FAO, 1985. Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. WHO Technical Report Series, No. 724. Retrieved May 16, 2016, from <http://www.fao.org/doCRreP/003/aa040e/AA040E00.htm#TOC>.
- FAO, 1987. The Nutrition and Feeding of Farmed Fish and Shrimp - A Training Manual 1. The Essential Nutrients. GCP/RLA/075/ITA Field Document 2/E. Retrieved April 22, 2016, from <http://www.fao.org/3/contents/d66b3e1f-c059-50fa-9ba2-717e9940b7f1/AB470E00.htm>.
- FAO, 2001. FAO/WHO Expert Consultation on Human Vitamin and Mineral Requirements. Bangkok, Thailand. 286 p.
- FAO, 2014. The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and Challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. 223 p.
- FAO-WHO, 2013. Public Health Risks of Histamine and other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Meeting Report. 112 p.
- Farvin K.H.S., Andersen L.L., Otte J., Nielsen H.H., Jessen F., Jacobsen C., 2016. Antioxidant Activity of Cod (*Gadus morhua*) Protein Hydrolysates: Fractionation and Characterisation of Peptide Fractions. *Food Chemistry*, 204: 409-419.
- Fernandes P., 2010. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. *Enzyme Research*, Volume 2010: 1-19.
- Ferraro V., Cruz I. B., Jorge R.F., Malcata F.X., Pintado M.E., Castro P.M.L., 2010. Valorisation of Natural Extracts from Marine Source Focused on Marine By-Products: A Review. *Food Research International*, 43: 2221-2233.
- Flick G.J., Oria M.P. ve Douglas L., 2001. Potential Hazard in Cold Smoked Fish: Biogenic Amines. *Journal of Food Science*, Supplement to Vol. 66 (7): 1088-1099.

- García-Moreno P.J., Pérez-Gálvez R., Espejo-Carpio F.J., Ruiz-Quesada C., Pérez-Morilla A.I., Martínez-Agustín O., Guadix A., Guadix E.M., 2016. Functional, Bioactive and Antigenicity Properties of Blue Whiting Protein Hydrolysates: Effect of Enzymatic Treatment and Degree of Hydrolysis. *J Sci Food Agric*, 2016: 1-10.
- Gbogouri G.A., Linder M., Fanni J., Parmentier M., 2004. Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates. *Food Chemistry and Toxicology*, 69 (8): 615-622.
- Geirsdóttir M., 2005. Protein Isolation from Herring Final Report. Nordic Innovation Centre Project Number: 00075. 118 p.
- Ghaly A.E., Ramakrishnan V.V., Brooks M.S., Budge S.M., Dave D., 2013. Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 5 (4): 107-129.
- Gildberg A., 2002. Enhancing Returns from Greater Utilization. In *Safety and Quality Issues*. In: Bremner H.A., Ed. Fish Processing. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge. 425-449.
- Gökoğlu N., Özden Ö., Erkan N., Baygar T., Metin S., 1999. Seasonal Variation in Fat Content of Anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 401-402.
- Guerard F., Dufosse D., De La Broise D., Binet A., 2001. Enzymatic Hydrolysis of Proteins from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Wastes Using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 1051-1059.
- Gupta R., Beg Q.K., Khan S., Chauhan B., 2002. An Overview on Fermentation, Downstream Processing and Properties of Microbial Alkaline Proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60: 381-395.
- Hannachi O., Bouakka M., Melhaoui M. ve Hakkou A., 2011. Seasonal Evolution of the Biochemical Composition of the Moroccan Mediterranean Cost Anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Advances in Environmental Biology*, 5 (7): 1787-1793.
- Harnedy P.A., FitzGerald, R.J., 2011. Bioactive Peptides from Marine Processing Waste and Shellfish: A Review. *Journal of Functional Foods*, 4: 6-24.

