



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DOKTORA TEZİ**



**DENİZ HIYARININ (*Holothuria tubulosa*)  
BİYOKİMYASAL, FONKSİYONEL VE BİYOAKTİF  
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**İbrahim Ender KÜNİLİ**

**Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı**

**ÇANAKKALE**

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

**DENİZ HIYARININ (*Holothuria tubulosa*)**  
**BİYOKİMYASAL, FONKSİYONEL VE BİYOAKTİF**  
**ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**İbrahim Ender KÜNİLİ**

**Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı**

**Tezin Sunulduğu Tarih: 02/08/2017**

**Tez Danışmanı:**

**Prof. Dr. Fatma Arık ÇOLAKOĞLU**

**ÇANAKKALE**

İbrahim Ender KÜNİLİ tarafından Prof. Dr. Fatma Arık ÇOLAKOĞLU yönetiminde hazırlanan ve **02/08/2017** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Deniz Hıyarının (*Holothuria tubulosa*) Biyokimyasal, Fonksiyonel ve Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

Prof. Dr. Fatma Arık ÇOLAKOĞLU .....

**Başkan**

Doç. Dr. Nermin BERİK .....

**Üye**

Yrd. Doç. Dr. Gülen TÜRKER .....

**Üye**

Prof. Dr. Şükran ÇAKLI .....

**Üye**

Prof. Dr. Ufuk ÇELİK .....

**Üye**

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FDK-2014-430.

## 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.**

İbrahim Ender KÜNİLİ

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, akademik hayatım sũresince olduğu gibi tez çalışmam sũresince de benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, değerli gũrũřleri ile her çalışmama anlam katan, saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Fatma Arık ÇOLAKOĞLU'na, tezimi hassasiyetle inceleyerek ȃnerileri ve yȃnlendirmeleriyle çalışmama değer katan Sayın Doç. Dr. Nermin BERİK ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Gũlen TũRKER hocalarıma sonsuz teŐekkũrlerimi sunarım. Eski tez izleme komitesi ũyleri olan, Sayın Hũseyin UYSAL ve Sayın Olcay HİSAR'a da katkılarından dolayı teŐekkũr ederim.

Çalışmamın çeşitli aşamalarında yardımını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan Basri ORMANCI'ya ve bu çalışmanın gerçekleşmesi için mali desteği sağlayan Çanakkale Onsekiz Mart ũniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teŐekkũrũ borç bilirim.

Sevgi ve hořgȃrũsũ ile çalışma sũresince karşılaştığım her gũlũkte yanımda olan sevgili eşim Merve KũNİLİ'ye, hayatımın her anında yanımda olan, manevi desteği ile çalışmalarıma katkı sağlayan sevgili ablam Evren KũNİLİ ve vefatından sonra dahi hala çalışmalarımda ilham ve gũ aldığım, bu tezi kendisine ithaf ettiğim canım annem H. Emel EVİN'e ũkranlarımı sunarım.

İbrahim Ender KũNİLİ  
anakkale, AĞustos 2017

## SİMGELER VE KISALTMALAR

FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
USD	Amerikan Doları
Kg	Kilogram
g	Gram
mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
µl	mikrolitre
L	Litre
m	Metre
%	Yüzde oranı
EPA	Eikosapentaenoik asit
DHA	Dokosaheksaenoik asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
kDA	Kilodalton
AOAC	Uluslararası Resmi Analiz Metotları
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sülfürik Asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
NaOH	Sodyum Hidroksit
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
HCl	Hidroklorik Asit
M	Molar
N	Normal
BF <sub>3</sub>	Bor Tri Florür
NaCl	Sodyum Klorür
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sodyum Sülfat
UIPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
% w/v	Hacimde yüzdece ağırlık
% v/v	Hacimde yüzdece hacim
dk	Dakika
x g	rölatif santrifüj kuvveti (RCF)

U	Ünite
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
mM	Milimolar
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di Sodyum Hidrojen Fosfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sodyum Di Hidrojen Fosfat
µm	Mikrometre
mmol	milimol
nm	nanometre
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
NTK	Nem Tutma Kapasitesi
NÇK	Nem Çekme Kapasitesi
Rpm	Dakika başına devir
sn	Saniye
EAI	Emülsiyon Aktivite İndeksi
EDI	Emülsiyon Dayanıklılık İndeksi
KK	Köpürme Kapasitesi
KD	Köpük Dayanıklılık Kapasitesi
Ext	Toplam Çözücü Ekstraktı
Vp	Vücut Duvarı Protein Ekstraktı
VpP	Vücut Duvarı Protein Ekstraktı Pepsin Hidrolizatı
VpT	Vücut Duvarı Protein Ekstraktı Tripsin Hidrolizatı
Col	Kolajen
CP	Kolajen Pepsin Hidrolizatı
CT	Kolajen Tripsin Hidrolizatı
BP	İç Organ Pepsin Hidrolizatı
BT	İç Organ Tripsin Hidrolizatı
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> )
FeCl <sub>2</sub>	Demir (II) Klorür
FeCl <sub>3</sub>	Demir (III) Klorür
FeSO <sub>4</sub>	Demir (II) Sülfat
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
SFA	Doymuş Yağ Asitleri
USFA	Doymamış Yağ Asitleri

MUFA	Tekli Doymamış Yağ Asitleri
PUFA	Çoklu Doymamış Yağ Asitler
HD	Hidrolizasyon Derecesi
RH	Bağıl Nem





## ÖZET

### DENİZ HIYARININ (*Holothuria tubulosa*) BİYOKİMYASAL, FONKSİYONEL VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

İbrahim Ender KÜNİLİ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Fatma Arık ÇOLAKOĞLU

02/08/2017, 111

Yapılan çalışmada, değerli bir deniz ürünü olan *Holothuria tubulosa*'nın besinsel, fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Araştırma materyali, *Holothuria tubulosa* Çanakkale Boğazı kıyısız alanlarından toplanmış, örnekler; vücut duvarı, iç organlar ve vücut sıvısı olmak üzere üç ayrı kısma ayrılarak analizlere tabi tutulmuştur. Deniz hıyarının besin kompozisyonu, makro bileşenlerden su, protein, yağ ve kül analizleri, yanı sıra amino asit, yağ asidi ve mineral madde analizleri ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerin tespiti ise; deniz hıyarının vücut kısımlarından elde edilen ekstrakt, izolat ve hidrolizatlarda yapılmıştır. Elde edilen numunelerde fonksiyonel özelliklerden; çözünürlük, nem çekme-tutma, emülsiyon ve köpük özellikleri, biyoaktif özelliklerden ise, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radikallerini süpürme, demir şelatlama, indirgeme gücü, DNA hasarı koruma ve antimikrobiyal aktivite özellikleri araştırılmıştır.

İncelemeler sonucunda; deniz hıyarının besin olarak nitelendirilebilen kısımlarının % 81-93 su, % 3-10 protein, % 1-2 yağ ve % 1-5 kül içerdiği, tüm esansiyel amino asitleri ihtiva ettiği, sahip olduğu mineral maddelerden en fazla bulunan iz mineralin silisyum (91 mg/kg), makro mineralin ise sodyum (3,9 g/kg) olduğu belirlenmiştir. Vücut sıvısı, duvarı ve iç organ kısımlarından elde edilen protein içerikli örneklerin, referans maddelere göre fonksiyonel özelliklerinin genel anlamda iyi olduğu, en iyi özelliğin ise kolajen örneklerinde emülsiyon aktivitesi (56-66 m<sup>2</sup>/g) olduğu belirlenmiştir. Biyoaktif özellikler açısından; deniz hıyarının vücut kısımlarının, farklı düzeylerde antioksidan özellik gösterdiği; en iyi antioksidan özelliğin ise yine kolajen örneklerinde (DPPH % 85, Şelatlama % 77, İndirgeme 1,80/1,65) görüldüğü tespit edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite

özelliğinin düzeyi ise, tüm örneklerde referans maddelere göre düşük olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Deniz Hıyarı, *Holothuria tubulosa*, Besin Kompozisyonu, Fonksiyonel Özellikler, Biyoaktif Özellikler.



## ABSTRACT

### DETERMINATION OF BIOCHEMICAL, FUNCTIONAL, AND BIOACTIVE PROPERTIES OF SEA CUCUMBER (*Holothuria tubulosa*)

İbrahim Ender KÜNİLİ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Fishing and Fish Processing Technology

Advisor: Prof. Dr. Fatma Arık ÇOLAKOĞLU

02/08/2017, 111

In this thesis, it was tried to determine nutritive, functional, and bioactive properties of *Holothuria tubulosa* which is a valuable seafood. Research material *Holothuria tubulosa* samples were collected from seashore of Çanakkale Strait. Each collected sample was subjected to analysis after divided into three parts named as body wall, ceoleomic fluid, and viscera. Nutritive composition of sea cucumber was tried to determine with macro components such as water, protein, total lipid, and ash along with, amino acid, fatty acid and mineral matter analysis. Determination of functional and bioactive properties was performed in extract, isolate and hydrolysates obtained from divided body parts of sea cucumber samples; functional properties determined with the analysis of solubility, water absorption-retention, emulsifying and foaming; bioactive properties determined with the analysis of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging, iron chelating, reducing power, protective properties against hydroxyl radical-induced DNA damage and antimicrobial activity.

According to the findings, it was determined that the edible parts of sea cucumbers contain 81-93 % water, 3-10 % protein, 1-2 % lipid, and 1-5% ash, and contain all essential amino acids, most abundant trace mineral is silica (91 mg/kg) and macro mineral is sodium (3,9 g/kg). Proteins obtained from body wall, viscera and ceoleomic fluid, in general, have shown good functional properties in comparison with the reference materials and emulsifying activity was determined in collagen samples (55-66 m<sup>2</sup>/g) as best functional feature. In view of bioactive properties, samples of sea cucumber body parts, have shown antioxidant activity at different levels and best antioxidant activity was observed in collagen samples (DPPH 85 %, Iron Chelating 77 %, Reducing Power 1,80/165).

Antimicrobial activity was determined at low levels in all samples in comparison with reference antibiotic.

**Keywords:** Sea Cucumber, *Holothuria tubulosa*, Nutritive Properties, Functional Properties, Bioactive Properties.



# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU.....	iii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	3
2.1. Deniz Hıyarları (Holothuroidea).....	3
2.1.1. Üretimi ve Ticareti.....	4
2.1.2. Besinsel Özelliği.....	6
2.1.3. Farmakolojik ve Tedavi Edici Özelliği.....	7
2.2. Proteinler ve Genel Özellikleri.....	8
2.2.1. Su Ürünleri Proteinleri.....	9
2.2.2. Proteinlerin Hidrolizasyonu ve Ekstraksiyonu.....	11
2.2.2.1. Protein Hidrolizasyonu.....	11
2.2.2.2. Protein Ekstraktları.....	15
2.2.2.3. Kolajen ve Hidrolizatları.....	16
2.3. Proteinlerin Fonksiyonel ve Biyoaktif Özellikleri.....	17
2.3.1. Fonksiyonel Özellikler.....	17
2.3.1.1. Çözünürlük.....	18
2.3.1.2. Nem Çekme-Tutma Kapasitesi.....	18
2.3.1.3. Emülsiyon Özelliği.....	19
2.3.1.4. Köpürme Özelliği.....	20
2.3.2. Biyoaktif Özellikler.....	21
2.3.2.1. Antioksidan Aktivite.....	21
2.3.2.2. Antimikrobiyal Aktivite.....	23
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.2. Metot.....	26

3.2.1. Örneklerin Hazırlanması.....	26
3.2.2. Deneme Planı.....	26
3.2.3. Deniz Hıyarının Morfolojik ve Biyokimyasal Özelliklerine Ait Analizler.....	27
3.2.3.1. Morfolojik Ölçümler.....	27
3.2.3.2. Besin Kompozisyonu Analizleri.....	28
3.2.3.2.1. Nem Analizi.....	28
3.2.3.2.2. Ham Protein Analizi.....	28
3.2.3.2.3. Ham Yağ Analizi.....	29
3.2.3.2.4. Ham Kül Analizi.....	29
3.2.3.2.5. Amino Asit Analizi.....	30
3.2.3.2.6. Yağ Asidi Analizi.....	30
3.2.3.2.7. Mineral Madde Analizi.....	31
3.2.4. Deniz Hıyarı Ekstrakt, Protein ve Hidrolizatlarının Elde Edilmesi.....	31
3.2.4.1. Total Ekstraksiyon.....	31
3.2.4.2. Vücut Duvarı Protein İzolasyonu.....	32
3.2.4.2.1. Pepsin ile Protein Hidrolizasyonu.....	32
3.2.4.2.2. Tripsin ile Protein Hidrolizasyonu.....	33
3.2.4.3. Kolajen İzolasyonu.....	33
3.2.4.4. Kolajen Hidrolizasyonu.....	34
3.2.4.4.1. Pepsin ile Kolajen Hidrolizasyonu.....	34
3.2.4.4.2. Tripsin ile Kolajen Hidrolizasyonu.....	35
3.2.4.5. İç Organ Protein Hidrolizasyonu.....	35
3.2.4.5.1. Pepsin ile İç Organ Protein Hidrolizasyonu.....	35
3.2.4.5.2. Tripsin ile İç Organ Protein Hidrolizasyonu.....	36
3.2.4.6. Hidrolizasyon Derecesi.....	36
3.2.4.7. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Page Analizi.....	37
3.2.5. Deniz Hıyarı Ekstrakt, Protein ve Hidrolizatlarına Yapılan Fonksiyonel ve Biyoaktif Analizler.....	37
3.2.5.1. Fonksiyonel Özelliklerin Belirlenmesi.....	37
3.2.5.1.1. Çözünürlük Özelliğinin Belirlenmesi.....	37
3.2.5.1.2. Nem Çekme ve Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi.....	38
3.2.5.1.3. Emülsiyon Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi.....	38
3.2.5.1.4. Köpürme Özelliğinin Belirlenmesi.....	39
3.2.5.2. Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi.....	40
3.2.5.2.1. Ürünlerin Analizlere Hazırlığı.....	40
3.2.5.2.2. DPPH Radikalleri Süpürme Etkisinin Belirlenmesi.....	40
3.2.5.2.3. Demir Şelatlama Özelliğinin Belirlenmesi.....	40

3.2.5.2.4. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi.....	41
3.2.5.2.5. Hidroksil Radikal Tesiriyle Oluşan DNA Hasarı Koruma Özelliğinin Tespiti.....	41
3.2.5.2.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	42
3.2.5.2.6.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu.....	42
3.2.5.2.6.2. Disk Difüzyon Yöntemi .....	42
3.2.6. İstatistiksel Analizler.....	43
<b>BÖLÜM 4</b>	
<b>ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....</b>	<b>44</b>
4.1. Deniz Hıyarının Morfolojik ve Besin Özelliklerine Ait Bulgular.....	44
4.1.1. Morfolojik Ölçümler.....	44
4.1.2. Besin Kompozisyonu.....	45
4.1.3. Amino Asit Kompozisyonu.....	48
4.1.4. Yağ Asidi Kompozisyonu.....	50
4.1.5. Mineral Kompozisyonu.....	53
4.2. Deniz Hıyarı Ektrakt, Protein ve Hidrolizatlarına Ait Bulgular.....	55
4.2.1. Hidrolizasyon Derecesi.....	55
4.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Page Analizi.....	58
4.3. Deniz Hıyarı Ekstraktı, Proteini ve Hidrolizatlarına Yapılan Fonksiyonel ve Biyoaktif Analizlere Ait Bulgular.....	59
4.3.1. Fonksiyonel Özellikler.....	59
4.3.1.1. Çözünürlük.....	59
4.3.1.2. Nem Çekme-Tutma Kapasitesi.....	63
4.3.1.3. Emülsiyon Özelliği.....	67
4.3.1.4. Köpürme Özelliği.....	69
4.3.2. Biyoaktif Özellikler.....	72
4.3.2.1. DPPH Radikalleri Süpürme Etkisi.....	72
4.3.2.2. Demir Şelatlama Özelliği.....	75
4.3.2.3. İndirgeme Gücü Özelliği.....	78
4.3.2.4. Hidroksil Radikal Tesiriyle Oluşan DNA Hasarını Koruma Özelliği.....	81
4.3.2.5. Antimikrobiyal Özelliği.....	83
<b>BÖLÜM 5</b>	
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>88</b>
5.1. Sonuçlar.....	88
5.2. Öneriler.....	89
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>91</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>I</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Deniz hıyarı biyolojisi.....	4
Şekil 2.2. Dünya deniz hıyarı üretiminin kıtalara göre dağılımı ve en çok üretilen tür olan <i>Aposticopus japonicus</i> 'un üretimdeki payı.....	5
Şekil 2.3. Beche-de-mer olarak işlenmiş ve tüketime sunulan deniz hıyarları.....	7
Şekil 2.4. Proteinlerin parçalarına ayrışmasından sorumlu hidroliz işlemi.....	11
Şekil 3.1. Deniz hıyarı ( <i>Holothuria tubulosa</i> , Gmelin, 1791).....	26
Şekil 3.2. Deney planı işlem akış şeması.....	27
Şekil 3.3. Vücut duvarı protein izolasyonu işlem akış fotoğrafları.....	32
Şekil 3.4. Kolajen izolasyonu işlem akış fotoğrafları.....	34
Şekil 3.5. Kolajen pepsin hidrolizatı işlem akış fotoğrafları.....	35
Şekil 4.1. <i>Holothuria tubulosa</i> örneklerine ait biyometrik ölçümler ve frekanslarının boy uzunluğuna göre dağılımları.....	44
Şekil 4.2. <i>Holothuria tubulosa</i> 'nın vücut duvarı (a), iç organ (b) ve vücut sıvısı (c)'na ait besin kompozisyonu bulgularının mevsimsel değişimi.....	47
Şekil 4.3. <i>Holothuria tubulosa</i> 'ya ait toplam protein, kolajen ve iç organların farklı enzim konsantrasyonlarında tespit edilen hidrolizasyon dereceleri.....	56
Şekil 4.4. <i>Holothuria tubulosa</i> 'dan elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü.....	59
Şekil 4.5. Çalışmada elde edilen protein bazlı bileşiklerin çözünürlükleri.....	61
Şekil 4.6. Elde edilen örneklerin bağıl nem (RH) %81 ve %43'teki nem çekme Kapasiteleri.....	64
Şekil 4.7. Elde edilen örneklerin bağıl nem (RH) %43 ve %81' de nem tutma Kapasiteleri.....	65
Şekil 4.8. Çalışmada elde edilen protein bazlı bileşiklerin %0,5 konsantrasyonlarındaki emülsifikasyon özellikleri.....	67
Şekil 4.9. Çalışmada elde edilen protein ve hidrolizatlarının köpürme özellikleri.....	70
Şekil 4.10. <i>Holothuria tubulosa</i> 'nın çözücü ekstraktı, vücut sıvısı, proteinleri ve bu proteinlerin hidrolizatlarının, C vitamini ve BHT'ye göre DPPH radikalleri süpürme etkisinin konsantrasyona bağlı değişimleri.....	73
Şekil 4.11. <i>Holothuria tubulosa</i> 'nın çözücü ekstraktı, vücut sıvısı, proteinleri ve bu proteinlerin hidrolizatlarının, EDTA'ya göre şelatlama yeteneğinin konsantrasyona bağlı değişimleri.....	76
Şekil 4.12. <i>Holothuria tubulosa</i> 'nın çözücü ekstraktı, vücut sıvısı, protein ve hidrolizatlarının, C vitamini ve BHT'ye göre indirgeme özelliğinin konsantrasyona bağlı değişimleri.....	79
Şekil 4.13. <i>Holothuria tubulosa</i> 'dan elde edilen örneklerin <i>E. coli</i> pBR32 plasmid DNA'sını oksidatif hasara karşı koruma dereceleri.....	82



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No

Çizelge 2.1. Fonksiyonlarına göre proteinlerin sınıflandırılması (Campbell ve Reece, 2002).....	9
Çizelge 2.2. Gıda endüstrisinde uygulama alanı bulan bazı enzimler ve özellikleri (Adler-Nissen, 1993).....	13
Çizelge 2.3. Kolajenin sınıflandırılması (Schrieber ve Gareis, 2007).....	17
Çizelge 2.4. Deniz canlılarından elde ediln bazı antioksidan peptidler ve kaynakları.....	23
Çizelge 2.5. Su ürünleri proteinlerinden elde edilen antimikrobiyal peptidlerin kaynağı, amino asit dizilimi veya dizilimde bulunan major amino asit/asitler.....	24
Çizelge 4.1. <i>Holothuria tubulosa</i> 'nın besin kompozisyonu değerleri (%).....	46
Çizelge 4.2. <i>Holothuria tubulosa</i> vücut duvarının amino asit kompozisyonu.....	49
Çizelge 4.3. <i>Holothuria tubulosa</i> vücut duvarının yağ asidi kompozisyonu.....	50
Çizelge 4.4. <i>Holothuria tubulosa</i> 'da tespit edilen mineraller ve miktarları.....	53
Çizelge 4.5. <i>Holothuria tubulosa</i> 'da tespit edilen toksik metaller ve ulusal limit değerleri.....	54
Çizelge 4.6. Farklı deniz canlılarına ait protein ve hidrolizatların fonksiyonel özellikleri.....	71
Çizelge 4.7. <i>Holothuria tubulosa</i> 'nın ekstraktı, vücut sıvısı, proteinleri ile bu proteinlerin hidrolizatlarının ve Amoxycillin-kluvanaik asit antibiyotiğinin antimikrobiyal aktiviteleri.....	85

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Doğal kaynakların etkin kullanımı, ülkelerin endüstriyel alanda teknolojik açıdan ve istihdam alanı yaratması bakımından, kalkınmasına katkı sağlamaktadır. Bu bakımdan, coğrafi şartlar ve iklimin el verdiği ölçüde her ülke, doğal kaynaklarını etkili şekilde kullanma politikasına önem vermektedir. Türkiye 8333 kilometrelik kıyı şeridinde sahip olan coğrafi konumu ile üç adet denize ve iki adet boğaz sistemine hakim, tek ülkedir. Öncelikle turizm olmak üzere denizlerin katkısı, sadece balık ve bazı su ürünleri üretimi ile sınırlı kalmakta, maalesef denizlerimizden yeterli fayda sağlanamamaktadır. Su ürünleri üretimi ise, daha çok avcılık yoluyla gerçekleştirilmekte, yetiştiricilik yolu, yapılan üretime yeterli desteği sağlayamamaktadır. Avcılık üretiminde ise, doğal stokların bilinçsiz şekilde sömürülmesi, olumsuz çevre faaliyetleri (kirlilik, doğa tahribatı, sanayileşme vb.) ve üretilen ürünlerin etkin kullanılmaması sebebiyle su ürünleri sektörünün geleceği risk altında bulunmaktadır.