- Hayes M., 2013. Biological Activities of Proteins and Marine-derived Peptides from Byproducts and Seaweeds. In: Kim S.-K., Ed. Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications. John Wiley & Sons, Ltd. 139-159.
- Hayes M., McKeon K., 2014. Advances in the Processing of Marine Discard and By-products. In: Kim, S.-K., Ed. Seafood Processing By-Products-Trends and Applications. Springer Science+Business Media, New York. 126-139.
- He S., Franco C., Zhang W., 2013. Functions, Applications and Production of Protein Hydrolysates from Fish Processing Co-Products (FPCP). Food Research International, 50: 289-297.
- Helfman G., Collette B.B., Facey D.E., Bowen B.W., 2009. Functional Morphology of Locomotion and Feeding (2nd Ed.). In: The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology. Wiley-Blackwell. 111-127.
- Herpandi N. H., Rosma A., Wan Nadiah W.A., 2011. The Tuna Fishing Industry: A New Outlook on Fish Protein Hydrolysates. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11: 195-207.
- Himonides A.T., Taylor A.K.D., Morris A.J., 2011. A Study of the Enzymatic Hydrolysis of Fish Frames Using Pilot Plant Scale Systems. Food and Nutrition Sciences, 2: 586-593.
- Hoyle N.T., Merritt J.H., 1994. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science, 59 (1): 76-79.
- Hsu K.-C., 2010. Purification of Antioxidative Peptides Prepared from Enzymatic Hydrolysates of Tuna Dark Muscle By- Product. Food Chemistry, 122: 42-48.
- Huss H.H., 1988. Fresh Fish: Quality and Quality Changes. Programme on Fish Technology and Quality Control. FAO Fisheries Series, no. 29, Rome. 134 p.
- ISO 1442, 1997. International Organization for Standardization. Meat and Meat Products- Determination of Moisture Content (Reference Method).
- ISO 1841-1, 1996. International Organization for Standardization. Meat and Meat Products- Determination of Chloride Content-Part 1: Volhard Method.

- ISO 936, 1998. International Organization for Standardization. Meat and Meat Products- Determination of Total Ash.
- Je J.-Y., Qian Z.-J., Byun H.-G., Kim S.-K., 2007. Purification and Characterization of An Antioxidant Peptide Obtained from Tuna Backbone Protein by Enzymatic Hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42: 840-846.
- Jeevitha K., Mohana P.K., Samanta S.K., 2014. Antioxidant activity of Fish Protein Hydrolysates from *Sardinella longiceps*. *Int. J. Drug Dev. & Res.*, 6 (4): 137-145.
- Jianga L., Wang B., Lia B., Wang C., Luo Y., 2014. Preparation and Identification of Peptides and Their Zinc Complexes with Antimicrobial Activities from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Protein Hydrolysates. *Food Research International*, 64: 91-98.
- Karadeniz F., Kim S.-K., 2014. Trends in the Use of Seafood Processing By-Products in Europe. In: Kim, S.-K., Ed. *Seafood Processing By-Products-Trends and Applications*. Springer Science+Business Media, New York. 11-19.
- Kaya Y., Turan H., 2010. Comparison of Protein, Lipid and Fatty Acids Composition of Anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) During the Commercial Catching Season. *Journal of Muscle Foods*, 21: 474-483.
- Kennedy J.F., White C.A., 1984. *Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry*. Godfrey T., Reichelt J., Eds. Macmillan, The Nature Press, London. 582 p.
- Kim S.-K., Mendis E., 2006. Bioactive Compounds from Marine Processing Byproducts-A Review. *Food Research International*, 39: 383-393.
- Kim S.-K., Wijesekara I., 2010. Development and Biological Activities of Marine-Derived Bioactive Peptides: A Review. *Journal of Functional Foods*, 2: 1 – 9.
- Kinsella J.E., Melachouris N., 1976. Functional Properties of Proteins in Foods: A Survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7 (3): 219-280.
- Klompong V., Benjakul S., Kantachote D., Shahidi F., 2007. Antioxidative Activity and Functional Properties of Protein Hydrolysate of Yellow Stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*) as Influenced by the Degree of Hydrolysis and Enzyme Type. *Food Chemistry*, 102: 1317-1327.

- Korhonen H., Pihlanto A., 2006. Bioactive Peptides: Production and Functionality. *Internationally Dairy Journal*, 16: 945-960.
- Kristinsson H.G., 2006. The Production, Properties, and Utilization of Fish Protein Hydrolysates. In: Shetty K., Pometto A., Levin R. E., Eds. *Food Biotechnology*. CRC Taylor and Francis. 1109-1022.
- Kristinsson H.G., 2007. Aquatic Food Protein Hydrolysates. In: Shahidi F., Ed. *Maximising the Value of Marine By-Products. A Volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, CRC Press. 229-248.
- Kristinsson H.G., Rasco B.A., 2000a. Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 657-666.
- Kristinsson H.G., Rasco B.A., 2000b. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (1): 43-81.
- Krizek M., Kalac P., 1998. Biogenic Amines in Foods and Their Role in Nutrition. *Czech Journal of Food Science*, 16, 4, p: 151-159.
- Kumar D., Savitri Thakur N., Verma Bhalla T.C., 2008. Microbial Proteases and Application as Laundry Detergent Additive. *Research Journal of Microbiology*, 3: 661-672.
- Lahl W.J., Braun S.D. 1994. Enzymatic Production of Protein Hydrolysates for Food Use. *Food Technology*, 58: 68-71.
- Lanier T.C., Yongsawatdigul J., Carvajal-Rondanelli P., 2013. Surimi Gelation Chemistry (3rd Ed.). In: Park, J.W., Ed. *Surimi and Surimi Seafood*. CRC Press. 101-141.
- Lehane L., Olley J., 2000. Histamin Fish Poisoning Revisited. *International Journal of Food Microbiology*, 58: 1-37.
- Liceaga-Gesualdo A.M., Li-Chan E.C.Y., 1999. Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64 (6): 100-1004.

- Li-Chan E.C.Y., 2004. Properties of Proteins in Food Systems: An Introduction. In: Yada R.Y., Ed. Proteins in Food Processing. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, England. 19-43.
- Linder M, Fanni J, Parmentier M, Sergent M, Phan-Thau-Luu R., 1995. Protein Recovery from Veal Bones by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 60: 949-952.
- Linder M., Fanni J., Parmentier M., 1996. Functional Properties of Veal Bone Hydrolysates. *Journal of Food Science*, 61: 712-716.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Meisel H., 1997. Biochemical Properties of Regulatory Peptides Derived from Milk Proteins. *Biopolymers*, 43: 119-128.
- Mendis E., Rajapakse N., Kim S.-K., 2005. Antioxidant Properties of a Radical-Scavenging Peptide Purified from Enzymatically Prepared Fish Skin Gelatin Hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 581-587
- Morais H.A., Silvestre M.P.C., Silva V.D.M., Silva M.R., Silva A.C.S., Silveira J.N., 2013. Correlation between the Degree of Hydrolysis and the Peptide Profile of Whey Protein Concentrate Hydrolysates: Effect of the Enzyme Type and Reaction Time. *American Journal of Food Technology*, 8: 1-16.
- Murray J., Burt J.R., 2001. The Composition of Fish. Ministry of Technology, Torry Research Station, Torry Advisory Note No. 38. Retrieved March 19, 2016, from <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e00.htm>
- Muzaifa M., Safriani N., Zakaria, F., 2012. Production of Protein Hydrolysates from Fish by- Product Prepared by Enzymatic Hydrolysis. *International Journal of the Bioflux Society*, 5 (1): 36-39.
- Najafian L., Babji, A.S., 2012. A Review of Fish-Derived Antioxidant and Antimicrobial Peptides: Their Production, Assessment, and Applications. *Peptides*. 33: 178-185.
- Nalinanon S., Soottawat B., Hideki K., Fereidoon S., 2011. Functionalities and Antioxidant Properties of Protein Hydrolysates from The Muscle of Ornate Threadfin Bream Treated with Pepsin from Skipjack Tuna. *Food Chemistry*, 124: 1354-1362.