Ülkemiz denizlerinde su ürünleri üretimi büyük ölçüde balık, kabuklu ve yumuşakçalardan oluşmakta, besin olarak kullanılmayan diğer deniz canlıları ile ilgili bariz bir üretim bulunmamaktadır. Bunlardan biri olan deniz hıyarı ise, avcılığı yapılan ancak ülkemizde tüketimi gerçekleşmediği için yeteri kadar tanınmayan türlerin başında gelmektedir.

Deniz hıyarı, deniz kestanesi ve deniz yıldızı gibi derisidikenliler sınıfına ait bir canlıdır. Özellikle İndo-Pasifik ülkelerin kıyılarında yoğun yayılım gösteren bu canlılar, kıyı sularında ve bentik faunada yaşamakta, ekolojik olarak da doğada büyük görevler üstlenmektedir. Farklı biyoloji ve fizyolojiye sahip olduğu uzun yıllardan beri bilinen deniz hıyarının, kendi organlarını yenileme kabiliyeti, hastalıklara, düşmanlarına ve olumsuz çevre şartlarına dayanıklı olduğu ifade edilmektedir. Bu özelliklerini iyi gözlemlemiş olan Uzakdoğu halkı, bu canlıyı M.Ö. 2. Yüzyıldan beri besin kaynağı ve bir çok hastalıkların tedavisinde ezerek, döverek veya toz haline getirerek şifa amaçlı kullanmışlardır. Bununla birlikte, canlının vücut boşluğunda bulunan ve özellikle mineral ve bazı savunma hücreleri bakımından zengin olan vücut sıvısını, geçmişte açık denizde uzun süre kalan Uzakdoğulu balıkçıların, bir serum gibi hayati vücut kondüsyonlarını geri kazanmak amacıyla tükettikleri ifade edilmektedir (Hawa ve ark., 1999).

Günümüzde ise deniz hıyarları artık işlenmiş gıda olarak tüketime sunulmakta, bunun yanı sıra, krem, sabun, tonik, ekstrakt veya gıda takviyesi olarak da kullanılmaktadır.

sunulmaktadır. Deniz hıyarlarının tedavi edici özellikleri son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarla da teyit edilmiş, bu canlının gerçekten bir çok hastalığın tedavisinde kullanılabilir etken madde veya benzerlerini ihtiva ettiği ortaya konulmuştur. Hatta AIDS ve kanser gibi bazı hastalıkların da tedavisinde kullanılabilir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu canlı, çoğu Uzakdoğu ülkesinde balıktan daha fazla değer görmüş, avcılığın yanı sıra yüksek miktardaki talebi karşılamak amacıyla 1970'lerden beri devlet teşvikli yetiştiricilik faaliyetleri başlatılmıştır. Bugün, üretimi yapılan deniz hıyarları, bir çok ülkeden ithal edilen türlerle birlikte yüksek katma değerli ürünlere dönüştürülerek tekrar piyasaya sürülmektedir.

Ekonomik değeri yüksek olan bu canlının, kullanım alanları araştırılarak ülkemizde sektöre tanıtılması gerekmektedir. Bu bağlamda yapılan bu tez çalışması, ülkemiz denizlerinde yaygın bulunan tür olan *Holothuria tubulosa*'nın etkin kullanımını sağlamak amacıyla tasarlanmıştır. Bunun için öncelikle besin olarak niteliklerinin belirlenmesine çalışılmış, sonrasında ise; canlının sahip olduğu proteinin, fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. *H. tubulosa*'nın besin kompozisyonu, makro ve mikro besin bileşenleri ile analiz edilmiş, yanı sıra besin bileşenlerinin mevsimsel değişimi de tespit edilmeye çalışılmıştır. *H. tubulosa*'nın fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri ise, üç farklı vücut kısmından; vücut sıvısı, vücut duvarı ve iç organların ekstraksiyon, protein izolasyonu ve hidrolizasyonu sonrasında elde edilen numunelerde belirlenmeye çalışılmıştır. Fonksiyonel özellikler; çözünürlük, nem çekme-tutma, emülsiyon ve köpük özellikleri ile, biyoaktif özellikler ise, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite özellikleri ile araştırılmıştır.

## BÖLÜM 2

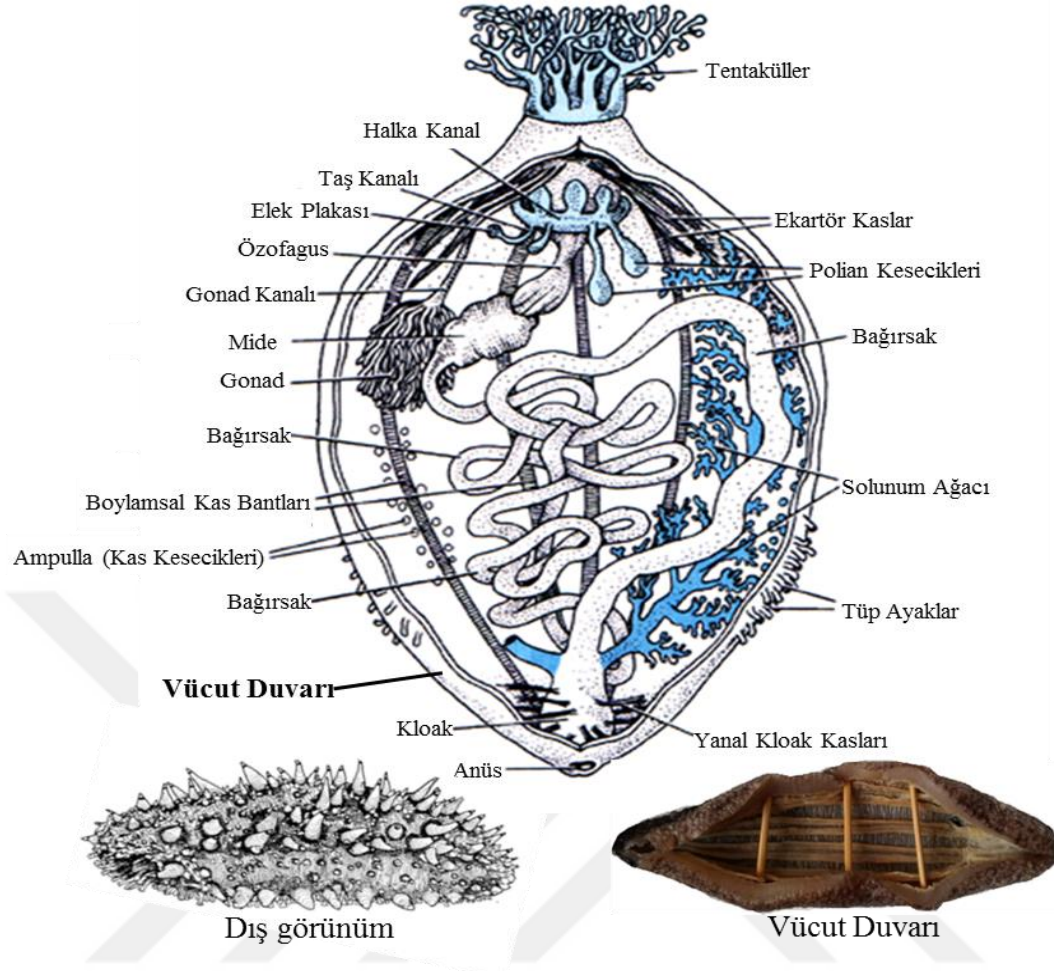
### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

#### 2.1. Deniz Hıyarları (Holothuroidea)

Deniz hıyarları, deniz diplerinde yaşayan omurgasız hayvanlardır. Holothuroidea sınıfı Echinodermata filumuna ait olan bu canlıların, 1500 türe sahip olduğu ve dünyada geniş bir yayılım alanı bulunduğu bildirilmektedir (Ridzuan 1993; Higgins, 2000; Conand, 2004; Ilias 2010). Özellikle Hint, Atlantik ve Pasifik Okyanuslarının ekvatora yakın olan kısımlarında yoğun bir yayılım gösteren bu canlılar 1-100 metre derinliklere kadar olan kum, çamur, çakıl ve *Posedonia oceanica* gibi deniz çayırlarında yaşamaktadırlar (Tortonese ve Vadon 1987; Koukkouras ve ark., 2007; Purcell ve ark., 2012).

Genel olarak yumuşak, ince silindirik yapıda vücuda sahip olan deniz hıyarları, bir ağız, bir anüs ve tüp ayaklardan (podium) oluşmaktadır (Şekil 2.1). Tam bir sindirim sistemi, merkezi sinir sistemi ve basit üreme sistemleri bulunan bu canlıların, türden türe değişmekle beraber cinsi olgunluğa 11 cm'den sonra ve farklı mevsimlerde ulaştığı bildirilmektedir (Purcell ve ark., 2012). Üremeleri, dış döllenme yoluyla, sperm ve yumurtaların su ortamına salınarak döllenmesi ile gerçekleşmektedir (Conand, 1981; Purcell ve ark., 2012).

Deniz hıyarları dip yapıda bulunan detritus ile ve su kolonunda bulunan planktonlarla beslenmektedir (Kazanidis ve ark., 2010; Fankboner, 1978; Cameron ve Fankboner, 1984). Plankton süzme işlemini ağız kısmında bulunan tentaküller vasıtasıyla gerçekleştirmektedir (Fankboner, 1978). Dip yapıdaki detritusla beslenme özellikleri nedeniyle bu canlılar ekolojik dengenin sürdürülmesinde büyük bir rol oynadıkları bilinmektedir.



Şekil 2.1. Deniz hıyarı biyolojisi (Anonim, 2016a)

### 2.1.1. Üretimi ve ticareti

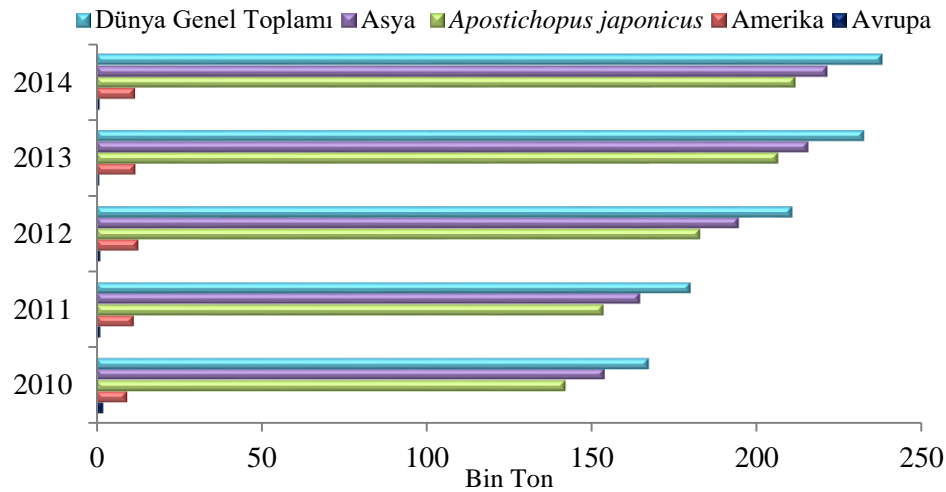
Deniz hıyarlarının bilinen 1500 türünden yaklaşık olarak 30 - 40 türünün ekonomik değeri olduğu belirtilmektedir (Conand, 1990). Bu türler arasında ilk sırada Japon deniz hıyarı *Apostichopus japonicus* gelmekte, bunu sırasıyla *Actinopyga mauritiana*, *Holothuria scabra*, *Parastichopus californicus*, *Cucumaria frondosa*, ve *Thelenota ananas* takip etmektedir.

Deniz hıyarının, Sri Lanka, Endonezya ve Kore başta olmak üzere Asya ülkelerinde ve son zamanlarda Amerika ve Afrika ülkelerinde üretimi yoğun olarak yapılmaktadır. FAO verilerine göre avcılık ve yetiştiricilik ile yapılan 238 bin ton üretimin 221 bin tonluk kısmı Asya ülkelerinde gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.2). Dünya genelinde yetiştiricilik yoluyla yapılan deniz hıyarı üretimi 202 bin ton olup, % 99'unun yine Asya ülkelerinde, daha çok Çin ve Endonezya da yapıldığı belirtilmektedir (FAO, 2016).

Bu canlıya ait yetiştiricilik faaliyetleri ilk olarak 1980'li yıllarda Çin'de başlamış,

yakın ülkelerin kıyusal alanlarında artarak devam etmiştir. Genellikle 2-6 hektarlık su alanlarında, 1,5 - 2,5 metre derinlik ve ‰ 25-35 tuzluluğa sahip temiz sularda üretimi gerçekleştirilen deniz hıyarı, yetiştiricilik faaliyetlerinde kullanılan su sıcaklığı, mevsime göre değişmekle beraber, genel olarak 10-25°C aralığındadır (Yaging ve ark., 2004). Yavru üretiminde, döllenmiş yumurtalar kuluçkalandıktan sonra 2 cm boya ulaştıklarında yetiştirme alanlarına transfer edilmektedir. Hıyarların stok yoğunluğu genellikle hektara 100-150 bin birey olacak şekilde ayarlanmakta, yaklaşık olarak bir yıl sonra hasat boyuna gelen bireyler, dalgıçlar veya gölcüklerdeki ağ kaldırma/drenaj sistemi ile hasat edilmektedir (Yaging ve ark., 2004).

Deniz hıyarı türlerinin 2014 yılı itibarıyla dünya ticaret hacmi yaklaşık 61 552 ton olup, 704 milyon Amerikan doları (USD)'na karşılık gelmektedir (FAO, 2016). En fazla rağbet gören kurutulmuş “bech-de-mer” ürününün, boyut ve kaliteye bağlı olarak fiyatı, 385 Amerikan Doları (USD)/kg'a kadar çıkabilmektedir (Purcell, 2014). Asya ülkeleri, ticaret hacmine sahip en önemli ülkelerdir ve 61 bin ton ithalat ve ihracat miktarının 41 bin tonu bu ülkelerde gerçekleşmektedir. Buna ek olarak Amerika 12 bin ton, Avrupa ülkeleri 4 bin ton ve Afrika ülkeleri ise 3 bin ton ticaret hacmi ile piyasada yer almaktadır (FAO, 2016).



Şekil 2.2. Dünya deniz hıyarı üretiminin kıtalara göre dağılımı ve en çok üretilen tür olan *Apostichopus japonicus*'un üretimdeki payı

Ülkemiz denizlerinde, Holothuria familyasına ait 22 adet deniz hıyarı türü bulunmaktadır (Öztoprak ve ark., 2014). Bu türler arasında *Holothuria mammata*, *Holothuria tubulosa* ve *Holothuria poli* türleri ekonomik değeri olan türlerdir (Aydın ve

ark., 2014). Deniz hıyarı yetiştiriciliği ülkemizde henüz bulunmamakta, avcılığı ise yönetmelikte belirtilen üretim alanlarından 1 Haziran – 31 Ekim tarihleri haricinde toplama usulü yapılabilmektedir. Yasal üretim alanları yönetmelikte; Ege Denizi'nde İzmir-Çeşme Karaabdullah Burnu ile Balıkesir-Ayvalık Eğribucak Burnu arasında ve Akdeniz'de Mersin Anamur Burnu ile Seyhan Nehri'nin denize döküldüğü yer arası olarak belirtilmiştir (Anonim, 2016b). Toplanan deniz hıyarları su ürünleri işleme fabrikalarında kaynatılıp kurutularak yada dondurularak ticarete hazır hale getirilmekte, elde edilen ürünler genellikle Güney Kore, Çin, Japonya ve bazı Avrupa ülkelerine ihraç edilmektedir.

### **2.1.2. Besinsel Özelliği**

Deniz hıyarları çok uzun yıllardan beri besin olarak kullanılan canlılardır. Doymamış yağ asitleri ve tüm esansiyel amino asitleri bünyesinde bulundurması bu canlıları, sağlıklı gıdalar kategorisine taşımaktadır (Chen, 2003). Yenilebilir kısmı olan vücut duvarı, büyük oranda proteinden oluşmakta yağ içeriği oldukça düşük düzeylerde bulunmaktadır (Wen ve ark., 2010). Deniz hıyarlarında su miktarı % 70 - 90, protein % 7-15, yağ % 2 - 3, kül miktarı ise %7-9 aralığındadır (Özer ve ark., 2004; Chen, 2004; Wen ve ark., 2010; Sicuro ve ark., 2012). Genellikle işlenerek tüketime sunulan deniz hıyarlarının, taze tüketimine nadir rastlanmaktadır. Geleneksel işleciliğinde, büyük oranda kurutma tekniği kullanılmakta (ürün adı bech-de-mer, trepang, hai-som) (Chen, 2003), işlenen ürünler çorbadan salataya kadar değişik şekillerde tüketilebilmektedir.

Deniz hıyarı proteini günlük besin ihtiyacı açısından düşünüldüğünde, tüm amino asitleri ihtiva etmektedir (Chen, 2004). Toplam amino asit içeriğinde (7-12g/100g), glisin, yaklaşık % 10'luk bir oranla dominant amino asit olarak göze çarpmakta, glisini, glutamik asit, aspartik asit gibi esansiyel olmayan amino asitler takip etmektedir (Sicuro ve ark., 2012; Wen ve ark., 2010). Esansiyel amino asitler arasında ise lizin ve arjinin düşük miktarlarda, treonin ve valin baskın asitler olarak göze çarpmaktadır (Sicuro ve ark., 2012). Deniz hıyarlarının vücut duvarı, kolajen bakımından zengin olup (Trotter ve ark., 1994; Saito ve ark., 2002), içerdiği yüksek triptofan seviyesi sayesinde, bu canlıdan elde edilen kolajen ve kolajen türevi jelatinlerin, diğer canlılardan elde edilenlere göre daha değerli olduğu bildirilmektedir (Chen, 2004).

Deniz hıyarı sahip olduğu düşük yağ muhtevisinde, doymuş ve doymamış yağ asitlerini içermekte, doymuş yağ asitlerinin oranı % 14 - 17 arasında iken, doymamış yağ asitlerinin ise % 66 - 76 değerleri arasında olduğu ifade edilmektedir (Sicuro ve ark., 2012; Aydın ve ark., 2014). Doymuş yağ asitleri arasında dominant asitler sırasıyla palmitik (% 3

- 8) - steraik (% 3 - 9), miristik (% 1 - 3) ve behenik asit (% 1 - 3), doymamış yağ asitlerinde ise linolenik asit (%8-10), araşidonik asit (% 12 - 20) eikopentaenoik asit (% 6 - 15) ve dokosaheksaenoik asit (%5 -12) sayılmaktadır (Sicuro ve ark., 2012; Bechtel ve ark., 2013; Aydın ve ark., 2014).



Şekil 2.3. Beche-de-mer olarak işlenmiş ve tüketime sunulan deniz hıyarları (Anomim, 2014; Sze, 2004)

Mineral madde içeriği açısından ise oldukça zengin olan deniz hıyarlarında en çok bulunan makro mineraller; sodyum (25 - 153 g/kg), klor (36 - 251 g/kg), kalsiyum (15 - 68 g/kg), magnezyum (4 - 8,6 g/kg) ve potasyum (1,1 - 5,2 g/kg) iken, mikro mineraller demir (41 - 660 mg/kg), çinko (11 - 100 mg/kg), bakır (3 - 74 g/kg), manganez (1 - 16 mg/kg), selenyum (1 - 4 mg/kg), krom (1-10 mg/kg) ve nikel (0,3 – 5 mg/kg) olarak ifade edilmektedir (Ridzuan, 1993; Chen, 2004; Wen ve Hu, 2010). Bununla birlikte, toksik elementlerden arsenik, kadmiyum ve kurşun, tüm bentik deniz canlılarında olduğu gibi deniz hıyarlarında da bulunabilmektedir. Sicuro ve ark. (2012) *H. tubulosa* türü ile yaptıkları çalışmada, bu elementlerin genel olarak iz miktarlarda göze çarptığını ancak, arseniğin 22 mg/kg konsantrasyonlarına kadar birikim yaptığını belirtmişlerdir.