- Ngo D.-H., Vo T.-S., Ngo D.-N., Wijesekara I., Kim S.-K., 2012. Biological Activities and Potential Health Benefits of Bioactive Peptides Derived from Marine Organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51: 378-383.
- Nilsang S., Lertsiri S., Suphantharika M., Assavanig A., 2005. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Fish Soluble Concentrate by Commercial Proteases. *Journal of Food Engineering*, 70 (4): 571-578.
- Ninan G., 2003. Chemical Composition of Fish and Shell Fish. The Central Institute of Fisheries Technology, Indian Council of Agricultural Research. Cochin 682 029. R. May 8, 2016, from <http://210.212.228.207/bitstream/handle/123456789/164/chemical%20composition%20of%20fish%20and%20shellfish.pdf?sequence=3>.
- NOAA (n.d.). The Office of General Counsel, National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA), U.S. Department of Commerce. Retrieved April 26, 2016, from http://www.gc.noaa.gov/documents/gcil_imo_fishwag.pdf.
- Nunes M.L., Narcisa M.B., Irineu B., 2011. Health Benefit Associated With Seafood Consumption. In: Alasalvar C., Shahidi F., Miyashita K., Wanasundara, U., Eds. *Handbook of Seafood Quality, Safety, and Health Applications*. Blackwell Publishing Ltd. 369-376.
- Ovissipour M., Abedian A., Motamedzadegan A., Rasco B., Safari R., Shahiri, H., 2009a. The Effect of Enzymatic Hydrolysis Time and Temperature on The Properties of Protein Hydrolysates from Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Viscera. *Food Chemistry*, 115: 238-242.
- Ovissipour M., Safari R., Abedian A., Motamedzadegan A., Rasco B., Pourgholam R., Mohagheghi E., Molla A.E., 2009b. Use of Hydrolysates from Yellowfin Tuna *Thunnus albacares* Fisheries By-Product as a Nitrogen Source for Bacteria Growth Media. *Int Aquat Res*, 1: 73-77.
- Ovissipour M., Taghiof M., Motamedzadegan A., Rasco B., Molla A. E., 2009c. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Beluga Sturgeon *Huso huso* Using Alcalase. *Int. Aquat. Res.*, 1: 31-38.

- Pacheco-Aguilar R., Mazorra-Manzano M.A., Ramírez-Sua´rez J.C., 2008. Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Pacific Whiting (*Merluccius productus*) Muscle Produced by A Commercial Protease. *Food Chemistry*, 109: 782-789.
- Panyam D., Kilara A., 1996. Enhancing the Functionality of Food Proteins by Enzymatic Modification. *Trends in Food Science and Technology*, 7: 120-125.
- Pearce K.N., Kinsella J.E., 1978. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of A Turbidimetric Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26: 716-723.
- Pegg R.B., Rybarczyk A., Amarowicz R., 2007. Determination of Hippuric Acid by RP-HPLC using Two Different Analytical Columns-Short Report. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 57 (4): 447-450.
- Pihlanto-Leppala A., 2001. Bioactive Peptides Derived From Bovine Whey Proteins: Opioid and Ace-Inhibitory Peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 11 (9-10): 347-356.
- Pires C., Batista I., 2013. Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates. In: Gálvez R.P., Bergé J.P., Eds. *Utilization of Fish Waste*. CRC Press, London, Great Britain. 59-75.
- Polanco-Lugo E., Dávila-Ortiz G., Betancur-Ancona D.A., Chel-Guerrero L.A., 2014. Effects of Sequential Enzymatic Hydrolysis on Structural, Bioactive and Functional Properties of Phaseolus Lunatus Protein Isolate. *Food Sci. Technol*, 34 (3): 441-448.
- Ramakrishnan V.V., Ghaly A.E., Brooks M.S., Budge S.M., 2013. Extraction of Proteins from Mackerel Fish Processing Waste Using Alcalase Enzyme. *J Bioprocess Biotechniq*, 3 (2): 1-9.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 597-635.
- Roslan J., Md. Yunos, K.F., Abdullah N., Mazlina S., Kamal M., 2014. Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-Product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2: 312-319.