### 2.1.3. Farmakolojik ve tedavi edici özelliği

Deniz hıyarının medikal değeri hakkındaki bilgiler oldukça eskilere dayanmaktadır. Bu canlıların kendi vücutlarında oluşan kesik ve yaraları hızlı tamir edebilme kabiliyeti bu canlıların geleneksel olarak şifa amaçlı kullanımının yolunu açmıştır (Fredalina ve ark., 1999). Çin’de, deniz hıyarlarının ginseng, köpekbalığı yüzgeci, kuş göğsü, tırtıl mantarı gibi tonik amaçlı tüketildiği, ginseng etkisine benzer etkileri nedeniyle, Çinlilerin bu canlıya kabaca “denizin ginsengi” adını verdikleri bildirilmektedir (Bruckner ve ark., 2003; Chen, 2003). Günümüzde ise, bir çok ülkede deniz hıyarlarından elde edilen



bileşikler ticari ürün olarak üretilmekte ve çeşitli tedavilerde kullanmak amacıyla piyasada satışa sunulmaktadır.

Bilim adamları çeşitli çalışmalarla, deniz hıyarı ekstraktlarının antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antitümör, antianjiyogenik ve antikoagülant özellikleri olduğu konusunda tespitler yapmışlardır (Hawa ve ark., 1999; Ridzwan ve ark., 2003; Mamelona ve ark., 2007; Althunibat ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2010). Deniz hıyarları mukopolisakkaritler bakımından, özellikle de kondritin sülfat açısından oldukça zengindir (Zhong ve ark., 2007). Kondritin sülfat, eklem ağrılarını hafifletici/iyileştirici özellik göstermekte, dahası romatizmal-artrit, kas-iskelet yapısında yangısal hastalıkların, osteoartrit, omurgada görülen ankylosing spondylitis gibi hastalıkların tedavisinde fayda sağlamaktadır (Chen, 2004; Zhong ve ark., 2007). Ayrıca kondritin sülfat bileşiğinin, HIV virüsünün neden olduğu insan bağışıklık sistemi yetmezliği hastalığında da (AIDS) tedavi amaçlı kullanılabileceği bildirilmektedir (Conand, 2004).

Proteinin yapısındaki düşük lisin-arjinin oranının hipo kolestromik etkisi nedeniyle serum ve aortadaki kolesterol seviyesini düşürdüğü bu nedenle hiperlipidemiden rahatsız olanlar için ideal tonik yiyecek olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir (Sugano ve ark., 1984; Rajamohan ve Kurup, 1997; Wen ve ark., 2010). Bundan dolayı, *Stichopus hermannii* türü, Malezya'da hipertansiyon hastalarının tedavisinde geleneksel olarak kullanılmakta (Fredalina ve ark., 1999), yine *S. hermannii*'den ekstrakte edilen eikosapentaeonik asit (C20:5) (EPA) ve dokosaheksanoik asit (C22:6) DHA yağ asitlerinin de bu bağlamda kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine kullanılabileceği ifade edilmektedir (Fredalina ve ark., 1999; Ridzwan, 2007).

## 2.2. Proteinler ve Genel Özellikleri

Proteinler, peptid bağları ile kovalent olarak birbirine bağlanmış amino asit polimerleridir. Genel olarak karbon, hidrojen, oksijen, azot ve kükürt içeren aminoasitlerden oluşan bu makromoleküller, birçok hücrenin kuru ağırlığının % 50'den fazlasını oluşturmakta ve organizmaların yaptığı her işte görev almaktadır (Campbell ve Reece, 2002).

Proteinler yapı ve özellik bakımından sınırsız denilebilecek kadar çeşide sahiptirler. Yapılarındaki farklılık, kullanılan 20 amino asidin farklı kombinasyonlarda peptid bağları ile birbirine eklenerek dizilimi ile gerçekleşmektedir. Proteinlerin oluşumu sırasında birbirine eklenen amino asitlerin yan zincirlerinde yer alan fonksiyonel grupların (R) kimyasal yapısı ve zincirdeki diğer aminoasitler ile oluşturdukları kimyasal bağlar

proteinin kendine has konformasyonunu oluşturmaktadır.

Tüm proteinler şekilleri, yapıları ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılmıştır. Şekillerine göre globüler ve fibriller olmak üzere ikiye ayrılmakta; globüler proteinler (miyoglobın vb.), genel olarak suda çözünebilir proteinler, fibriller proteinler (kolajen vb.) ise hemen hemen suda hiç çözünmeyen proteinlerdir. Proteinler yapısal bakımdan da basit proteinler (albümin, globülin) ve konjuge proteinler (glikoproteinler, lipoproteinler) olmak üzere yine ikiye ayrılmaktadır. Biyolojik fonksiyonlarına göre ise proteinler; yapısal proteinler, depo proteinler, taşıyıcı proteinler, hormon proteinleri, kasılma (kontraktıl) proteinleri, savunma proteinleri ve enzim proteinleri şeklinde ayrılmaktadır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Fonksiyonlarına göre proteinlerin sınıflandırılması (Campbell ve Reece, 2002)

Protein Tipi	Fonksiyon	Örnek
Yapısal Proteinler	Destek	Keratin, Fibroin, Kolajen, Elastin, deri, kıkırdak, saç, tırnak
Depo Proteinler	İyon, molekül depolaması	Ovalbumin, miyoglobın, ferritin
Taşıyıcı Proteinler	Diğer bileşiklerin taşınması	Hemoglobın demir ve oksijen taşınması
Hormon Proteinleri	Organizmanın aktivitelerini organize etmek	İnsülin, kan glukoz seviyesi ayarlaması, glukogon glikojenin yıkılması, oksitosin, uterus kasının kasılması
Kasılma (Kontraktıl) Proteinleri	Hareket	Aktin ve miyozin, kas hareketleri, sil, flagella hareketleri
Savunma Proteinleri	Hastalık ve etkenlerine karşı savunma	Antikorlar, bakteri ve virüslere etki eder
Enzim Proteinleri	Kimyasal tepkimeleri hızlandırmak	Sindirim enzimleri (pepsin, tripsin) besinlerdeki polimerlerin hidrolizini katalizler

### 2.2.1. Su Ürünleri Proteinleri

Su ürünleri proteinleri genel anlamda üç başlık altında incelenmektedir; i) Miyofibriller proteinler; toplam protein içeriğinin %50-80'ini oluşturmaktadır. Bu proteinler büyük ölçüde kasılma proteinleri olarak adlandırılan, miyozin, aktin, tropomiyozin ve troponin (C, I ve T)'den oluşmaktadır (Shahidi, 1994; Ninan, 2003). ii) Sarkoplazmik proteinler; %20-30 oranında en fazla bulunan ikinci protein gurubudur. Bu proteinler, hemoglobın, miyoglobın, parvalbumin ve calmodulin gibi depolama-taşıma görevlerinde yer alan en az 500 farklı protein türünü ihtiva etmektedir. Su ürünlerinde bulunan enzimler de büyük ölçüde bu protein sınıfında yer almaktadır (Ninan, 2003;

Lanier ve ark., 2003). iii) Stroma proteinler; bu proteinler canlının türüne göre değişmekle beraber genel olarak toplam proteinlerin % 3-20'sini oluşturmaktadır. Yapısal proteinlerin bulunduğu bu protein grubu büyük ölçüde kolajenden oluşmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000; Shahidi, 1994; Xiong, 2004).

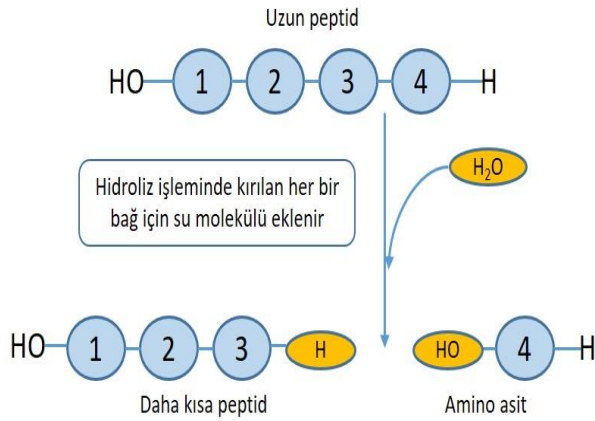
Su ürünlerindeki protein çeşidi, türlere göre çok değişken olabilmektedir. Örneğin pelajik balıklarda miyofibriller proteinler % 50 üzerinde bulunurken, stroma proteinler toplam proteinin ez fazla % 10 kadarını oluşturmaktadır. Özellikle kemikli balıklarda bu oran % 3'e kadar düşmektedir. Yumuşakçalarda ise, kolajen miktarı % 11-15 civarında olup, balıklardan daha fazla bulunabilmektedir (Kolodziejska ve ark., 1987). Önemli bir yumuşakça türü olan kalamarda miyofibriller proteinlerden paramiyozin ve aktinin oluşturdukları coil yapı (toplam proteinin %51-58'i), kolajen (%11) ile desteklenerek, birkaç katman halinde bu canlının kendine özgü olan manto yapısını ve toplam proteinin büyük kısmını oluşturmaktadır (Thanonkaew ve ark., 2006). Aynı şekilde ahtapot ve sübye gibi canlılarda benzer yapı bulunmakta, ancak mantonun renk değişimi söz konusu olduğunda sarkoplazmik proteinler de (%30'den fazlası) bu yapılarda yer almaktadır. Kabuklu su ürünlerinde ise, kitin destekli hareket kabiliyeti olmasından dolayı, kas ve destek proteinleri balık ve yumuşakçalara göre daha az, sarkoplazmik proteinler ise daha fazla bulunmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000; Benjakul ve Sutthipan, 2009; Belitz ve ark., 2009). Bu canlılarda miyofibriller protein miktarı adüktör kasların miktarı ile alakalı olup, paramiyozin, miyozin ve aktinden oluşan miyofibriller proteinlerin miktarı % 5-10, bisus iplikleri, operkulum ve ayakçıklarda yoğunlaşan kolajen miktarı ise % 8-10 oranında bulunmaktadır (Watabe ve ark., 1986; Benjakul ve Sutthipan, 2009). Bu oranlar, canlı içinde farklı organlarda da değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin yapılan bir çalışma da, sert ve yumuşak kabuklu yengeç türlerindeki sarkoplazmik proteinler, miyofibriller proteinlerin yaklaşık üç katı kadar fazla miktarda bulunmuş olup, sarkoplazmik proteinlerin kaslardaki miktarının %78 oranına ulaştığı, kısıkaçlarda ise % 44 seviyelerinde olduğu rapor edilmiştir (Benjakul ve Sutthipan, 2009). Başka bir çalışmada ise bir midye türünün (*Paphia undulate*) protein içeriğinin % 45 miyofibriller protein, %31 sarkoplazmik protein ve % 20 stroma proteinlerden oluştuğu rapor edilmiştir (He ve ark., 2013). Derisidikenlilerde bulunan proteinlerin dağılımı ise diğer su canlılarına göre daha çok varyasyona sahiptir. Örneğin, deniz kestanesi ve deniz yıldızı gibi sert kabukları bulunan derisidikenlilerde miyofibriller ve stroma proteinler düşük miktarlarda bulunmaktadır. Bunların yerine, karbohidrat ve minerallerin spesifik olarak bulunduğu proteinler kabuk kısımlarında yer alırken, vücut ağırlığının %10'u kadar olan gonadlarda sarkoplazmik

proteinler yüksek miktarda bulunmaktadır (Ameye ve ark., 2001; Brooks and Wessel, 2002). Deniz hıyarları ise diğer deniz canlılarının genelinden farklı olarak yüksek miktarda kolajen içermektedir. Deniz hıyarlarının vücut duvarlarında bulunan proteinlerin %70'i kolajenden oluşmakta, geriye kalan %30'luk kısımda ise miyofibriller proteinlerden, paramiyozin, miyozin, aktin ve bazı sarkoplazmik proteinler bulunmaktadır (Mourão ve ark., 1996; Saito ve ark., 2002; Wu ve ark., 2013)

## 2.2.2. Proteinlerin Hidrolizasyonu ve Ekstraksiyonu

### 2.2.2.1. Protein Hidrolizasyonu

Protein hidrolizi, proteini oluşturan amino asit ve peptidlerin aralarında bulunan peptid bağlarının su girişi ile kırılması işlemine denilmektedir. Protein hidrolizasyonu, kimyasal ve biyokimyasal olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Kimyasal olarak, asidik veya alkali, biyokimyasal olarak ise, enzimatik yollar ile proteinler hidrolize edilebilmektedir.



Şekil 2.4. Proteinlerin parçalarına ayrışmasından sorumlu hidroliz işlemi (Campbell ve Reece, 2002)

*Asidik hidrolizasyon*; Proteinlerin asidik hidrolizasyonu derişik asit çözeltileri ile gerçekleştirilmektedir. Geleneksel olarak asidik hidrolizasyonda, hidroklorik asit (HCl) kullanılmakta bunun yanında sülfirik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), propionik asit (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) ve asetik asit (CH<sub>3</sub>COOH) de kullanılabilir. İşlem, protein substratının 110°C'de 6 M HCl içinde 20-24 saat boyunca bekletilmesi ile gerçekleştirilmektedir (Hirs ve ark., 1954; Blackburn, 1978). Asidik hidrolizasyon genel olarak laboratuvar ortamında proteinlerin amino asit dizilerinin belirlenmesinde veya atıkların geri dönüşüm niteliğinde gübre olarak

değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000). Gıda ve diğer endüstrilerde asidik hidrolizasyonun kullanımı çok yaygın değildir. Bunun nedeni, en başta bazı amino asitlerin tamamen yıkılması, asidik çözeltinin tamamen uzaklaştırılmasındaki güçlük ve elde edilen hidrolizatın duyuşsal olarak (tat ve koku) kötü kalitede olması şeklinde ifade edilmektedir. Örneğın triptofan tamamen, tirozin kısmen yıkılmırken, sistein ve serin aminoasitleri ise büyük ölçüde kayıplar vermektedir. Bu şekilde asidik hidroliz işleminde gerçekleşen kayıpların %5-10 olduğu belirtilmektedir (Ozols, 1990).

*Alkali hidrolizasyon;* Alkali hidrolizasyonu derişik bazik çözeltiler ile gerçekleştirilmektedir. Özellikle protein substratının fazla miktarda karbohidrat içerdđi ve farmakolojik protein solüsyonlarında monosakkaritlerin bulunması durumunda yaygın olarak kullanılan alkali hidrolizasyonu, genel olarak sodyum hidroksit (NaOH), potasyum hidroksit (KOH) ve nadir olarak baryum hidroksit (BaOH) ile gerçekleştirilmektedir (Blackburn, 1983; Fountoulakis ve Lahm, 1998). Alkali hidrolizasyonu, genellikle nükleik asit çalışmalarında (McIntyre ve Stark, 1988; Kim ve Lidstorm, 1989) ve ilgi duyulan moleküllerin serbest bırakılması için substratta yer alan diğer safsızlıkların (karbohidrat, yağ vb.) elimine edilmesi amacıyla tercih edilmektedir. Alkali hidrolizasyonda asidik hidrolizasyonda ki gibi triptofan tamamen yıkılmıyorsa da, % 10 gibi çok düşük miktarda geri kazanımı elde edilmektedir. Bununla birlikte alkali hidrolizasyonun en büyük dezavantajı; serin, treonin, arjinin ve sisteinin tamamen yok olması (Fountoulakis ve Lahm, 1998), lisinoalanin yada lanthionin gibi alışık olunmayan aminoasit rezidülerinin oluşmasıdır (Provansal ve ark., 1975). Özellikle bu rezidüler nedeniyle, gıda ve diğer endüstrilerde alkali hidrolizatlarının kullanımı pek yaygın değildir.

*Enzimatik Hidrolizasyon;* Enzimatik protein hidrolizasyonu arzu edilen peptidlerin ve karakteristik amino asitlerin elde edilmesi amacıyla, genellikle spesifik proteaz enzimleri ile gerçekleştirilen hidrolizasyon işlemidir. Asidik ve alkali hidrolizasyona göre kayıpların yaşanmaması ve hidrolizasyon sonrası lisinoalanin gibi istenmeyen rezidülerin olmaması, elde edilen hidrolizatın doğal içerikte olmasından dolayı önemli bir avantaja sahip olan enzimatik hidrolizasyon, gıda ve diğer endüstrilerde sıklıkla tercih edilmektedir. Diğer taraftan asidik ve alkali hidrolizasyonda kolayca ayarlanan hidrolizasyon şartları, enzimatik hidrolizasyonda kullanılan enzimin optimum çalışma koşullarının ayarlanması açısından biraz daha ayrıntılı uygulamalar içeren bir işlemdir.

Enzimatik hidroliz genellikle, proteinlerin fonksiyonel ve besleyici özelliklerinin üst düzeyde ortaya çıkarılması amacıyla kullanılmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000). Bu işlemin arzu edilen şekilde gerçekleşebilmesi için, kullanılan enzimin çalışmasında

optimum pH, sıcaklık ve substrat-enzim oranının sağlanması gerekmektedir. Enzimatik hidrolizasyon sonrasında elde edilen hidrolizatların amino asit kompozisyonları başlangıç substratına benzer şekilde kalmaktadır (Clemente ve ark., 1999). Bunun yanında, enzimatik hidrolizasyon sonrası elde edilen protein hidrolizatları, artan çözünürlük, ısı dayanıklılığı ve bir çok faktörün (pH, metal iyonları vb.) etkisiyle gerçekleşebilecek çökelmelere karşı daha dirençli hale gelmekte ve dolayısıyla, ürünün endüstriyel kullanımını mümkün kılmaktadır (Fox ve ark., 1982).

Enzimatik protein hidrolizasyonları, proteinaz enzimleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Proteinazlar elde edildiği kaynaklara (hayvan, bitki, mikroorganizma), katalitik aksiyonlarına (endoproteinaz, eksoproteinaz) ve katalize ettiği bölgenin doğasına göre sınıflandırılmaktadır. Gıda endüstrisinde uygulamalarda yer bulan bazı enzimler, bu enzimlerin kaynakları ve hidrolizasyon özellikleri Çizelge 2.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. Gıda endüstrisinde uygulama alanı bulan bazı enzimler ve özellikleri (Adler-Nissen, 1993)

Proteaz Tipi	Kaynağı	Genel ve Ticari Adı	Optimum pH aralığı	Öncelikli Spesifikliği
Serin Proteazlar	Sığır / domuz pankreası	Tripsin	pH 7-9	Lisin-, Arj-COOH
		Kimotripsin	pH 8-9	Fenilalanin-, Tirozin, Triptofan-COOH
	<i>Bacillus</i> sp.	Alkalaz	pH 6-10	Geniş aralık, hidrofobik-COOH
Sistein Proteazlar	<i>Papaya latex</i>	Papain	pH5-8	Geniş aralık, hidrofobik-COOH
	<i>Pineapple stem</i>	Bromelain	pH 5-8	Geniş aralık, hidrofobik-COOH
Aspartik Proteazlar	Sığır/domuz	Pepsin	pH 1-4	Genellikle hidrofobik-COOH ve NH <sub>2</sub>
Metalloproteaz	<i>Bacillus</i> sp.	Nötraz	pH 6-8	Lösin-, Fenilalanin-NH <sub>2</sub>

Proteolitik enzimler hidrolizasyon mekanizmasına göre endopeptidaz ve eksoproteaz olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Clemente, 2000). Endopeptidazlar, proteindeki peptid bağlarını görece olarak büyük peptidler oluşturacak şekilde rastgele veya öncelikli spesifikli bölgelerden parçalamakta iken, eksoproteazlar peptid zincirlerinin N ve C terminallerindeki amino asitleri koparmak suretiyle hidrolizasyonu gerçekleştirmektedir (Clemente, 2000). Proteinlerin hidrolizasyonunda bu enzim grupları tek başlarına kullanılabileceği gibi kombin olarak da kullanılabilir. Burada önemli olan

proteazların aktif bölgeleri ve elde edilecek hidrolizatın hangi özelliklerde olması istendiğidir. Kullanılan proteaz enzimlerinin aktif bölgeleri, substratların nasıl bağlanacağını ifade etmekte ve bu da enzimin spesifikliğı olarak ifade edilmektedir (Hedstrom, 2010). Her enzimin aktif olduğı bölge farklı amino asitler ile eşleşmekte, dolayısıyla elde edilen hidrolizat içerisinde bulunan hidrolize peptid parçalarının hangi rezidüler bakımından zengin olduğı da tahmin edilebilmektedir (Tavano, 2013). Bu şekilde arzu edilen hidrolizat muhteviyetına göre kullanılacak enzim için en uygun seçim yapılmaktadır.