- Rustad T., 2003. Utilisation of Marine By-Products. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2 (4): 458-463.
- Rustad T., 2007. Physical and Chemical Properties of Protein Seafood By-Products. In: Shahidi F., Ed. *Maximising the Value of Marine By-Products*. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, CRC Press. 22-46.
- Ryan J.T., Ross R.P., Bolton D., Fitzgerald G.F., Stanton C., 2011. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients*, 3: 765-791.
- Santos S.D'A., Martins V.G., Salas-Mellado M., Prentice C., 2011. Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewing Searobin (*Prionotus punctatus*) Obtained with Different Microbial Enzymes. *Food Bioprocess Technol*, 4:1399-1406.
- Santos S.M. H., 1996. Biogenic Amines Their Importance in Foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 213-231.
- Sathivel S., Smiley S., Prinyawiwatkul W., Bechtel P.J., 2005. Functional and Nutritional Properties of Red Salmon (*Oncorhynchus nerka*) Enzymatic Hydrolysates. *Journal of Food Science*, 70 (6): 401-406.
- See S.F., Hoo L.L., Babji A.S., 2011. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) Skin by Alcalase. *International Food Research Journal*, 18 (4): 1359-1365.
- Seligson F.H., Mackey L.N., 1984. Variable Predictions of Protein Quality by Chemical Score due to Amino Acid Analysis and Reference Pattern. *The Journal of Nutrition*, 114 (4): 682-691.
- Sen D.P., 2005. *Advances in Fish Processing Technology*. Allied Publishers Private Limited, New Delhi. 805p.
- Shahidi F., 1994. Seafood Proteins and Preparation of Protein Concentrates. In: Shahidi F., Botta J.R. *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*. Springer-Science+Business Media, USA. 3-9.
- Shahidi F., Han X.-Q., Synowiecki J., 1995. Production and Characteristics of Protein Hydrolysates from Capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53: 285-293.

- Shalaby A.R., 1996. Significance of Biogenic Amines to Food Safety and Human Health. *Food Research International*, 29: 675-690.
- Shamloo M., Bakar J., Mat Hashim D., Khatib A., 2012. Biochemical Properties of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Protein Hydrolysates. *International Food Research Journal*, 19 (1): 183-188.
- Shirai K., Ramirez-Ramirez J.C., 2011. Utilization of Fish Processing By-products for Bioactive Compounds. In: Hall, G.M., Ed. *Fish Processing-Sustainability and New Opportunities*. Wiley- Blackwell, Preston, U.K. 236-258.
- Sigma, 2016. Life Science > Metabolomics > Enzyme Explorer > Analytical Enzymes: Subtilisin Retrieved October 10, 2014, from <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/subtilisin.html#Products>.
- Sila A., Haddar A., Martinez-Alvarez O., Bougatef A., 2013. Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities of Protein Hydrolysate from Muscle of Barbel (*Barbus callensis*). *Journal of Chemistry*, 2013: 1-6.
- Simpson B.K., 2000. Digestive Proteinases from Marine Animals. In: Haard N.F., Simpson B.K., Eds. *Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*. CRC Press. 191-213.
- Slizyte R., Mozuraityte R., Martinez-Alvarez O., Falch E., Fouchereau-Peron M., Rustad T., 2009. Functional, Bioactive and Antioxidative Properties of Hydrolysates Obtained from Cod (*Gadus morhua*) Backbones. *Process Biochemistry*, 44: 668-677.
- Souissi N., Bougatef A., Triki-Ellouz Y., Nasri M., 2007. Biochemical and Functional Properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) By-Product Hydrolysates. *Food Technol. Biotechnol.*, 45 (2): 187-194.
- Stefansson G., Hultin H.O., 1994. On the Solubility of Cod Muscle Proteins in Water. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2656-2664.
- Sudan R., Bhagat M., Gupta S., Singh J., Koul A., 2014. Iron (FeII) Chelation, Ferric Reducing Antioxidant Power, and Immune Modulating Potential of *Arisaema jacquemontii* (Himalayan Cobra Lily). *BioMed Research International*, 2014: 1-8.