*Enzimatik hidrolizasyonu etkileyen faktörler;* Proteinlerin enzimatik hidrolizasyonu, doğrudan enzim aktivitesini etkileyen faktörlere bağılı olup, verimliliğı başlıca; substrat, pH, sıcaklık, enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve süreden etkilemektedir (Gözükara, 1994). Bu faktörlerin ayarlanması ile gerçekleştirilen hidrolizasyon işleminin sonunda hidrolizasyon derecesi belirlenmektedir. Hidrolizasyon derecesi basit olarak birim zamanda kırılan peptid bağı sayısının yüzde oranı olarak tanımlanmakta ve hidrolizatlardaki çözünebilen protein ve peptid miktarlarının çeşitli yollarla tespiti sonucu belirlenmektedir (Rutherford, 2010). Hidrolizasyon derecesinin oranına göre, enzim-substrat oranı, sıcaklık ve hidrolizasyon süresi optimum düzeye getirilmektedir.

*pH;* protein hidrolizasyonu amacıyla kullanılan enzimin reaksiyon hızı farklı hidrojen iyonu konsantrasyonuna bağılı olarak değişmektedir. En etkin olduğı pH derecesine optimum pH denilmekte ve optimum pH'dan uzaklaştıldıkça enzim aktivitesi azalarak hidrolizasyon yavaşlamaktadır (Mateo ve ark., 2007). Her proteazın farklı optimum çalışma pH'sı bulunmaktadır (Çizelge 2.2). Enzimlerin etkin halde çalışmasını sağlamak amacıyla optimum pH'ya ayarlanan tamponlar kullanılmaktadır. Bu tamponlar, hidrojen iyonu değişimine dirençli oldukları için hidrolizasyon süresince pH'yı arzu edilen seviyede tutmaktadır (Mateo ve ark., 2007).

*Sıcaklık;* Enzimler de birer protein oldukları için, bazı termofilik organizma enzimleri (Tag polimeraz) haricinde, genel olarak denatüre olmadıkları sıcaklıklarda çalışmaktadır. Hayvansal kaynaklı enzimlerin optimum çalışma sıcaklığı 40 - 50 °C'lerde iken bitkisel kaynaklı enzimlerde sıcaklık 50 - 60 °C'yi bulmaktadır (Gözükara, 1994). Enzim reaksiyon hızı, sıcaklık artışıyla (optimum sıcaklıklara kadar) orantılı artış göstermekte ve genelde 10 °C'lik bir ısı artışıyla enzim çalışma hızınının 1 - 3 misli arttığı ifade edilmektedir (Gözükara, 1994).

*Enzim-Substrat konsantrasyonu;* Protein hidrolizasyonunda kullanılan enzimin yeteri kadar substrata doyurulması, enzim çalışma hızını, dolayısıyla hidrolizasyon derecesini

artırmaktadır (Guerard ve ark., 2001). Substratın fazla olduğu hidrolizasyon işleminde başlangıçta logiritmik artışla hidrolizasyon gerçekleşmekte ancak, enzim substrat doygunluğuna ulaşıldığında ise reaksiyon hızı değişmeden devam etmektedir (Mannheim ve Cheryan, 1990; Geurard ve ark., 2001). Yeteri miktarda substrat veya enzim konsantrasyonu ayarlanamadığı durumlarda ise hidrolizasyon işlemi süreye de bağlı olarak kısmi derecede gerçekleşmektedir (Mannheim ve Cheryan, 1990).

*Süre;* Hidrolizasyon işlemi başlangıcından itibaren enzimler optimum koşullar sağlandığında maksimum reaksiyon hızında çalışmaktadır. Dolayısıyla substrat miktarı yeterli ise, süre arttıkça hidrolizasyon derecesi de artmaktadır (Ovissipour ve ark., 2009). Bir proteinin hidrolize edilmesi için gerekli olan süre, hidrolizasyon derecesine göre belirlenmektedir.

#### **2.2.2.2. Protein ekstraktları**

Protein ekstraktı, proteinlerin hidrolizasyonu haricindeki işlemlerle, doku içerisinde birleşik halde bulunduğu yağlardan, karbohidratlardan ve sudan ayrılması ile elde edilmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000). Bu nedenle genel olarak, su ürünlerinde proteinlerin safsızlıklardan arındırılması veya konsantre edilmesi amacıyla uygulanmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000). Elde edilmesinde, farklı çözücü kimyasallar ile muamele, molekül ağırlığına göre ayrıştırma, asit-baz ile çöktürme, kurutma ve filtreleme gibi işlemlerden faydalanılmaktadır (Dubrow ve ark., 1973; Venugopal ve ark., 1996). Günümüzde, çok çeşitli bitkisel ve hayvansal kaynaklardan protein ekstraktları elde edilebilmekte, su ürünlerinde ise daha çok balık, balık atıkları ve değersiz kabuklular protein ekstraktı amacıyla muamele edilmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000).

Çözücü ekstraksiyonu yönteminde, daha çok etilen diklorit ile birlikte isopropanol ve/veya azeotropik ekstraksiyon kullanılmakta, yağdan arındırma işlemlerinin etkin olduğu bu yöntemde elde edilen protein ekstraktının yüksek biyolojik değere sahip, kokusuz, renksiz ve % 1'den daha az yağ içerdiği ifade edilmektedir (Hale, 1972; Sikorski ve Nacz, 1981). Çözücü ekstraksiyonu ile elde edilen protein ekstraktının, çözünürlüğün az olması ve gıda sistemlerinde düşük emülsiyon aktivitesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Venugopal ve ark., 1996). Bununla beraber yüksek miktarda yağ içeren, sardalya, ringa ve capelin gibi pelajik deniz balıklarından yağ miktarı az olan protein ekstraksiyonu (çözgen) başarılı bir şekilde gerçekleştirilmekte ve tercih edilmektedir (Moorjani ve ark., 1968).

Su ürünlerine uygulanan çözücü ekstraksiyon işlemi, ekstrakt üretiminde



kullanılabildiği gibi, hidrolizasyonda ürün kalitesinin artırılması amacıyla, ön işlem olarak da uygulanabilmektedir. Özellikle yağlı balıkların isopropanol ve absolut ethanol çözümleri ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen ürünün, enzimatik protein hidrolizi için mükemmel bir protein substratı olduğu ifade edilmektedir (Quaglia ve Orban, 1987; Hoyle ve Merritt, 1994). Yani proteinlerin ekstrakte edildikten sonra hidrolize edilmesi ile, oldukça kaliteli ve iyi özelliklere sahip hidrolizatlar elde edilebilmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000). Örneğin balık proteinlerinin fonksiyonel özelliklerinden faydalanılarak üretilen hamburger etlerinde balıksı kokunun mevcut olabildiği (Kristinsson ve Rasco, 2000), hidrolizat öncesi protein ekstraksiyonu yapılması sonucu ise, üründe oluşan balıksı koku ve acılığın giderilebildiği tespit edilmiştir (Hale, 1972; Hoyle ve Merritt, 1994).

Dolayısıyla su ürünlerinde protein ekstraksiyonu, proteinlerin konsantre edilmesi ve proteinin yağ gibi safsızlıklardan arındırılması amacıyla kullanılmakta, aynı zamanda değersiz proteinli ürünlerin spesifik amaçlı değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Proteinlerin fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin araştırılmasında, peptid eldesi için enzimatik hidrolizasyonlara substrat üretimi konusunda da ekstrakt üretiminden faydalanılmaktadır.

### **2.2.2.3. Kolajen ve Hidrolizatları**

Su ürünlerinde ekstrakte edilen en önemli protein türevleri kolajen ve jelatindir. Yapısal protein sınıflandırmasında fibriler protein olarak bilinen kolajen; deri, bağ doku, eklem, kemik, kas, tendon, tırnak, saç gibi dokuların dayanıklılığını ve esnekliğini sağlamaktadır. Omurgalı canlıların % 30 (Lullo ve ark., 2002), deniz hıyarı gibi omurgasız canlılarda ise toplam proteinin %50'den fazlasını oluşturmaktadır (Saito ve ark., 2002). Bugüne kadar 27 farklı tipi tespit edilmiş olan kolajenin omurgalı canlılarda en fazla bulunan türü Tip I (Lullo ve ark., 2002), omurgasızlarda ise Tip I ve II olduğu belirtilmektedir (Çizelge 2.3) (Saito ve ark., 2002; Schrieber ve Gareis, 2007).

Kolajen molekülleri üç adet  $\alpha$ -zincirlerinin iç içe geçmesiyle oluşan triple helix şeklinde üç boyutlu yapıdadır (TE Nijenhuis, 1997). Üç adet  $\alpha$ -zinciri saat yönünün tersine yönelmek suretiyle birbirine dolanarak yaklaşık  $10^5$ kDa moleküler ağırlığında ve 300 nm uzunluğunda bir triple-heliks oluşturmaktadır (Papon ve ark., 2007). Triple heliksler içsel hidrojen bağları ile oldukça stabil durumda bulunmaktadır. Kolajen denatürasyonu hidrojen bağlarının kopmasına neden olarak zincirlerin kısmi yada tam olarak birbirinden ayrılmasına neden olmakta, bu durum triple-heliks konformasyonunun tamamen bozulmasına ve sonrasında denatürasyonun oluşmasına neden olmaktadır.

Çizelge 2.3. Kolajenin Sınıflandırılması (Schrieber ve Gareis, 2007)

<i>Tip</i>	<i>Tanımlama</i>
<i>Tip I</i>	Bu tip genellikle, deri, kemik ve tendon gibi bağ dokularında yaygın bulunur
<i>Tip II</i>	Bu tip kıkırdak pratik olacak sadece kıkırdak dokusunda bulunur
<i>Tip III</i>	Bu tip yaşa bağlı çok genç deri % 50'ye kadar bulunmakta ancak zamanla bağlı olarak % 5 - 10'a kadar azalabilmektedir.
<i>Diğer Tipler</i>	Diğer tip kolajenler çok düşük miktarlarda bulunmakla beraber genellikle bulunduğu organ veya dokuya özgü durumdadır

Kolajenin kısmi hidrolizi ile elde edilen jelatin ise, en çok bilinen kolajen türevi proteindir. Jelatin doğal bulunan bir protein değildir, ancak deri, kemik ve bağ dokularında bulunan kolajenin kısmi hidrolizi ile elde edilebilmektedir. Jelatinin üretiminde kolajenin izole edilmesine gerek kalmadan, dokuların direkt asit ve alkali solüsyonlarla muamele edilmesi ile çapraz bağların kısmi olarak kırılması sonucu jelatin elde edilebilmektedir (Schrieber ve Gareis, 2007). Endüstride kullanılan jelatinler, kolajenlerin bu şekilde denatürasyonu sonucu kırılarak helix yapılarından ayrılan,  $\alpha$ -zincirleri (bir polimer zincir),  $\beta$ -zincirleri (kovalent bağ ile çapraz bağlanmış iki adet  $\alpha$ -zincir) ve  $\gamma$ -zincirleri (kovalent bağ ile çapraz bağlanmış üç adet  $\alpha$ -zinciri)'nin karışımlarından oluşmaktadır (Papon ve ark., 2007).

### **2.3. Proteinlerin Fonksiyonel ve Biyoaktif Özellikleri**

#### **2.3.1. Fonksiyonel Özellikler**

Fonksiyonel özellikler, proteinlerin endüstriyel alanda kullanılabilmesine olanak sağlayan tüketim, depolama, işleme ve hazırlama aşamalarında gıda sistemlerindeki davranışlarını etkileyen fizikokimyasal özellikleri ifade etmektedir (Kindsella, 1979). Fonksiyonel özellikler sadece son ürünlerin kalitesini belirlemede önemli değil, aynı zamanda, pişirme, kesme, dilimleme, paketleme gibi işleme aktivitelerinde önem arz etmektedir (Gildberg, 1993).

Proteinlerin fonksiyonel özellikleri çok çeşitlidir; bunlar, basit hidrasyon, jelleşme ve yüzey karakteristiği ile ilgili özelliklerdir. Basit hidrasyon özellikleri; şişme ve çözünürlük, jelleşme eğilimine bağlı fonksiyonel özellikler; jel oluşturma, kıvamlaşma, tektstüre etme ve su tutma kapasitesi, yüzey özelliklerine göre fonksiyonel özellikleri ise emülsiyon ve

köpük oluşturma, stabilizatör, yapışma, bağ kurma ve film oluşturma özellikleri şeklinde tanımlanmaktadır (Schrieber ve Gareis, 2007).

### **2.3.1.1. Çözünürlük**

Protein çözünürlüğü, özel koşullarda çözünebilen nitrojenin oranı olarak tanımlanmaktadır (Zayas, 1997). Diğer bir ifadeyle, örnek içindeki proteinden solüsyona çözünen protein miktarına çözünürlük denilmektedir. Proteinlerin deneysel veya endüstriyel kullanımı için elde edilme aşamasında çözünürlük düzeyi, genelde kriter olarak ele alınmakta, suda kısmen veya tamamen çözünen proteinler endüstride daha çok tercih edilmektedir (Kinsella, 1979). Diğer taraftan emülsiyon ve köpürme gibi diğer fonksiyonel özelliklerle de direkt alakalı olan çözünürlük, fonksiyonel özellikler arasında en önemli parametre olarak ifade edilmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000).

Protein çözünürlüğüne yapısal olarak, amino asit kompozisyonu ve dizilimi, proteinin molekül ağırlığı ile konformasyonu, polar ve apolar amino grupların içeriği etki etmekte, çevresel faktörlerden ise, iyonik kuvvet, çözücünün tipi, pH, sıcaklık ve işleme özellikleri çözünürlük düzeyinde rol oynamaktadır (Kinsella, 1979; Zayas, 1997). Tüm bu etkenler arasında, protein ve çözücü arasındaki hidrofobik ve iyonik interaksiyonlar çözünürlüğü etkileyen en önemli parametreler olarak bilinmektedir (Krisinsson ve Rasco, 2000). Hidrofobik etkileşimler protein-protein arasında etkili olarak çözünürlüğü düşürmekte, iyonik etkileşimler ise protein-çözücü arasında elektron değişimi ile bağ kurma temeline dayanarak, çözünürlüğü artırmaktadır. Kolajen gibi fibriler proteinlerin çözünürlüğü ise diğer proteinlerden daha zor olmakta, çok geniş pH aralığında dahi oldukça düşük düzeyde çözünürlük gerçekleşmektedir. Bunun için, farklı çözgen kullanımı veya proteinlerin hidrolizasyonu ile de çözünürlüğün artırılması yoluna gidilmektedir.

### **2.3.1.2. Nem Çekme-Tutma Kapasitesi**

Proteinlerin su ile etkileşimleri, su hidrasyonu ve tutması, su bağlama ve su (nem) çekme-tutma gibi terimler kullanılarak incelenmektedir. Bunlar arasında su tutma kapasitesi en fazla bilineni olup basit olarak proteinin suyu fiziksel olarak yerçekimine karşı tutması olarak tanımlanmaktadır (Kinsella, 1979). Gıda sistemlerinde bu özellik genellikle vizkozite ile alakalı olup, pH, iyonik kuvvet ve sıcaklık ile değişim göstermektedir (Kinsella, 1979). Ancak, nem çekme kabiliyeti, kuru proteinin belirli bağlı neme sahip ortamdaki suyun bir kısmını çekerek ortam ve protein arasında dengeye gelmesi olarak tanımlanmakta ve daha çok proteinin molekül özellikleri ile değişmektedir

(Kindsella,1979). Nem tutma ise, suyu bünyesine alan protein örneğinin, aldığı bu suyu belirli ortam koşullarda bünyesinde tutabilme süresi olarak tanımlanmaktadır (Xiong, 2005; Sun ve ark., 2006).

Su ve protein interaksyonu, proteinlerin önemli bir fonksiyonel özelliği olarak kabul görmektedir. Suyun salınmasına karşı gösterilen direnç olan su tutma kapasitesi, gıda endüstrisinde ürünlerin tekstür, renk ve duyuşsal özelliklerine etki etmesinden dolayı önemli bir faktördür (vanLaack ve ark., 1994; Joo ve ark., 1999; Xiong, 2005). Gıdanın, sululuk, yumuşaklık düzeyi ve depolamadaki dayanıklılığının nem tutma özelliği ile alakalı olduğu ifade edilmektedir (Zayas, 1997). Özellikle et endüstrisinde nem tutma özelliği iyi olan bazı kimyasal maddeler (sodyum klorit, sodyum fosfat, sodyum laktat, polisakkarit sakızlar) ve doğal proteinler (buğday ve soya protein ekstraktı) enjekte edilen suyun tutulması amacıyla (Xiong, 2005) ve sporcu içeceklerinde vücut sıvı kaybının önlenmesi amacıyla kullanılabilir (Seifert ve ark., 2006). Su ürünleri kaynaklı nem çekme-tutma kapasitesine sahip olan protein türevleri de mevcuttur. Bunlar arasında, kabuklu su ürünlerinden üretilen Hyalurnic asit, nem çekme-tutma kapasitesinin iyi olması nedeniyle kozmetik sanayinde kullanılan önemli bir örnektir (Sun ve ark., 2006).

### **2.3.1.3. Emülsiyon Özelliği**

Emülsiyon, proteinlerin yağ ile homojenizasyonu sonrasında solüsyon içerisinde oluşan yağ damlalarının, yüzey kısmına absorplanarak bu damlalarının tekrar birleşmesinin önlenmesi olarak tanımlanmaktadır (Demetriades ve ark., 1997). Proteinlerin emülsiyon özelliği yüzey aktif olmaları ile ilgili olup, molekülün yan zincirlerindeki yüklü grupların varlığı ve molekülün hidrofilik veya hidrofobik özelliği ile bunların dizilimine bağlı olarak değişmektedir (Damodaran, 1996). Proteinlerin, hidrofobik kısımları yağ fazında, hidrofilik kısımlar ise su içinde çözünerek aktif olurlar. Dolayısıyla emülsiyon özelliği proteinlerin çözünürlüğü ile doğrudan alakalı olmaktadır. Hidrofobik ve hidrofilik amino asit grupları, yüzey boyunca göç etme eğilimindedir. Bunların hareketlilikleri pH değerine göre de değişiklik gösterebilmektedir. Çözünürlüğü artıran etkenler aynı zamanda emülsiyon özelliğini de artırmakta, bunların başında ise proteinlerin molekül büyüklükleri ve yapısal konformasyonunun bozulması (proteinlerin 3. ve 4. yapısının bozulması) faktörleri gelmektedir (Damodaran, 1996). Bu nedenle gıda sistemlerinde kullanılacak emülsiyon özelliği iyi proteinler arasında, enzimatik hidrolizasyon ile elde edilen hidrolizat ve peptidler tercih edilmektedir.

Yüzey aktif proteinlerde arzu edilen üç özellik vardır. Bunlar; emülsiyon gibi

sistemlerde oluşan arayüzlerde hızla emilmek (yağ-su arasına hızla etkileşime girmek), emildiği arayüzde bulunan molekülleri yönlendirebilmek ve bu arayüze girerek bağlandığı moleküllerden, sıcaklık ve diğer fiziksel etkiler ile kolayca uzaklaşmamak, olarak ifade edilmektedir (Damodaran, 1996; Krisstinsson ve Rasco, 2000). Büyük protein moleküllerine nazaran, polipeptidlerin ve peptidlerin bu arayüzlere girmesi ve girdiği arayüzeyde natürel proteinlere göre daha aktif uçlarının olmasından dolayı, proteinlerin hidrolize formları daha iyi emülsiyon özellik göstermektedir (Damodaran, 1996). Daha küçük peptidler büyük moleküllere göre, oluşan arayüzeylerde hızlı etkileşime girmekte ve emilmektedir. Ancak, bu emilme ve etkileşim daha hızlı bozulabilmektedir (Turgeon ve ark., 1991). Dolayısıyla hidrolizatların, hidrolizasyon derecesinin, en hızlı arayüzey oluşturacak ve en uzun dayanıklılığa sahip peptit oluşumunu sağlayacak şekilde ayarlanması gerektiği ifade edilmektedir (Turgeon ve ark., 1991; Mahmoud, 1994).

#### **2.3.1.4. Köpürme Özelliği**

Proteinlerin stabil köpük oluşturma özellikleri, çeşitli gıdaların üretiminde büyük öneme sahiptir. Köpük, hava kabarcıklarının daimi olarak yapraksı faz olarak tanımlanan ince bir sıvı tabaka ile ayrışmasından oluşan iki fazlı sistem olarak tanımlanmaktadır (Zayas, 1997). Gıda köpükleri genellikle çok kompleks sistemler olup, içeriğinde gaz, sıvı, katı ve sürfaktanların karışımını barındırmaktadır (Kinsella, 1979).

Hava kabarcıklarının boyut dağılımı, köpük ürünlerinin görünüşünü ve tekstürel özelliklerini etkilemektedir. Örneğin küçük hava kabarcıkları, gıdaya parlaklık ve pürüzsüzlük kazandırmakta, büyük hava kabarcıkları ise düşük dayanıklılığa sahip olmasından dolayı duyu kalitenin korunmasında yetersiz kalabilmektedir (Du ve ark., 2003). Endüstride en yaygın kullanılan protein köpük ajanları, yumurta beyazı, jelatin, kazein, diğer süt proteinleri, soya proteinleri ve gluten olarak bilinmektedir (Zayas, 1997).