- Tahergorabi R., Jaczynski J., 2014. Isoelectric Solubilization/Precipitation as a Means to Recover Protein and Lipids from Seafood By-products. In: Kim, S.-K., Ed. Seafood Processing By-Products-Trends and Applications. Springer Science+Business Media, New York., 101-124.
- Tannenbaum S.R, Ahern M, Bates R.P., 1970a. Solubilization of Fish Protein Concentrate. I.An Alkaline Process. Food Technology, 24 (5): 604.
- Tannenbaum S.R, Ahern M, Bates R.P., 1970b. Solubilization of Fish Protein Concentrate. II. Utilization of the Alkaline-Process Product. Food Tecnology, 24 (5): 607.
- Tanuja S., Haridas A., Zynudheen A.A., Joshy C.G., 2014. Functional and Antioxidative Properties of Fish Protein Hydrolysate (FPH) Produced from The Frame Meat of Striped Catfish *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) Using Alkaline Protease Alcalase. Indian J. Fish., 61 (2): 82-89.
- Tavano O.L., 2013. Protein Hydrolysis Using Proteases: An Important Tool for Food Biotechnology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 90: 1-11.
- Taylor S.L., 1986. Histamine Food Poisoning: Toxicology and Clinical Aspects. CRC Critical Reviews in Toxicology. 17: 91-128.
- Tejada M. 2001. Aggregation of Myofibrillar Proteins during Frozen Storage. In: Bozoğlu F., Deak T., Ray B., Eds. Novel Processes and Control Technologies in the Food Industry. NATO Science Series I, Life and Behavioural Sciences (Vol. 338), IOS Press, Netherlands. 212-226.
- Temiz A., 2007. Enzimler. Saldamlı İ., Ed. Gıda Kimyası (3. baskı). Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara. 287-359.
- TGK, 2011. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Resmi Gazete Tarihi ve Sayısı: 29.12.2011/28157 (3.mükerrer).
- Thaipong K., Boonprakob U., Crosby K., Cisneros-Zevallos L., Byrne D.H., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC Assays For Estimating Antioxidant Activity from Guava Fruit Extracts. Journal of Food Composition and Analysis, 19: 669-675.

- Theodore A.E. and Kristinson H.G., 2007. Angiotensin Converting Enzyme Inhibition of Fish Protein Hydrolysates Prepared From Alkaline-Aided Channel Catfish Protein Isolate. *J Sci Food Agric.*, 87: 2353-2357.
- Thiansilakul Y., Benjakul S., Richards M.P., 2011. Isolation, Characterisation and Stability of Myoglobin from Eastern Little Tuna (*Euthynnus affinis*) Dark Muscle. *Food Chemistry*, 124: 254–261.
- Thiansilakul Y., Benjakul S., Shahidi F., 2007a. Antioxidative Activity of Protein Hydrolysate from Round Scad Muscle Using Alcalase and Flavourzyme. *Journal of Food Biochemistry*, (31): 266-287.
- Thiansilakul Y., Benjakul S., Shahidi F., 2007b. Compositions, Functional Properties and Antioxidative Activity of Protein Hydrolysates Prepared from Round Scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103 (2007): 1385-1394.
- Thorkelsson G., Kristinsson H.G., 2009. Bioactive Peptides from Marine Sources. State of Art. Report to the NORA Fund. Report Summary, Project No. 14101684. 19 p.
- Thorkelsson G., Sigurgisladottir S., Geirsdottir M., JoÂhannsson R., GueÂrard F, Chabeaud A., Bourseau P., Vandanjon L., Jaouen P., Chaplain-Derouiniot M., Fouchereau-Peron M., Martinez-Alvarez O., Le Gal Y., Ravallec-Ple R., Picot L., Berge J. P., Delannoy C., Jakobsen G., Johansson I., Batista I., Pires C., 2008. Mild Processing Techniques and Development of Functional Marine Protein and Peptide Ingredients. In: Borresen T., Ed. *Improving Seafood Products for the Consumer*. CRC Press. 363-388.
- Thuy C.X., Lam T.B., Mc. Commick K., 2015. Biochemical and Functional Properties of Fish Protein Isolate (FPI) From *Pangasius hypophthalmus* Byproducts as Influenced by Time and Degree of Hydrolysis (DH). *International Food Research Journal*, 22 (1): 337-343.
- Tidwell J.H., Allan G.L., 2001. *Fish As Food: Aquaculture's Contribution*. European Molecular Biology Organization (EMBO) Reports Vol. 2, No. 11, 958-963.
- TS 1744, 1974. Türk Standardı: Et ve Et Mamulleri Toplam Yağ Miktarı Tayini.
- TS EN 13805, 2004. Türk Standardı: Gıdalar-Eser Elementlerin Tayini-Basınc Altında Parçalama.

- TUİK, 2015a. Türkiye İstatistik Kurumu Haber Bülteni. Sayı: 42/2015. 7 Temmuz 2015, http://tuik.gov.tr/basinOdasi/haberler/2015_42_20150707.pdf.
- TUİK, 2015b. Türkiye İstatistik Kurumu İnternet Sayfası. Su Ürünleri İstatistikleri-2014. 7 Ağustos 2015, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1005.
- Tülsner M., 1994. Fischverarbeitung Band I-Rohstoffeigenschaften und Grundlagen der Verarbeitungsprozesse. Behr's Verlag, Hamburg. 304 p.
- Valencia P., Bustos N, Almonacid S., 2011. Modulation of Thermal Inactivation of Protease During Enzymatic Hydrolysis of Salmon Muscle. 11th International Congress On Engineering and Food, MFS1086, May 22 - 26, Greece.
- Venugopal V., 1994. Production of Fish Protein Hydrolyzates by Microorganisms. In: Hall A.M., Ed. Fisheries Processing: Biotechnological Applications. Springer Science+Business Media Dordrecht. 223-243.
- Vercruyse L., Camp J.V., Smaghe G., 2005. ACE Inhibitory Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysates of Animal Muscle Protein: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (21): 8106-8115.
- Vermeirssen V., Camp J.V., Verstraete W., 2004. Bioavailability of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides. British Journal of Nutrition, 92: 357-366.
- Waldron K., 2007. Waste Minimisation, Management and Co-Product Recovery in Food Processing: An Introduction. In: Waldron K., Ed. Handbook of Waste Management and Co-Product Recovery in Food Processing. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. 3-20.
- Wasswa J., Tang J., Gub X., Yuan X., 2007. Influence of the Extent of Enzymatic Hydrolysis on the Functional Properties of Protein Hydrolysate from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Skin. Food Chemistry, 104: 1698-1704.
- Wilson J., Hayes M., Carney B., 2011. Angiotensin-I-Converting Enzyme and Propyl Endopeptidase Inhibitory Peptides from Natural Sources with A Focus on Marine Processing By-Products. Food Chemistry, 129: 235-244.
- Xiong Y. L., 2004. Muscle Proteins. In: Yada, R.Y., Ed. Proteins in Food Processing. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, England. 116-137.

Yıldız S., 2007. Enzimler. Fakülte Kitabevi, Isparta. 200 s.

Yoshida A., Ohta M., Kuwahara K., Cao M.J., Hara K., Osatomi K., 2015. Purification and Characterization of Cathepsin B from the Muscle of Horse Mackerel *Trachurus japonicus*. Mar Drugs., 13 (11): 6550-6565.

Zhang Y., Duan X., Zhuang Y., 2012. Purification and Characterization of Novel Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin Gelatin. Peptides, 38: 13-21.

Zubay G.L., Parson W.W., Vance D.E., 1995. Protein Structure and Function. In: Principles of Biochemistry. Wm. C. Brown Publishers, Oxford, England. 47-118.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Sinan KOÇ

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 01.08.1967

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

- 1) Güven S. ve Koç S., 2003. Ton Konservelerinde Histamin. Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi, 4: 43-48.

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

- 1) Koç S., Arık Çolakoğlu F., 2016. Su Ürünlerinde Kalite ve Ürün Güvenliği (Sözlü Bildiri). II. Balıkçılık Çalıştayı, 24-25 Mayıs 2016, Bandırma/Balıkesir.
- 2) Koç S., Arık Çolakoğlu F., 2013. Nanoteknolojinin Öteki Yüzü (Sözlü Bildiri). 17. Ulusal Su Ürünleri Sempozyumu, 3-6 Eylül 2013, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

c) Katıldığı Projeler

- 1) Farklı Ambalajlama Yöntemleri İle Soğukta Muhafaza Edilen Midye Dolmada Depolama Süresince Meydana Gelen Değişimlerinin Araştırılması (Proje Lideri). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2011-2013.
- 2) Biyoteknoloji Laboratuvarı Kurulumu Projesi (Proje Tasarımcısı ve Yürütücüsü). Güney Marmara Kalkınma Ajansı, Sosyal Kalkınma Mali Destek Programı Aralık 2011- Temmuz 2012, Çanakkale.

- 3) Soğukta Muhafaza Edilen Sardalya Balığında Biyojen Aminlerin Bozulma Ölçüsü Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması (Proje Lideri). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, 2003-2005.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Çanakkale Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü (1985- Devam ediyor)

İLETİŞİM

E-posta Adresi: sinankoc17@hotmail.com