Köpük oluşumunda üç aşama mevcuttur. Bu aşamaların ilkinde, çözünen proteinler yüzey gerilimini azaltmak için hava-su ortak yüzeyini parçalar, ikinci olarak proteinler kutup kısımlarının suya yönelimiyle arayüzeyden açılır; açılma sonucunda sulu ve sulu olmayan faz gruplarının (hidrofilik-hidrofobik) ayrışmaları gerçekleşir. Üçüncü aşamada ise, polipeptidler kısmi denatürasyon ve koagülasyon ile kabarcıkların üzerinde film tabakası oluşturarak yüzeyi kaplarlar. Daha sonrasında ise proteinler, hızlı oluşan arayüzeyde adsorblanır ve kabarcıklar etrafında sabit film tabakası oluşturarak, proteinlerin köpürme işlemini tamamlamış olurlar (Krisstinsson ve Rasco, 2000).

## 2.3.2. Biyoaktif Özellikler

### 2.3.2.1. Antioksidan Aktivite

Oksidasyon, bir molekül veya atomun, elektron kaybederek ya da kimyasal reaksiyonlara karşı aktif olan serbest radikaller tarafından yükseltgenmesi neticesinde, pozitif yüklü konuma gelmesine denilmektedir. Oksidasyondan sorumlu serbest radikaller, biyolojik sistemde, oksijen, nitrojen ve sülfür moleküllerinden türemekte olup, reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve reaktif sülfür türleri olarak sınıflandırılmaktadır (Lü ve ark., 2010). Serbest oksijen türleri oksidasyondan sorumlu en önemli grup olup, süperoksit anyon ( $O_2^{\cdot-}$ ), perhidroksil radikal ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroksil radikal ( $\cdot OH$ ), nitrik oksit ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi diğer gruplara ayrılmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS) hücre metabolizma ve fonksiyonel aktiviteler sırasında ortaya çıkmakta ve hücre sinyalleşmesi, apoptosis, gen ekspresyonu ve iyon taşınmasında önemli görev üstlenmektedir (Vajragupta ve ark., 2004).

Ancak, reaktif ve küçük molekül yapısında olduklarından aşırı miktarda üretilen ROS'un, proteinler, lipidler, RNA ve DNA gibi moleküllere zararlı etkileri olabilmektedir (Lü ve ark., 2010). ROS, nükleik asit bölgelerine, proteinlerde bulunan aminoasitlerin yan zincirlerine, doymamış yağ asitlerin çift bağ kısımlarına güçlü olumsuz etkiler yapabilmektedir. Reaktif oksijen türlerinin bu şekilde olumsuz etki ettiği makromoleküllere oksidatif stres ismi verilmektedir. Hücreler, normal şartlarda bu reaktif oksijen türlerinin hasarına karşı kendilerini özel bir savunma sistemi ile korumakta, etkilerini düşük seviyede tutmak için hücre içi enzimler kullanmaktadır.

Ancak zamanla, çevresel stres ve hücrelerin fonksiyonelliğini kaybetmesi neticesinde ROS seviyesi artmakta, hücreye ve vücuda önemli zararlar vermektedir. Serbest radikallerin bu kontrolsüz oluşumu sonucunda ise kanser, diyabet, sinir hastalıkları ve doku iltihapları gibi yangılı hastalıklar ortaya çıkabilmektedir (Yang ve ark., 2001; Butterfield ve ark., 2002). Bu nedenle, insan ve diğer canlıların vücutlarında serbest radikallerin hasarını en aza indirmek için, metal şelatlama ve serbest radikal süpürme gibi serbest radikallerin oluşumu sonrası nötralize edici savunma sistemleri oluşmaktadır.

Vücudun radikallere karşı oluşturduğu savunmanın yetersiz kalması durumunda ise vücuda dışarıdan antioksidan alınması ile antioksidan dengenin korunması sağlanabilmektedir (Lü ve ark., 2010). Diğer taraftan, oksidasyon gıda endüstrisi için de önemli bir sorundur. Bazı gıdaların kalitelerinin bozulması ve raf ömrünün kısalması, içerdikleri yağların oksidasyona uğraması ve istenmeyen ikincil yağ oksit ürünlerinin oluşumuyla gerçekleşmektedir (Kim ve Wijesekara, 2010). Bu duruma karşı butylated

hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), tert-butylhydroquinone (TBHQ) ve propyl gallate (PG) gibi sentetik antioksidanlar oksitlenmeyi engelleyici veya geciktirici gıda katkıları endüstride kullanılmaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2012). Ancak bu sentetik antioksidanların da sağlık üzerine olumsuz etkisinin bulunması (Hettiarachchy ve ark., 1996; Park ve ark., 2001) nedeniyle endüstride doğal antioksidan ürünler tercih edilmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, karasal bitki ve hayvanlardan elde edilen bazı moleküllerin iyi antioksidan aktiviteleri tespit edilmiş ve endüstride kullanımı araştırılmıştır. Bitkisel kaynaklı bileşikler arasında, fenolikler, flavanoidler ve karotenler önde gelirken, hayvansal kaynaklardan ise kolajen, jelatin ve bazı proteinlerin hidrolizatları ön plana çıkmaktadır. Su ürünlerinde ise, kalamar, mavi midye, istiridye, orkinos, mezgit, yılan balığı ve mikro alg gibi farklı canlılardan antioksidan aktiviteye sahip proteinlerle ilgili tespitler yapılmıştır (Mendis ve ark., 2005; Rajapakse ve ark., 2005; Kim ve Wijesekara, 2010). Deniz kaynaklı bu proteinlerin, serbest radikalleri ve reaktif oksijen türlerini süpürme veya lipid peroksidasyonu sırasında radikal zincir reaksiyonunu keserek oksidatif hasarı engelleme etkisine sahip oldukları belirlenmiştir (Rajapakse ve ark., 2005; Mendis ve ark., 2005). Kalamardan elde edilen biyoaktif peptidlerin lipid peroksidasyonunu engellemesi  $\alpha$ -tokoferolden çok daha fazla, sentetik antioksidan olan BHT'ye oldukça yakın bulunmuş ve bunun nedeni olarak antioksidan aktivite gösteren protein moleküllerinde hidrofobik amino asitlerin varlığından kaynaklandığı ifade edilmiştir (Mendis ve ark., 2005).

Dolayısıyla, protein hidrolizatlarının ve peptidlerin antioksidan aktivitesi, kendilerini oluşturan amino asitlerin türlerine ve yapılarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Amino asit içeriğine bağlı olarak değişen antioksidan aktivitede bazı aromatik amino asitlerin ve histidin içeren protein yapılarının önemli etkiye sahip olduğu ifade edilmektedir (Kim ve Wijesekara, 2010). Kolajen ve jelatin gibi büyük proteinlerin, büyük ölçüde hidrofobik amino asitlerden meydana gelmesi ve bu aminoasitlerin bol olması yüksek emülsifiye yeteneğine sahip olmalarına neden olmakta, bu da, deniz kaynaklı kolajen ve türevi proteinlerin daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmasına neden olmaktadır (Mendis ve ark., 2005). Bu sebeple antioksidan aktiviteye sahip deniz kaynaklı kolajen ve türevi proteinler, biyoaktif özelliklere sahip gıdalarda ve farmakolojik ürünlerde sentetik antioksidanların yerine kullanılabilme potansiyeline sahip ürünler olarak değerlendirilmektedir. Deniz canlılarından izole edilen bazı antioksidan peptidler ve kaynakları Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Deniz canlılarından elde edilen bazı antioksidan peptidler ve kaynakları

<i>Peptide ait amino asit dizilimi</i>	<i>Kaynak</i>	<i>Referans</i>
<i>Leu-Lys-Gln-Glu-Leu-Glu-Asp-Leu-Leu-Glu-Lys-Gln-Glu</i>	İstiridye	Qian ve ark., 2008
<i>Phe-Asp-Ser-Gly-Pro-Ala-Gly-Val-Leu</i>	Jumbo Kalamar	Mendis ve ark., 2005
<i>Val-Glu-Cys-Tyr-Gly-Pro-Asn-Arg-Pro-Glu-Phe</i>	Mikroalg	Sheih ve ark., 2009
<i>Phe-Gly-His-Pro-Tyr</i>	Mavi Midye	Jung ve ark., 2005
<i>Leu-Leu-Gly-Pro-Gly-Leu-Thr-Asn-His-Ala</i>	Rotifer	Byun ve ark., 2009
<i>Val-Lys-Ala-Gly-Phe-Ala-Trp-Thr-Ala-Asn-Glu-Glu-Leu-Ser</i>	Orkinos	Je ve ark., 2007
<i>Leu-Gly-Leu-Asn-Gly-Asp-Asp-Val-Asn</i>	Yılan Balığı	Ranathunga ve ark., 2006
<i>Arg-Pro-Asp-Phe-Pro-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr</i>	Dil Balığı	Jun ve ark., 2004

### 2.3.2.2. Antimikrobiyal Aktivite

Bakteri, maya, küf, alg gibi mikroorganizmaların gelişimlerinin kontrol altında tutulmaları, yüksek biyolojik yapıdaki canlıların yaşamlarını sağlıklı sürdürebilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle, özellikle son yüzyıl içerisinde bakteriyel hastalıkların önüne geçilebilmesi amacıyla antimikrobiyal maddelerin üretilmesi üzerinde çalışılmıştır. Ancak, mikroorganizmaların zor yaşam koşullarına adapte olabilmesi ve gelişimlerini engelleyici maddelere karşı direnç kazanması mikrobiyal hastalıkların tedavisini zorlaştırmaktadır. Bu sebeple, özellikle son yıllarda, bir çok tedavinin gerçekleşmesinde antibiyotiklerin yetersiz kaldığı, ilave antibakteriyel etkiye sahip ajanlar ile tedavilerin sürdürüldüğü bilinmektedir. Ancak bu ajanların, genel anlamda, tedavi olacak doku içinde yeterli konsantrasyona ulaşması ve konsantre olduğu dokuya zararının minimum, etki edeceği etkene ise maksimum derecede olması istendiğinden, antibiyotiklere alternatif ajanların bulunması da oldukça zor olmaktadır. Dolayısıyla, doğal ve etkili olabilecek her türlü antimikrobiyal etkideki ajanın keşfi, sentezi ve üretimi yüksek biyolojik canlıların refahı açısından elzem bir durumdur.

Son yıllarda, bir çok karasal canlıdan elde edilen bileşiklerin antimikrobiyal etkileri araştırılmış ve olumlu bulgular elde edilmiştir. Basit anlamda, fenolik bileşikler, lipidler, karbohidrat ve protein yapıdaki bu bileşiklerin kimyasal izomerlerinin etkileri üzerinde çalışmalar hala devam etmektedir. Bunlara ilave olarak, denizel canlılardan izole edilen bazı bileşiklerin de antimikrobiyal etkiye sahip oldukları belirlenmiş, ancak denizlerdeki çok çeşitteki türlerden elde edilebilecek birçok bileşik henüz araştırılmamıştır. Son yıllarda, protein yapıdaki moleküllerin antimikrobiyal etkileri ve kullanımları ile ilgili



çalışmalar üzerine yoğunlaşmıştır. Protein bazlı antimikrobiyal ajanların üzerine yoğunlaşılmasının sebebi, bu maddelerin fonksiyonel özellikleri açısından da gıda üretiminde kullanıma uygun, doğal ve zararsız olmasından kaynaklanmaktadır.

Proteinlerin antimikrobiyal etkileri, enzimatik hidrolizasyon ile ortaya çıkarılabilen molekül ağırlığı 10 kDa altında olan protein öncüleri peptidlerden kaynaklanmaktadır (Bulet ve ark., 2004; Reddy ve ark., 2004; Liu ve ark., 2008). İlk olarak böceklerden izole edilen antimikrobiyal peptidler, bugün bir çok kaynaktan ulaşılabilir hale gelmiştir. Denizel kaynaklı proteinlerden ise antimikrobiyal peptidler başlıca örümcek yengeci (Stensvag ve ark., 2008), istiridye (Liu, ve ark., 2008), Amerikan ıstakozu (Battison ve ark., 2008), karides (Bartlett ve ark., 2002) ve yeşil deniz kestanesinde (Li ve ark., 2008) izole edildiği rapor edilmiştir. Çizelge 2.5'te denizel kaynaklı bazı antimikrobiyal peptidlerin amino asit dizilimi, baskın amino asidi veya amino asit içeriği verilmiştir.

Çizelge 2.5. Su ürünleri proteinlerinden elde edilen antimikrobiyal peptidlerin kaynağı, amino asit dizilimi veya dizilimde bulunan majör amino asit/asitler

Kaynak	*Amino asit dizilimi, majör amino asit/asitler	Referans
İstiridye	Cys, Leu, Glu, Asp, Phe, Tyr, Ile, ve Gly	Liu ve ark. (2008)
Amerikan ıstakozu	Gln-Tyr-Gly-Asn-Leu-Leu-Ser-Leu-Leu-Asn- Gly-Tyr-Arg	Battison ve ark. (2008)
Karides	Pro-Arg-Pro	Bartlett ve ark. (2002)
Yeşil Deniz Kestanesi	Cys	Li ve ark. (2008)

\*Cys: Sistin, Leu: Lösin, Glu: Glutamaik asit, Asp: Aspartik asit, Phe: Fenilalanin, Tyr: Tirozin, Ile: İzolösin, Gly: Glisin, Asn: Asparajin, Ser: Serin, Arg: Arjinin, Pro: Prolin

Su ürünlerinde, kabuklu deniz ürünlerinin antibakteriyel aktivite gösteren bileşikleri yoğunlukla içermesi, bu canlıların üzerine yapılan araştırmaları artırmıştır. Mavi yengecin (*Callinectes sapidus*) hemolenfinden izole edilen peptidlerde antimikrobiyal etkinin tespit edildiği, özellikle gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Edward ve ark., 1996). Amerikan ıstakozu (*Homarus americanus*)'ndan elde edilen bazı peptidlerin ise gram negatif bakteriler üzerinde bakteriyostatik etki gösterirken, Amerikan ıstakozunun patojeni olarak bilinen iki parazit türü *Mesanothryx chesapeakensis* ve *Anophryoides haemophila*'ya karşı ise protozoatik ve protozoasidal etki gösterdiği rapor edilmiştir (Battison ve ark., 2008). Bununla beraber, antimikrobiyal peptid olarak bilinen "arasin 1" yine bir kabuklu türü olan örümcek ıstakozu (*Hya araneus*)'ndan izole edilmiş ve biyoteknolojide yaygın olarak kullanılan *Corenebacterium glutamicum* bakterisinin

gelişimini baskıladığı rapor edilmiştir (Stensvag ve ark., 2008). Diğer bakteri türlerinden *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* ve mantar türlerinden *Botrytis cinera* ile *Penicillium expansum*'un istridye (*C. gigas*)'den izole edilen CgPep33 antimikrobiyal peptid ile gelişimlerinin baskılandığı bildirilmiştir (Liu ve ark., 2008). Bu peptidin, bahsedilen bu mikroorganizmalar üzerindeki minimum inhibasyon konsantrasyonları ise 18,6 ile 48,2 µg/ml olarak ifade edilmiştir (Liu ve ark., 2008). Antimikrobiyal etkisi olan peptidlerin yanı sıra antiviral etkiye sahip peptidlerin olduğu da rapor edilmiştir. Achour ve ark. (1997) istridye protein ekstraktlarının immunositlerin HIV-1 virüsü içerisindeki çoğalmalarını artırabileceği ifade edilmiştir (Achour ve ark., 1997). Bununla birlikte, istridye hidrolizatlarının ultrafiltrasyon, diyaliz gibi işlemlerden sonra elde edilen 5 – 10 kDa arasındaki molekül ağırlığına sahip fraksiyonların herpes virüsü üzerine antiviral etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Zeng ve ark., 2008).

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

Araştırma materyali, deniz hıyarı veya deniz patlıcanı olarak bilinen *Holothuria tubulosa*'dır (Şekil 3.1). Çanakkale Boğazı kıyı şeridinden 2013 Mart ayı ile 2014 Mayıs ayları arasında mevsimsel olarak, 0 - 10 m derinlikten dalarak el ile toplanan deniz hıyarları, canlı olarak strafor kutularda Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakültesi İşleme Laboratuvarına getirilmiştir. Araştırmada, her mevsim için en az 100 birey olacak şekilde, toplam 450 adet (yaklaşık 50 kg) deniz hıyarı materyali kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Deniz hıyarı (*Holothuria tubulosa*, Gmelin 1791), (Anonim, 2015)

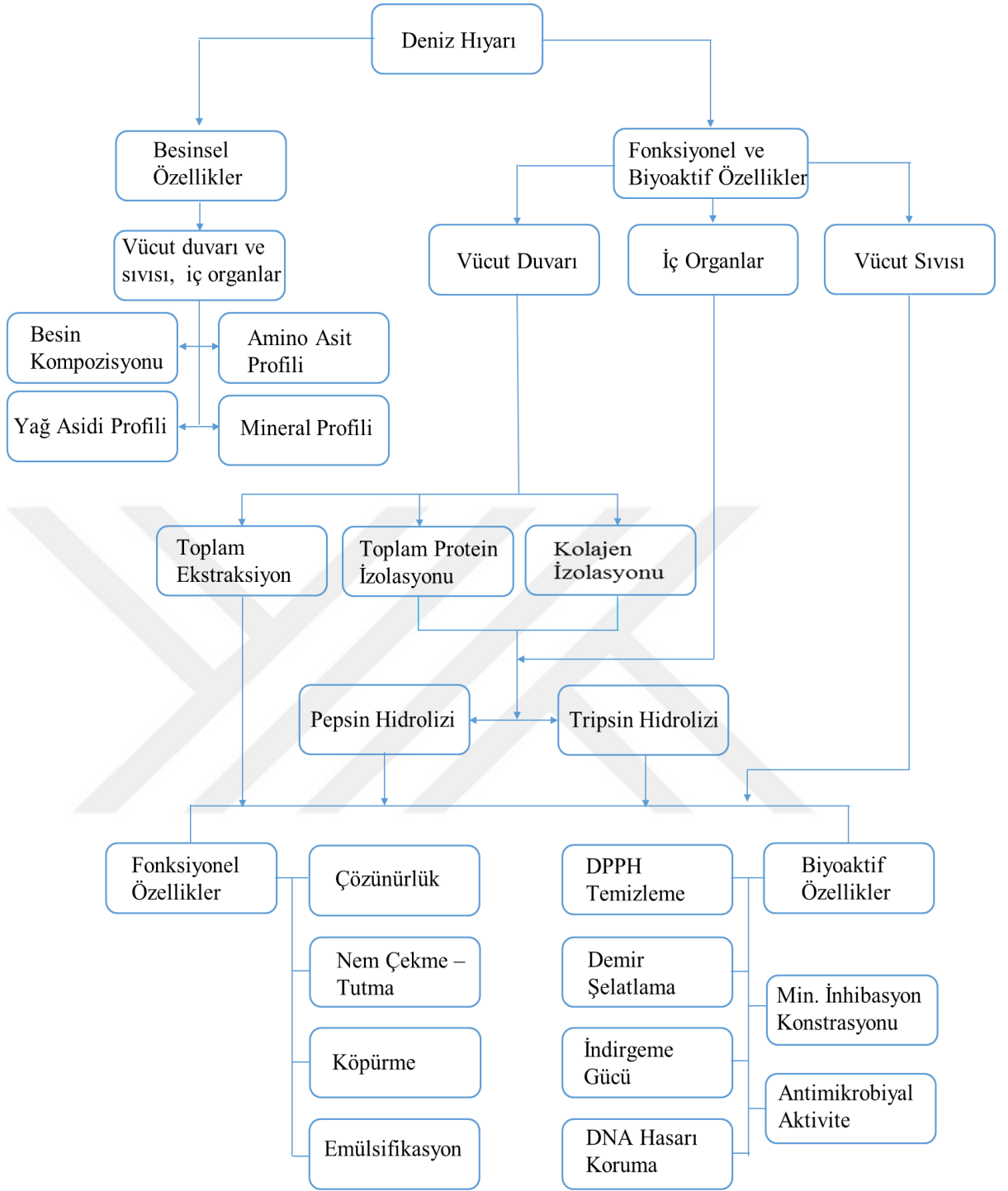
#### 3.2. Metot

##### 3.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Deniz suyu içerisinde laboratuvara getirilen örneklerin öncelikle biyometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Biyometrik ölçümleri tamamlanan örneklerin vücut duvarları alt kısmından bıçak ile kesilerek, önce vücut sıvısı alınmış, sonrasında ise tamamen kesilen vücut duvarından iç organlar çıkarılmıştır. Vücut duvarı, iç organlar ve vücut sıvısı olarak ayrılan deniz hıyarı örnekleri, üç grup halinde analizlere tabi tutulmuştur.

##### 3.2.2. Deneme Planı

Üç gruba ayrılan deniz hıyarı örnekleri, besinsel, fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerin belirlenmesi amacıyla analizlere tabii tutulmuştur (Şekil 3.2). Çalışmada yapılan tüm analizler üç tekerrür halinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Deney planı işlem akış şeması

### 3.2.3. Deniz Hıyarının Morfolojik ve Besinsel Özelliklerine Ait Analizler

#### 3.2.3.1. Morfolojik Ölçümler

Deniz hıyarı örneklerinde boy, ağırlık, vücut duvarı ağırlığı, iç organ ağırlığı ve vücut sıvısı ağırlıkları ölçümleri yapılmıştır. Bu ölçümler için, deniz suyu ile canlı olarak laboratuvara getirilen örneklerin, öncelikle darası alınan sünger üzerinde toplam ağırlık ölçümü yapılmıştır. Toplam boyun ölçümü ise canlının karın kısmına kesik atılarak, vücut

sıvısı ve iç organları alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir. İlk olarak kesikten vücut sıvısı, darası alınmış behere aktarılmış, daha sonra karın kısmı tamamen kesilerek, iç organlar, başka behere aktarılarak, tartımları yapılmıştır. İç organ ağırlığı, içerdiği sindirilmiş materyal (kum ve detritus) ile birlikte tartılmıştır (Battaglone ve ark., 1999).

### **3.2.3.2. Besin Kompozisyonu Analizleri**

#### **3.2.3.2.1. Nem Analizi**

Nem analizi için öncelikle homojenize edilmiş örnekten darası alınmış petrilere 5 g tartılarak sabit bir ağırlığa ulaşana kadar (16 - 18 saat) 105°C'deki etüvde kurutulmuştur (AOAC, 2000). Bu işlemin ardından petrilere, hassas terazide tekrar tartılarak sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Nem Miktarı (\%)} = \frac{T_1 - T_0}{m} \times 100 \quad (3.1)$$

T<sub>0</sub>: İlk Tartım (g), T<sub>1</sub>: Son Tartım (g), m: Örnek Ağırlığı (g)

#### **3.2.3.2.2. Ham Protein Analizi**

Protein tayini Kjeldahl yöntemine göre yapılmıştır (AOAC, 2000). Bu yöntemle göre; Kjeldahl tüpleri içerisine homojenize edilmiş örnekten 0,5 g tartılmış ve 20 ml % 96'lık H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 ml % 35'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 1 adet kjeldahl tableti ilave edilmiştir. Tüpler yağ yakma bloğuna (InKjel M) yerleştirilmiş ve içerisindeki örnek yeşil sarı saydam bir renk oluşturuncaya kadar 420°C'de yaklaşık 2 - 3 saat yakma işlemi uygulanmıştır. Yakma işleminin ardından bu tüpler oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış, soğuma sağlandıktan sonra tüplere 50 ml distile su ve 50 ml % 33'lük NaOH ilave edilmiştir. Distilasyon esnasında ortamda bulunan azotu ölçmek için bir tanede kör örnek hazırlanmıştır. Yakma işlemi sonrasında protein tüpleri ve içerisinde 25 ml doymuş borik asit çözeltisi ve 3 - 4 damla indikatör (metil kırmızısı; 0,1 g metil kırmızısı/100ml alkol) bulunan erlenmayer ile Kjeldahl destilasyon ünitesine (Behrotest WD20, Gerhardt) yerleştirilerek NaOH ile destilasyona tabi tutulmuş ve bu işlem yaklaşık erlen mayerde 100 ml destilat toplanıncaya kadar devam edilmiştir. Elde edilen destilat 0,1 N'lik HCl ile titre edilerek sarfiyat belirlenmiş ve protein oranı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ham Protein (\%)} = \frac{(T_t - T_k) \times 0,014 \times N \times 6,25}{m} \times 100 \quad (3.2)$$

$T_t$ : Titrasyonda Harcanan Miktar,  $T_k$ : K r  rneğin Titrasyonunda Harcanan Miktar, N: HCl  zeltisinin derişimi, m:  rnek Ağırlığı

### 3.2.3.2.3. Ham Yağ Analizi

Yağ analizi Bligh ve Dyer (1959)'in uyguladığı yöntem esas alınarak yapılmıştır. Bu amaçla 20 g örnek alınmış ve 100 ml metanol/kloroform (1/2) ile birlikte homojenize edilmiştir. Homojenizat 20 ml metanol-kloroform ile yıkama yapılarak darası alınan balon joje içerisine filtre k ğı ile s z lm ştir. Süzüntüye 20 ml % 4' l k  $\text{CaCl}_2$  ilave edilerek balon jojenin kapağı kapatılmış ve 1 gece karanlık ortamda bekletilmiştir. Bu süre sonunda faz oluşumu gözlemlenmiş ve içerik ayırma hunisinde alt faz balon jojeye alınarak üst faz atılmıştır. Balon joje içerisindeki alt faz, 60 C'lik su banyosunda, rotary evaporatör (IKA RV10 basic) kullanılarak üzücü uçurulmuştur. Balon jojede yağ ayırımı gerçekleştikten sonra düzenekten çıkartılarak 90 C'deki etüvde (Nüve FN500) 1 saat bekletildikten sonra, son tartımı yapılmıştır. Belirlenen değerler aşağıdaki formülde yerine konularak hesaplanmıştır.

$$\text{Yağ (\%)} = \frac{T_1 - T_0}{m} \times 100 \quad (3.3)$$

$T_0$ : İlk Tartım,  $T_1$ : Son Tartım, m:  rnek Ağırlığı

### 3.2.3.2.4. Ham Kül Analizi

Kül tayini için darası alınan krozelere 2 g örnek konulmuştur. Hazırlanan krozeler kül fırınına (Elektromag M 1811) yerleştirilerek 550 C'de sigara k l  rengine dönüşünceye kadar yaklaşık 4 - 5 saat tutulmuştur. Yakma işlemi sonrasında krozelerin hassas terazide tartımları yapılmış ve sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır (AOAC, 2000).

$$\text{Ham Kül(\%)} = \frac{T_1 - T_0}{m} \times 100 \quad (3.4)$$

$T_0$ : İlk Tartım,  $T_1$ : Son Tartım, m:  rnek Ağırlığı

### 3.2.3.2.5. Amino Asit Analizi

Amino asit analizi için % 30 protein içerecek şekilde 130 - 290 mg arasında örnek, ısıya dayanıklı vida kapaklı cam şişelere alınmış ve üzerine 20 ml 6 N HCl ilave edilerek azot gazı geçirildikten sonra 110°C'de 24 saat hidroliz edilmiştir (AOAC, 2000). 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 (0,1 M, pH 2,2) seyreltilmiştir (Srivastava ve ark., 2006; Chi ve ark., 2008). Hidroliz işlemi tamamlanmış örneklerin, aminoasit miktarlarının tespiti için EZ: fast GC/FID Free (Physiological) Amino Asit Kitleri kullanılmıştır (Badawy ve ark., 2008). Bu yöntem, katı faz ekstraksiyonu, türevlendirme ve sıvı/sıvı ekstraksiyonu aşamalarından oluşmaktadır (Kale ve ark., 2006; Badawy ve ark., 2008). Hazırlanan ve türevlendirilen örnekler GC (Shimadzu)'de analiz edilmiştir. İnternal standart (IS) olarak Norvaline kullanılmış ve konsantrasyonu örneklerde 200 nmol/ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

*GC cihazının konfigürasyonu ve kromatografik koşullar;*

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

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/dk., 320°C'de 1 dk. bekle

Detektör: Alev iyonizasyon detektörü (FID; 320°C)

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

### 3.2.3.2.6. Yağ Asidi Analizi

Yağ asidi analizlerinde 3.2.2.'de belirtilen metoda göre elde edilen ham yağ, materyal olarak kullanılmıştır. Bu şekilde elde edilen ham yağın öncelikle esterleşmesi yapılmış, bunun için 0,150 g ham yağ numunesi balonda tartıldıktan sonra üzerine 5 ml metanolik 0,5 N NaOH ilave edilmiştir. Numune, kaynama taşı atılarak soğutucu bağlanmış su banyosunda 15 dakika kaynatılarak sabunlaştırılmıştır. Soğutucunun üzerinden 5 ml BF<sub>3</sub> reaktifi atıldıktan sonra 5 dakika daha kaynatılmıştır. Daha sonra numuneye 2 ml heptan ilave edilmiş ve 1 dakika daha kaynatılmıştır. Soğutucu çıkarılmış ve örnek hassas olarak 25 ml'lik balon jøjeye alınmıştır. Balon doymuş NaCl ile çalkalanarak bu çalkantı ilave edilmiştir. Üstteki heptan fazından mikro pipetle 1-2 ml alınarak cam vialer aktarılmıştır. İçine birkaç kristal anhidrik Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> atılmıştır. Enjektörle bu solüsyondan çekilerek gaz kromatografisine enjekte edilmiştir (IUPAC, 1987). Gaz

kromatografisinde okunan numune değerleri, cihazın konfigürasyonu için kullanılan Xcalibur adlı programda sonuçlar değerlendirilmiştir.

*GC-MS cihazının konfigürasyonu ve kromatografik koşullar*

Kromatografi Aygıtı: Thermo GS-MS Finnigan Trace DSQ

Dedektör: MS, Kolon: ZB-WAX, 30 m. uzunluk, 0,25 mm ID, 0,25 mm film+kalınlık

Enjeksiyon Hacmi: 2,0 µl, Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı: 200°C

Dedektör Sıcaklığı: 200°C, İlk Fırın Sıcaklığı: 100°C, Sıcaklık Artışı: 1°C / dk

Süre: 55 dakika, Split Oranı: 1/50, Taşıyıcı Gaz: H<sub>2</sub>

### **3.2.3.2.7. Mineral Madde Analizi**

Mineral madde analizi için örnekler, polietilen poşetlerde -20°C'de analizler gerçekleşene kadar depolanmıştır. Örnekler, homojen hale getirildikten sonra 0,2 g alınarak tüplerin içerisine konulmuş, üzerine 4 ml konsantre nitrik asit (%65 w/v, Merck) ilave edilerek mikrodalgada (CEM Mars Xpress) yakılmış ve çözünür forma dönüştürülmüştür. Organik sindirim işlemin uygulanmasından sonra, örnekler filtre edilerek deiyonize saf su ile seyreltilmiştir (EPA, 1998). Element analizi öncesi, standart olmayan seyreltmeler hazırlanarak ICP-MS cihazı kalibre edilmiştir. Kör örnek hazırlanmış ve her okunan 5 örnekten sonra kullanılan kimyasalların etkisinin derecesini belirlemek amacıyla, örnekler tekrar okutulmuştur. Element analizi Spectro ICP-MS (Germany) cihazı kullanılarak yapılmış ve yaş örnekte kg/mg olarak ölçülmüştür (EPA, 2000).

### **3.2.4. Deniz Hıyarı Ekstrakt, Protein ve Hidrolizatlarının Elde Edilmesi**

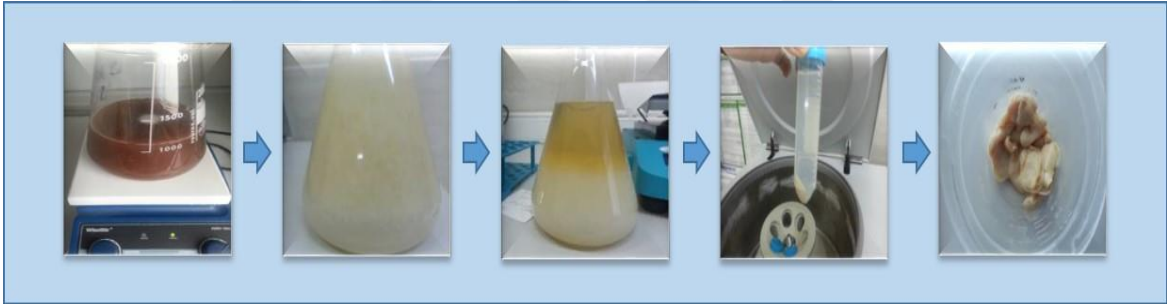
#### **3.2.4.1. Total Ekstraksiyon**

Deniz hıyarı vücut duvarı, iç organları ile birlikte küçük parçalar halinde kıyıldıktan sonra öncelikle petri kaplarında 70°C'de 20 saat etüvde (Nüve, FN 500) kurutulmuştur. Kurutulmuş örnekler öğütücüden (Sinbo) geçirilerek toz haline getirilmiş ve toz halindeki örnekler 1:10 oranında asitonitril ve % 0,1 trifloroasetikasit (60:40, v:v) karışımı ile süspansiyon edilmiştir. Elde edilen süspansiyon karanlık ortamda manyetik karıştırıcı (Daihan, MSH 20A) kullanılarak 24 saat karıştırılmıştır. Süre sonunda ekstrakt 4000 x g'de 20 dk santrifüj (Nüve, NF 800R) edilmiş, süpernatant balonlara alınarak rotary evaporatörde çözücülerden tamamen arındırılana kadar uçurma işlemine tabii tutulmuştur. Balonda kalan ekstraktlar liyofilize (Bluewave, BW-10) edilerek, - 20°C'de analizlerde kullanılana kadar saklanmıştır (Esmat ve ark., 2013).



### 3.2.4.2. Vücut Duvarı Protein İzolasyonu

Deniz hıyarının vücut duvarından 200 gr alınmış ve iyice kıyıldıktan sonra 10 000 x g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak, kalan çökelti üzerine, toplam konsantrasyon miktarı % 10 olana kadar 0,1 M NaOH ilave edilmiştir. NaOH ve çökelti süspansiyonu manyetik karıştırıcıda 4°C'de 12 saat karıştırılmış ve sonrasında karışımın pH'sı 7'ye ayarlanarak 4°C'de 10 000 x g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden elde edilen süpernatanta % 10 oranında TCA (Triklorik Asetik Asit) ilave edilerek proteinlerin çökmesi amacıyla 4°C'de 3 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda karışım 10000 x g'de 20 dk santrifüj edilerek çöken proteinler toplanmıştır. Toplanan proteinler, asetonla renk değişimi gerçekleşmeyene kadar (beyaz olana kadar) yıkanmıştır (Şekil 3.3). Beyazlama işlemi gerçekleştirildikten sonra ise, ultra saf su kullanılarak TCA'nın tamamen uzaklaşması amacıyla, üç kez ikişer dakika daha çalkama suretiyle yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkanan protein çökeltisi liyofilize edilmiş ve analizlerde kullanılmak üzere -20°C'de depolanmıştır (Kim ve ark., 1994; Torano ve ark., 1999).



Şekil 3.3. Vücut duvarı protein izolasyonu işlem akış fotoğrafları

#### 3.2.4.2.1. Pepsin ile Protein Hidrolizasyonu

Liyofilize edilen vücut duvarı protein ekstraktı örneklerinden 1 g alınarak 100 ml saf su içerisinde homojenize edilmiş ve solüsyon hidrolizasyon öncesi 37°C'de 30 dk ön inkübasyona tabi tutulmuştur. Ön inkübasyon sonrası solüsyonun pH'sı 6N HCl ile pepsinin optimum çalışma değerleri olan 2,8 - 3,0 aralığına düşürülmüştür. Daha sonra pH'sı ayarlanan protein solüsyonu içerisine, 2500 U/ g protein olacak şekilde (yaklaşık %1 solüsyon/enzim) pepsin ilavesi yapılmış ve 37°C'de 4-6 saat hidrolize tabi tutulmuştur. Solüsyonun pH'sı 1 N NaOH ve 0,5 N HCl ilaveleri ile hidrolizasyon süresince 2,8 - 3,1 değerleri arasında sabit tutulmuştur. Hidrolizasyon süresi bittikten sonra solüsyonlar önceden ayarlanmış kaynar su banyosunda 10 dk bekletilerek enzim inaktivasyonu ile hidrolizasyon işlemi sonlandırılmıştır. Hidrolizasyon işlemi sonrasında inaktif edilen solüsyon 30000 x g'de 40 dk santrifüj (Hettich,

Micro 200R) edilmiş ve santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar toplanarak, liyofilize edilmiştir.

#### **3.2.4.2.2. Tripsin ile Protein Hidrolizasyonu**

Tripsin ile vücut duvarı protein hidrolizatı, pepsin ile hidrolizasyon aşamalarına benzer şekilde yapılmıştır. Liyofilize edilen vücut duvarı protein izolatının %1'lik saf su solüsyonu hazırlanmış ve pH'sı 7,8 - 8,2 aralığında ayarlanarak yine ön inkübasyon amacıyla 37°C'de 30 dk bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında 2000-4000 U/g protein konsantrasyonunda solüsyonuna tripsin ilavesi yapılmış ve 37°C'de 4-6 saat hidrolizasyon işlemi uygulanmıştır. Hidrolizasyon süresince pH ayarlamaları yapılmış ve süre sonunda hidrolizat kaynar su banyosunda 10 dk bekletilerek sonlandırılmıştır. Daha sonra 30000 x g'de 40 dk santrifüj işlemi uygulanan örneklerden süpernatantlar toplanmış ve liyofilize edilerek analizler için - 20°C'de saklanmıştır.

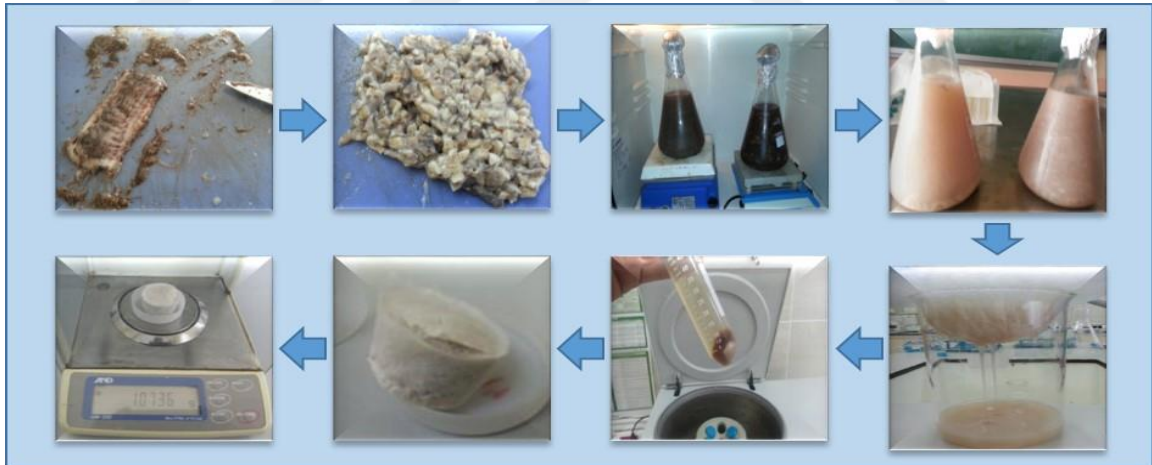
#### **3.2.4.3. Kolajen İzolasyonu**

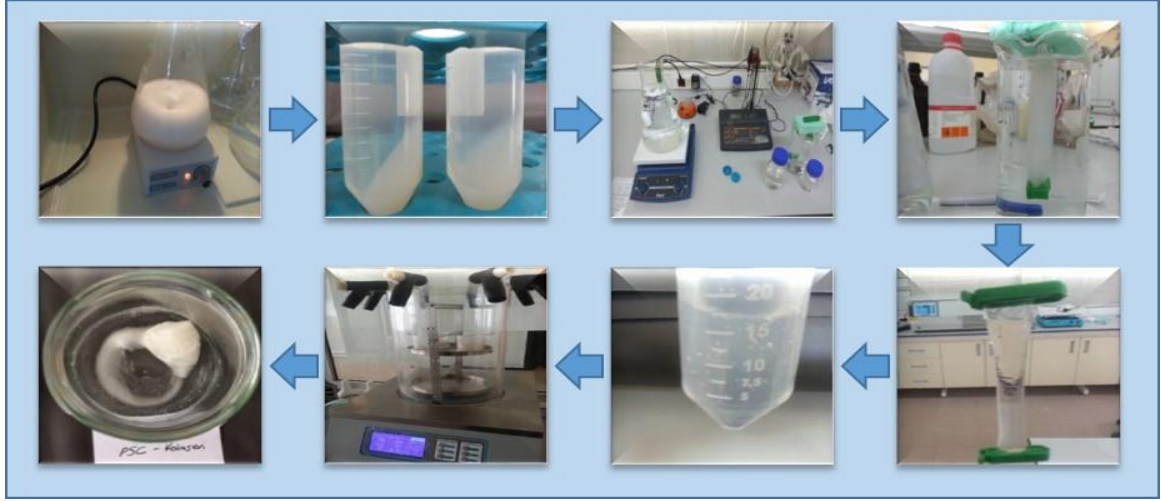
Deniz hıyarı kolajen izolasyonu için, canlının vücut duvarı kullanılmış, öncelikle örneklerin yapışkan yüzeyleri bıçak yardımıyla kazınarak uzaklaştırılmıştır. Daha sonra vücut duvarları bıçak yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve 100 gr vücut duvarına 1000 ml saf su ilave edilerek 4°C'de 30 dk boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Karıştırma işlemi sonrasında vücut duvarları süzülerek yeniden aynı işleme tabi tutulmuştur. Toplam da üç kere tekrar edilen bu işlem sonrasında 100 g vücut duvarı örneği süzülerek 1000 ml ayrıştırma çözeltilisi içerisinde koyulmuş ve 4°C'de 3 gün manyetik karıştırıcıda düşük hızda kolajen fibrilleri görülene kadar karıştırılmıştır. Ayrıştırma çözeltilisinde kullanılan kimyasallar ve derişimleri; 0,5 M NaCl, 50mM EDTA, 0,2M  $\beta$ -mercaptoethanol ve 0,1 M Tris-HCl (pH:8) şeklinde belirlenmiştir (Saito ve ark., 2002). Üç gün ayrıştırma çözeltilisi içerisinde karışan örnek, kolajen fibrillerini içeren yüksek viskozlu süspansiyona dönüşmüştür. Elde edilen bu yüksek viskozlu sıvı peynir tülbentinden bir behere süzülüş ve süzüntü 7500 x g'de 30 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılmış kalan çökelti, kolajen olmayan kontaminantlar ile endojen proteazların kolajen fibrillerini bozmasını önlemesi amacıyla, 1000 ml NaOH (0,1 M ) ile 4°C'de üç gün boyunca düşük seviye hızda karıştırılmıştır. Bu süre sonunda süspansiyon 7500 x g'de 30 dk santrifüj edilmiş, süpernatant atılarak çökelti alınmıştır. Alınan çökelti (kolajen fibrilleri) birkaç kez saf su ile yıkandıktan sonra liyofilize edilerek, hidrolizat ve diğer analizlerde kullanılabileceği kadar - 20°C'de saklanmıştır (Şekil 3.4) (Saito ve ark., 2002; Zhu ve ark., 2012).

### 3.2.4.4. Kolajen Hidrolizasyonu

#### 3.2.4.4.1. Pepsin ile Kolajen Hidrolizasyonu

Liyofilize edilmiş kolajen fibrilleri 500 ml 0,5 M asetik asit ile süspansiyon edilmiş ve 100:1 (kolajen: pepsin) oranında pepsin ilave edilerek, 4°C’de iki gün boyunca düşük hızda karıştırılarak sindirim işlemi uygulanmıştır. Sindirim işlemi sonunda 7500 g’de 1 saat santrifüj işlemi uygulanmış, santrifüj sonrası elde edilen viskoz çözeltiye 4,0 M NaCl çözeltisinden yararlanarak toplam derişim, 0,8 M NaCl derişimine ayarlanmıştır. Bu şekilde çözülmüş kolajenlerin çökeltmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu çökelen çözülmüş kolajen örnekleri, düşük hızda santrifüj edilerek çökelek alınmıştır. Alınan çökelti 0,5 M asidik asitte çözüldürülmüş ve 0,02 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 8) bufferında pepsinin inaktivasyonu amacıyla diyalize tabi tutulmuştur. Birkaç kez bufferın değiştirilmesinden sonra diyaliz işlemi sonlandırılmış ve santrifüj edilerek kolajen fibrilleri toplanmıştır. Toplanan pepsin ile çözülmüş kolajen çökeltisi son olarak 0,5 M asetik asit içinde çözülmüş ve 0,1 M asetik asit içerisinde diyalize tabi tutulmuştur. Bu diyaliz aşamasından sonra pepsin ile çözülmüş kolajen preparatı liyofilize edilmiş ve analizlere kadar -20°C’de depolanmıştır (Şekil 3.5) (Saito ve ark., 2002; Zhu ve ark., 2012).





Şekil 3.5. Kolajen pepsin hidrolizatı işlem akış fotoğrafları

#### 3.2.4.4.2. Tripsin ile Kolajen Hidrolizasyonu

Liyofilize kolajen örneğinden, derişimi 0,4 mg/ml (kolajen/tampon) olacak şekilde, 1 gr alınarak 250 ml 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH: 7,8) bufferında çözündürülmüştür. Manyetik karıştırıcıda yaklaşık 1 saat homojenlik sağlanana kadar 37°C’de karıştırılmıştır. Karıştırılmış örnek içine 2000-3000 U/g enzim/kolajen konsantrasyonu olacak şekilde tripsin ilavesi yapılmış ve çözelti 37°C’de 8 saat karıştırılmıştır. İnkübasyon sonunda enzim inaktivasyonu için karışım 100°C’de 10 dk su banyosu kullanılarak ısıl işleme tabi tutulmuştur. Enzim inaktivasyonu sonrasında örnek 30 000 x g’de 90 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar 0, 22 µl’lik PTFE şırınga filtreden geçirilmiş ve süzüntü liyofilize edilerek analizlerde kullanılmak üzere -20°C’de saklanmıştır (Suarez-Jimenez ve ark., 2015).

#### 3.2.4.5. İç Organ Protein Hidrolizasyonu

##### 3.2.4.5.1. Pepsin ile İç Organ Protein Hidrolizasyonu

İç organlar, kum, çamur ve diğer kirliliklerden saf su kullanılarak temizlenmiştir. Bol saf su kullanılarak temizlenen iç organlar, daha sonra ultra-turrax (IKA-Yellow Line) yardımıyla homojen hale getirilmiştir. Homojen edilen iç organ örneklerinden 50 g alınarak saf su ile toplam hacim 250 ml’ye tamamlanmıştır. Toplam hacmi 250 ml olan solüsyon üzerine yağ ayrıştırması amacıyla 500 ml isopropanol alkol ilave edilip karıştırılmıştır. Karıştırılan örnek su banyosunda (Elektromag, M2536) 60°C’de 45 dk bekletilerek yağ ayrıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrışan yağ kaptan uzaklaştırıldıktan sonra isopropanol ve su evaporatörde (IKA, RV10) uçurulmuştur. Balonda kalan katı örnek saf su ile 2-3 kez yıkanmış ve yıkanan örnek 3000 x g’de 30 dk santfifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.

Çökelti 500 ml 0,1 M fosfat bufferında ( $\text{NaH}_2\text{HPO}_4$ ) çözündürülerek  $37^\circ\text{C}$ 'de 30 dk ön inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrası solüsyonun pH'sı 6 N HCl ile 2,8-3,0'e ayarlanmıştır. pH ayarlaması sonrası 500 ml solüsyonun % 0,75 %1 ve %1,5'i kadar pepsin ilavesi yapılarak solüsyon  $37^\circ\text{C}$ 'de 8 saat hidrolizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Sürekli karıştırma suretiyle gerçekleştirilen hidrolizasyon işlemi sonrası, enzim inaktivasyonu amacıyla solüsyon kaynar su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra 3000 x g'de 30 dk santrifüj işlemi uygulanmış, santrifüj sonrası çökelti atılarak süpernatant alınmıştır. Alınan süpernatant daha sonra 30000 x g'de 90 dk santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası süpernatant 0,22  $\mu\text{m}$ 'lik şırınga filtreden geçirilerek liyofilize edilmiştir (Mamelona ve ark., 2010; Zhou ve ark., 2012).

#### **3.2.4.5.2. Tripsin ile İç Organ Protein Hidrolizasyonu**

İç organların tripsin hidrolizatı eldesi için, pepsin hidrolizatı eldesindeki aşamaların aynısı uygulanmış, hidrolizasyon aşamasında kullanılan tripsin miktarı pepsin ile aynı tutulmuş, ancak pH ise tripsin için optimum pH aralığı olan 7,8-8,2 aralığına 6N NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. Hidrolizasyon sonrasında da uygulanan işlemler pepsin hidrolizasyon işlemi sonrasında yapılan işlemler ile aynı uygulanmıştır (Mamelona ve ark., 2010; Zhou ve ark., 2012)

#### **3.2.4.6. Hidrolizasyon Derecesi**

Hidrolizatların hidrolizasyon derecesi iki farklı metot kullanılarak hesaplanmıştır.

*Triklorikasedik asit (TCA) ile çözünen nitrojen miktarı*; Bu analiz için Hoyle ve Merritt (1994)'in tanımladığı metot kullanılmıştır. Hidrolizat süpernatantlarından 20 ml alınarak 20 ml %20'lik TCA ile karıştırılmıştır. Karışım 7 000 g'de 20 dk santrifüj edilmiş ve %10'luk TCA'da çözünen maddelerin olduğu süpernatant toplanmıştır. Ürünlerin hidrolizasyon derecesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{HD}(\%) = 100 \times \frac{\text{örnekteki \%10'luk TCA ile çözünen nitrojen}}{\text{örnekteki toplam nitrojen}}$$

*Ortophtalaldehyde (OPA) ile türevlendirme*; Bu analiz için OPA ayıracı Church ve ark. (1983)'na göre hazırlanmıştır. 25 ml sodyum tetraborat solüsyonu ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) 2,5 ml %20 lik (w/v) sodyum dodesil sülfat solüsyonu, 40 mg OPA (1 ml methanol içinde çözünmüş) ve 100  $\mu\text{l}$  2-mercaptoethanol ile karıştırılmıştır. Toplam hacim ultra saf su kullanılarak 50 ml'ye tamamlanmıştır. Bu karışım kullanılmadan hemen önce hazırlanmış ve ışıktan korunmuştur.

Türevlendirme için Spellman ve ark (2003) metodu kullanılmıştır. 10 µl örnek 3,4 ml OPA ayırıcı ile karıştırılmış ve 25°C'de 2dk bekletilmiştir. Süre sonunda 340 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunarak aşağıdaki denkleme göre hesaplama yapılmıştır;

$$HD (\%) = \frac{AD \times 1,934 \times d}{c} \quad (3.5)$$

AD: örneklerin absorbans değeri, d: seyreltme faktörü, c: örneklerin protein konsantrasyonu (g L<sup>-1</sup>)

### 3.2.4.7. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Page Analizi

Denizhiyarı vücut duvarı ile iç organlarından izole edilen protein örnekleri ve izole edilen kolajen ile kolajen hidrolizatlarının SDS-PAGE metodu aracılığıyla molekül ağırlıklarının dağılımı incelenmiştir. Bu amaçla SDS-PAGE analizi yapılacak gruplar direkt olarak 1:3 oranında (örnek-solüsyon) SDS ve üre solüsyonuna koyulmuş ve 5 dk kaynatılmıştır. Gece boyu çalkalama sonrası örnekler 10000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve çözünmeyen çökelti atılmıştır.

SDS-Üre Solüsyonu : 0.1M Tris-HCl; pH 8.0; 8 M Üre; %4 SDS; %2 mercaptoethanol; %20 gliserol)

Daha sonra protein örnekleri (5 µ), %5 yükleme, %10 yürütme olan poliakrilamid jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Yüklenen protein örnekleri 15 miliamperde ayrışma tamamlanana (yaklaşık 3 saat) kadar elektroforezde (Thermo, Owl P8DS; JGC-4) yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel çıkartılarak Brilliant Blue R-250 solüsyonu (%0,05 R-250 (w/v), %50 Ethnaol (v/v), %7,5 (v/v) asetik asit) ile boyanmış ve boya arındırması yapılmıştır. Daha sonra jeller jel görüntüleme cihazında (Biorad, GelDoc) görüntülenmiştir (Laemmli, 1970).

### 3.2.5. Deniz Hıyarı Ekstrakt, Protein ve Hidrolizatlarına Yapılan Fonksiyonel ve Biyoaktif Analizler

#### 3.2.5.1. Fonksiyonel Özelliklerin Belirlenmesi

##### 3.2.5.1.1. Çözünürlüğün Belirlenmesi

Protein ekstraktı ve kolajenin çözünürlüğünün belirlenmesi için 0,5 M asedik asit ile hazırlanan solüsyonlardan, hidrolizatların protein çözünürlüğünü belirlemek için %1 örnek / ultra saf su (v/w) konsantrasyonundaki numunelerden hazırlanmıştır. Toplam hacmi 5 veya 10 ml olan bu karışımların pH'ları 6 N HCl ve 6 N NaOH kullanılarak 4, 7 ve 10'a

ayarlanmıştır. Karışımlar oda sıcaklığında 30 dk karıştırılmış ve 7500 x g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası çözünmüş protein içeren süpernatantların protein konsantrasyonları Biuret metodu (Robinson ve Hodgen, 1940)'na göre analiz edilmiştir. Örneklerin toplam protein içeriği ise 0,5 M NaOH ile çözündürülmesinden sonra belirlenmiştir.

$$\text{Çözünürlük (\%)} = \frac{\text{Süpernatanttaki protein içeriği}}{\text{Toplam protein içeriği}} \times 100 \quad (3.6)$$

### 3.2.5.1.2. Nem Çekme ve Tutma Kapasitesinin Belirlenmesi

Nem çekme ve tutma kapasitelerinin belirlenmesi için örnekler 90°C'de iyice kurutulduktan sonra toz haline getirilmiştir. Daha sonra bu örneklerden 100 mg alınarak içinde 10 µl saf su bulunan eppendorf tüplere alınmıştır. İki seri hazırlanan bu tüpler, bağıl nemi % 43 olan doymuş sodyum karbonat ve bağıl nemi % 81 olan doymuş amonyum sülfat solüsyonları ile birlikte sırasıyla desikatörde inkübe edilmiştir. Ürünlerin ağırlıkları 12 saat arayla tartılmış aşağıda formüllere göre nem tutma (NTK) ve nem çekme (NÇK) dereceleri belirlenmiştir. Analizlerde gliserol referans örnek olarak kullanılmıştır.

$$\text{NTK (\%)} = \frac{\text{İnkübasyon sonrası örnek ağırlığı}}{\text{İnkübasyon öncesi örnek ağırlığı}} \times 100 \quad (3.7)$$

$$\text{NÇK (\%)} = \frac{\text{İnkübasyon sonrası örnek ağırlığı} - \text{İnkübasyon öncesi örnek ağırlığı}}{\text{İnkübasyon öncesi örnek ağırlığı}} \times 100 \quad (3.8)$$

### 3.2.5.1.3. Emülsiyon Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

Numunelerin emülsiyon özelliği Pearce ve Kinsella (1978)'nin belirlediği metoda göre yapılmıştır. Örneklerin % 1 konsantrasyonunda sulu çözeltileri hazırlandıktan sonra bitkisel sıvı yağ ile solüsyonları hazırlanmıştır. Solüsyonların pH'ları 4, 6 ve 8'e ayarlanmış ve mini ultra turrax (Stuart SHM2/UK) kullanılarak 22 000 rpm'de 60 sn homojenize edilmiştir. Homojenizasyon sonrası köpük altında kalan emülsiyon kısmından 0. ve 10. dakikalarda 20 µl alınarak, 2 ml % 0,1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonuna ilave edilerek seyreltilmiştir. Seyreltilen örneklerin absorbans değerleri 500 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede (Optizen 3220UV) okunmuştur. Absorbans değerleri aşağıdaki formülde

yerine yazılarak emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon dayanıklılık indeksi (EDI) değerleri belirlenmiştir.

$$EAI (m^2 g^{-1}): \frac{2 \times 2,303 \times A \times SK}{L \times \emptyset \times C} \quad (3.9)$$

A: absorbans değeri, SK: seyreltme katsayısı (100), L: küvetin optik geçiş uzunluğu (m),  $\emptyset$ : bitkisel yağ hacmi, C: protein konsantrasyonu ( $g m^{-3}$ )

$$EDI (dk): \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times t \quad (3.10)$$

$A_0$ : 0. dakikadaki absorbans değeri,  $A_{10}$ : 10. dakikadaki absorbans değeri, t: süre (10).

#### 3.2.5.1.4. Köpürme Özelliğinin Belirlenmesi

Numunelerin köpürme kapasiteleri ve dayanıklılığı Sathe ve Salunke (1981)'nin belirttiği metoda göre belirlenmiştir. Örneklerin saf su ile % 2 konsantrasyonunda solüsyonları hazırlanmış ve pH'ları 4, 6 ve 10'a ayarlanarak mini-ultra turrax (Stuart SHM2/UK) aracılığıyla 22 000 rpm'de 90 sn homojen edilmiştir. Homojen edilen örnekler 10 ml'lik dereceli silindire alınarak 30 sn sonra toplam hacim ölçülmüştür. Daha sonra 30 dk oda sıcaklığında bekletilen köpürmüş örneklerin tekrar hacim ölçümü yapılmış ve köpürme kapasitesi (KK) ile köpük dayanma (KD) süresi aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır (Shahidi ve ark., 1995; Liu ve ark., 2011);

$$KK (\%): \frac{V_T - V_0}{V_0} \times 100 \quad (3.11)$$

$$KD (\%): \frac{V_t - V_0}{V_0} \times 100 \quad (3.12)$$

$V_T$ : homojenizasyon sonrası toplam hacim,  $V_0$ : karıştırma öncesi hacim,  $V_t$ : oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonraki toplam hacim



### **3.2.5.2. Biyoaktif Özelliklerin Belirlenmesi**

#### **3.2.5.2.1. Ürünlerin Analizlere Hazırlığı**

Elde edilmiş numuneler olan, toplam ekstrakt, vücut duvarı protein ekstaktı (Vp), vücut duvarı protein ekstraktı pepsin (VpP) ve tripsin hidrolizati (VpT), kolajen (Col), kolajen pepsin hidrolizati (CP), kolajen tripsin hidrolizati (CT), iç organların pepsin (BP) ve tripsin hidrolizatları (BT)'nin antioksidant özelliklerinin belirlenmesi için önce farklı konsantrasyonlarda solüsyonları hazırlanmıştır. Liyofilize edilmiş örneklerden solüsyonlar hazırlamak için Tris-HCl bufferı (pH 6,8) ve sodyum fosfat bufferı (NaH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6,8) kullanılmıştır. Kolajen numunesi için ayrıca 0,5 M (pH 3,2) asedik asit çözeltisi de hazırlanmıştır. Daha sonra liyofilize numunelerden alınmış ve bu bufferlarda 0,5 – 1,0 – 2,5 – 5,0 – 10,0 – 20,0 mg / ml solüsyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan bu solüsyonlar antioksidan aktivite analizlerinde kullanılmıştır. Mikrobiyolojik analizler için ise örnekler 3.2.5.5 başlığında anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

#### **3.2.5.2.2. DPPH Radikalleri Süpürme Etkisinin Belirlenmesi**

Ekstraktların DPPH radikalleri süpürme aktivitesi Sun ve ark. (2009) metoduna göre yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan numunelerden 1 ml alınmış ve 4 ml % 0,004 DPPH'in metanol solüsyonu içine ilave edilmiştir. Karanlık ortamda 25°C'de 30 dakika inkübasyon sonunda, 4000 x g'de santrifüj edilen örneklerin süpernatantı alınarak spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Kör örnek olarak 1ml Tris-HCl bufferı + 4 ml %0,004 DPPH-methanol kullanılmıştır. Vitamin C ve BHT pozitif kontrol örnekleri olarak kullanılmış ve DPPH radikalleri temizleme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\% E = [ (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100 ]$$

A<sub>kontrol</sub>: kontrol reaksiyonun absorbans değeri

A<sub>örnek</sub>: örneğin olduğu reaksiyonunun absorbans değeri

#### **3.2.5.2.3. Demir Şelatlama Özelliğinin Belirlenmesi**

Demir şelatlama özelliğinin belirlenmesi Aleman ve ark. (2011)'e göre yapılmıştır. Hazırlanan ürünlerin farklı konsantrasyonlarından 1 ml alınarak deney tüpüne koyulmuş daha sonra üzerine, 3,7 ml ethanol, 0,1 ml FeCl<sub>2</sub> ve 0,2 ml Ferrozin ilave edilip vortex yardımıyla karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım 25°C'de karanlık ortamda 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında filtre kağıdından süzülen örneklerin, 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuması yapılmıştır. Kör örnek olarak, 1 ml buffer + 3,7 ml ethanol + 0,1

ml FeCl<sub>2</sub> + 0,2 ml ferrozin kullanılmıştır. Şelatlama özelliği aşağıdaki metoda göre hesaplanmış ve yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ DSA} = [ 1 - (A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) ] \times 100$$

A<sub>kontrol</sub>: kontrol reaksiyonun absorbens değeri

A<sub>örnek</sub>: örneğin olduğu reaksiyonunun absorbens değeri

#### **3.2.5.2.4. İndirgeme Gücünün Belirlenmesi**

İndirgeme gücü Liu ve ark. (2012)'nin belirttiği metoda göre yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki örneklerden 0,5 ml alınarak 2,5 ml 0,2 mol/l fosfat bufferı (pH 6,8)'nda ve 2,5 ml %1'lik potasyum ferisiyanid ile karıştırılmıştır. Karışım 50°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra içine %10'luk triklorikasedik asitten 2,5 ml ilave edilmiş ve 8000 x g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst tabakadan 2,5 ml alınarak 2,5 ml su ve 1 ml % 0,1'lik FeCl<sub>3</sub> ile karıştırılmıştır. Karıştırılan örnekler, Vitamin C ve BHT'nin pozitif kontrol, kör örneklerin negatif kontrol olarak değerlendirildiği analizde, tüm örneklerin 700 nm'de absorbens değerleri ölçülmüş ve yüksek absorbens değeri daha iyi indirgeme gücü olarak ifade edilmiştir.

#### **3.2.5.2.5. Hidroksil Radikal Tesiriyle Oluşan DNA Hasarını Koruma Özelliği**

Elde edilen numunelerin DNA koruma özelliğinin tespiti Lee ve ark. (2010)'nin belirlediği metoda göre yapılmıştır. 14 µl'lik eppendorf reaksiyon tüpüne, içinde 1 µg pBR322 (*E. coli* plasmid DNA'sı) DNA bulunan ve pH'sı 7,4 olan 3 µl fosfat buffer (50 mmol/l) ilave edilmiştir. Daha sonra 2 mmol/l FeSO<sub>4</sub>'ten 3 µl ve hazırlanmış ürünlerin farklı konsantrasyonlarından 3 µl reaksiyon tüpüne ilave edilmiştir. Son olarak 1 mmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 4 µl ilave edilerek Fenton reaksiyonu başlatılmış ve tüpler 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Örneklerin yerine saf su ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeren tüpler kör örnek olarak kullanılmış ve reaksiyon kontrolü yapılmıştır. Saf su içeren tüpler negatif kontrol, mannitol içeren tüpler ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüplerdeki karışımlar, ethidium bromür içeren agaroz jel elektroforezine (Thermo, OWL Easycast) tabi tutulmuş ve elde edilen DNA bantlar transillüminatörde izlenmiştir. Elde edilen bantlar, pozitif ve negatif kontrol bantlarına göre değerlendirilmiştir.

Elektroforezde kullanılan agaroz jel için; 100 ml Tris-Borat-EDTA (TBE) bufferı, içerisine 1 g agaroz (Sigma) ilave edilerek mikrodalga fırında kaynayanaya kadar ısıtılmıştır. Daha sonra soğuması için oda sıcaklığında bekletilen jel, 45-50°C'ye geldiğinde, içine önceden hazırlanmış % 1'lik ethidium bromürden 2 µl ilave edilmiştir. Ethidium bromür ilave

edilen jel karıştırılarak yatay elektroforez kalıbına dökülmüş ve tarakları yerleştirilerek katılaşması için oda sıcaklığında bekletilmiştir.

### **3.2.5.2.6. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi**

#### **3.2.5.2.6.1. Minimum İnhibasyon Konsantrasyonu (MiK) Belirlenmesi**

Müller hinton broth besiyerinde canlandırılan *Salmonella typhimurium* (ATCC 51812), *Bacillus cereus* (ATCC 7464), *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşlarından öncelikle 0,5 McFarland bulanıklığında tamponlanmış saf su içerisine pasajlar yapılmıştır. Yaklaşık olarak  $10^7$  civarında canlı hücre içeren bu tüplerden 96 kuyu well-plate'lere pasajlar yapılmıştır. Daha sonra bu kuyuların üzerine çalışmada elde edilen ekstrakt ve bileşiklerin 40 mg/ml den başlayarak 0,1 mg /ml seri seyreltimleri yapılarak hücre ihtiva eden kuyulara eklenmiştir. 24 saat 37°C'de inkübasyon sonrasında, 96 well-plate'ler Thermo Elisa cihazında 540 nm ve 600 nm dalga boylarında ölçülmüş ve kontrol grubuna göre kıyaslanarak antimikrobiyal etkinin görüldüğü konsantrasyonlar minimum inhibasyon konsantrasyonu olarak belirlenmiştir.

Minimum inhibasyon konsantrasyonu belirlenmesi amacıyla kullanılan 96 well-plate metoduna ilave olarak kontrol amaçlı makro tüp dilüsyon metodu da örneklere uygulanmıştır (CLSI, 2006). Metoda göre bulanıklığın az ya da hiç görülmediği konsantrasyonların birer üst seyreltimlerinden (daha az yoğunlukta bileşik içeren) başlayarak tüplere bileşiklerin ilavesi yapılmış ve 24 saat 37°C'de inkübasyona tabii tutulmuştur. Başlangıç yükleri inkübasyon öncesi hepsinde aynı olan tüpler 24 saat inkübasyon sonrası çıkarılarak, Müller Hinton Agar bulunan petrilere, vorteks sonrası 5 µl alınarak geçişi yapılmıştır. 24 saat 37°C'de inkübasyon sonrası, hem tüplerdeki bulanıklık, hem de petrilere üreme durumu göz önünde bulundurularak minimum inhibasyon konsantrasyonu ve bakteriyostatik etki konsantrasyonları belirlenmiştir.

#### **3.2.5.2.6.2. Disk Difüzyon Yöntemi ile Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi**

Antimikrobiyal etkinin incelenmesi amacıyla disk difüzyon metodu da kullanılmıştır. Bir gece önceden Müller Hinton Agar'da hazırlanan bakteri kültürlerinden (18-24 saat) öze yardımıyla bakteri kolonileri alınarak içerisinde steril fizyolojik su bulunan tüplere ilave edilmiş ve 0,5 McFarland bulanıklığına ulaşana kadar hücre ilavesi veya fizyolojik su ilavesi yapılarak ayarlama yapılmıştır. 0,5 McFarland'a ayarlanan tüplerden steril swap çubuğuyla alınan bakteri hücreleri Müller Hinton Agar besiyerine yayma suretiyle ekimleri yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra 0,2 µl PTFE şırınga filtreden geçirilen steril hidrolizat ve diğer

örnekler minimum inhibasyon konsantrasyonunda belirlenen konsantrasyonlarda steril disklerle emdirilmiştir. Emdirilen diskler ve ticari olarak elde edilebilen standart antibiyotik ajanları ihtiva eden diskler, ekimi yapılan petriyer üzerine steril pens yardımıyla yerleştirilmiş ve 35°C’de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrası, disklerin etrafında gözlemlenen üreme gerçekleşmemiş alanlar, disklerin merkezinden başlayarak üremenin görüldüğü noktaya kadar oluşan dairenin çapı cetvel yardımıyla mm bazında ölçülmüştür. Daha sonra ölçülen bu çaplar, uluslararası standartlarda belirtilmiş çaplar ve standart antibiyotik ajanların çaplarıyla karşılaştırılarak ürünlerin antimikrobiyal etkisi belirlenmiştir (CLSI, 2006).

### **3.2.6. İstatistiksel Analiz**

Besin kompozisyonu bulguları, hidrolizasyon derecesi, fonksiyonel ve biyoaktif özellik bulguları standart sapma ile verilmiş ( $s\pm$ ) ve ANNOVA testine tabi tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar  $p < 0,05$  olarak gösterilmiş ve tüm analizler SPSS (ver. 13) (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

## BÖLÜM 4

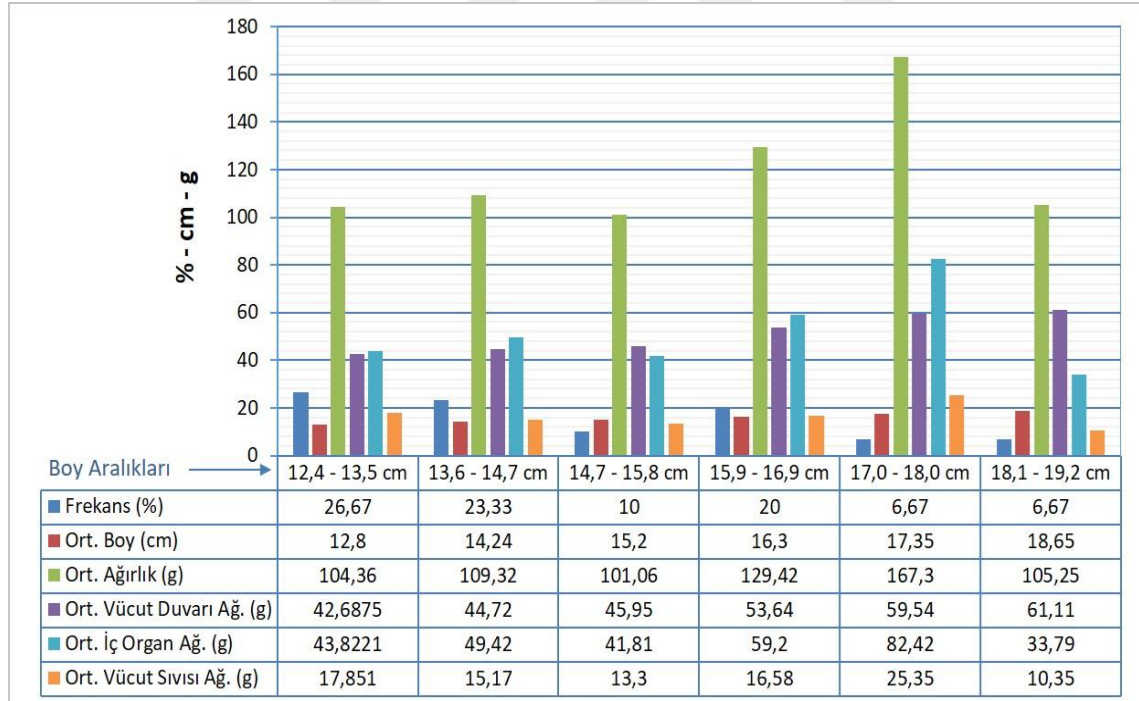
### ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu çalışmada; vücut duvarı, iç organlar ve vücut sıvısı olmak üzere üç gruba ayrılan *Holothuria tubulosa* örneklerinin gıda olarak niteliği, besin kompozisyonu açısından incelenmiş, bununla beraber vücut gruplarına ekstraksiyon, izolasyon ve hidrolizasyon işlemleri gerçekleştirilerek elde edilen numunelerde; fonksiyonel ve biyoaktif özellikler araştırılmıştır.

#### 4.1. Deniz Hıyarının Morfolojik ve Besin Özelliklerine Ait Bulgular

##### 4.1.1. Morfolojik Ölçümler

Araştırmada kullanılan deniz hıyarlarının besin kompozisyonlarının morfolojik özelliklerle ilişkisinin net bir şekilde ortaya konulması için örneklerin; boy-ağırlık, vücut sıvısı, vücut duvarı ve iç organ ağırlıkları belirlenmiş, elde edilen veriler Şekil 4.1'da özetlenmiştir.



Şekil 4.1. *Holothuria tubulosa* örneklerine ait biyometrik ölçümler ve frekanslarının boy uzunluğuna göre dağılımları (n: 100)

Araştırmada kullanılan *Holothuria tubulosa* örneklerinin boy ve ağırlık değerleri 12,51 -18,12 cm ve 71,69 – 138,81 g olarak tespit edilmiş, ortalama boy değeri  $14,93 \pm 0,32$  cm ve ortalama ağırlık değeri  $114,23 \pm 4,92$  g olarak belirlenmiştir. *H. tubulosa* türü daha

çok Atlantik Okyanusunun Avrupa kıyıları ile Akdeniz, Ege ve Karadeniz kıyılarında lokalize bir tür olduğundan ve bu bölgelerde son yıllarda tanınmaya başlamış ve hakkında oldukça az sayıda bilimsel çalışma yapılmıştır. Ege Denizi'nde bu tür ile yapılan bir çalışmada, 754 örneğe ait boy ve ağırlıkların 8,00 – 26,00 cm ve 30,00 – 211,00 g arasında tespit edildiği bildirilmiştir (Gonzalez-Wangüemert ve ark., 2014). Yine Ege Denizi'nde yapılan başka bir çalışmada ise ortalama boy-ağırlık değerleri sırasıyla 13,80 - 49,40 cm ve 69,50 – 535,47 g aralığında bildirilmiştir (Kazanidis ve ark., 2010). Çanakkale Boğazında bu tür ile yapılan bir çalışma bulunmaktadır. Dereli ve ark. (2016)'nın yaptığı bu çalışmada, 598 adet *H. tubulosa* örneğinde ağırlık ve boy değerleri sırasıyla 6,1 - 127 g ve 5,6 - 30,3 cm olarak aralığında bildirilmiştir. Diğer araştırmacıların rapor ettiği boy ağırlık verileri ile bu çalışmada elde edilen veriler paralellik göstermektedir.

Araştırmada kullanılan *H. tubulosa* örneklerinin vücut duvarı, iç organlar ve vücut sıvısı ağırlıklarına ait değerler 29,32 – 59,10 g, 19,18 – 72,62 g, 3,45 – 32,41 g aralığında bulunmuştur. Ortalama değerler ise sırasıyla, 48,24±2,08 g, 49,77±3,58 g, 16,21±1,51 g olarak tespit edilmiştir. *H. tubulosa*' ile yapılan önceki çalışmalarda araştırmacılar sadece vücut duvarına ait veri tespiti yapmış, Çanakkale Boğazı'nda vücut duvarı ağırlığı 36-58 g aralığında (Dereli ve ark., 2016). Ege denizinde ise 20,3-164,43 g (Vafeiadou ve ark., 2010) ve 39,5-226,4 g (Kazanidis ve ark., 2010) olarak rapor edilmiştir. *H. tubulosa* türüne ait tespit edilen bu değerlerin bu çalışma verileri ile uyum içerisinde olduğu belirlenmiştir.

Vücut sıvısı ağırlığı ile ilgili ise diğer deniz hıyarı türlerinde çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin *Apostichopus japonicus* türü ile yapılan bir çalışmada 0-15 cm boy ve 100-150 g ağırlığa sahip ait örneklerden 5-10 ml vücut sıvısı toplandığı rapor edilmiştir (Xing ve ark., 2008). *Holothuria leucospilota* türü üzerine yapılan başka bir çalışmada ise vücut sıvısı miktarı 40-60 ml arasında elde edildiği bildirilmiştir (Xing ve ark., 1998). Bu çalışmada *H. tubulosa*'nın vücut sıvısı ağırlığı ise 10,35-20,35 g aralığında belirlenmiştir. Vücut sıvısı miktarı aynı türde, aynı boy ve ağırlıkta dahi farklı yaşam ortamları ve şartlarına bağlı olmak üzere değişebilmektedir. Bu sebeple araştırmacılar, örnekleri ön şartlandırma havuzlarında dinlendirerek çalışmalarını sürdürmekte, canlının fizyolojik olarak belli bir durumda stabil kalması sağlanmaktadır. Dolayısıyla bu çalışma da dahil tüm çalışmalarda tespit edilen sıvı ağırlık verilerinin farklılık göstermesi normal karşılanmaktadır.

#### **4.1.2. Besin Kompozisyonu**

Deniz hıyarının genellikle vücut duvarı besin olarak tüketilmekte, iç organ ve

gonadların tüketim oranı düşük düzeyde ve yerel olarak gerçekleşmektedir. Vücut sıvısının ise açık deniz balıkçılığı sırasında balıkçılar tarafından tonik olarak tüketildiği bildirilmektedir. Bu nedenle yapılan bu çalışmada, *H. tubulosa*'nın besin kompozisyonu; vücut duvarı, iç organlar ve vücut sıvısı olmak üzere üç ayrı kısımda incelenmiş ve elde edilen bulgular mevsimsel değişimleri ile beraber Çizelge 4.1'de özetlenmiştir.

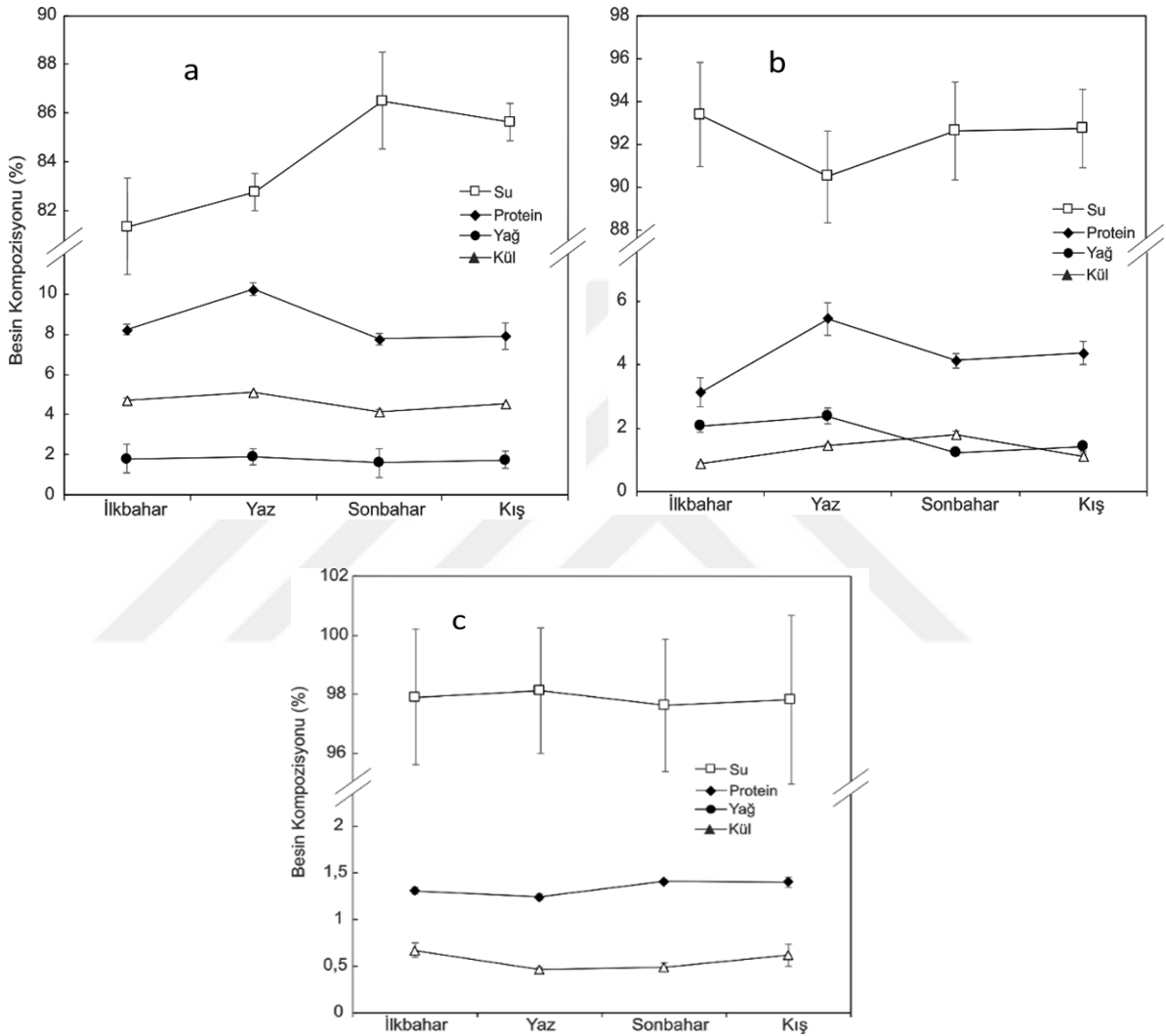
Çizelge 4.1. *Holothuria tubulosa*'nın besin kompozisyonu değerleri (%)

		İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış
Vücut Duvarı		81,37±1,97 <sup>b</sup>	82,77±0,76 <sup>ab</sup>	86,51±1,97 <sup>a</sup>	85,64±0,76 <sup>a</sup>
İç Organ	Su	93,38±2,43 <sup>a</sup>	90,51±2,14 <sup>b</sup>	92,62±2,28 <sup>a</sup>	92,74±1,85 <sup>a</sup>
Vücut Sıvısı		97,91±2,31 <sup>b</sup>	98,13±2,13 <sup>b</sup>	97,65±2,25 <sup>b</sup>	97,82±2,85 <sup>b</sup>
Vücut Duvarı		8,22±0,26 <sup>b</sup>	10,22±0,32 <sup>a</sup>	7,75±0,30 <sup>b</sup>	7,89±0,65 <sup>b</sup>
İç Organ	Protein	3,12±0,46 <sup>b</sup>	5,44±0,52 <sup>a</sup>	4,12±0,24 <sup>a</sup>	4,36±0,36 <sup>a</sup>
Vücut Sıvısı		1,31±0,04 <sup>ab</sup>	1,24±0,03 <sup>b</sup>	1,41±0,02 <sup>a</sup>	1,40±0,05 <sup>a</sup>
Vücut Duvarı		1,82±0,13 <sup>ab</sup>	1,90±0,01 <sup>a</sup>	1,61±0,13 <sup>b</sup>	1,76±0,01 <sup>ab</sup>
İç Organ	Yağ	2,05±0,17 <sup>a</sup>	2,37±0,25 <sup>a</sup>	1,23±0,08 <sup>b</sup>	1,42±0,15 <sup>ab</sup>
Vücut Sıvısı		-	-	-	-
Vücut Duvarı		4,72±0,71 <sup>a</sup>	5,10±0,41 <sup>a</sup>	4,14±0,71 <sup>a</sup>	4,52±0,41 <sup>a</sup>
İç Organ	Kül	0,88±0,04 <sup>b</sup>	1,43±0,07 <sup>a</sup>	1,81±0,11 <sup>a</sup>	1,11±0,09 <sup>ab</sup>
Vücut Sıvısı		0,67±0,08 <sup>a</sup>	0,46±0,03 <sup>b</sup>	0,49±0,05 <sup>b</sup>	0,62±0,12 <sup>a</sup>

- : tespit edilememiştir. Değerler üç tekrürde ortalama ± Ss (Standart sapma) olarak verilmiştir. Aynı satırda farklı üst simgeler istatistiki açıdan farkın önemli olduğunu ifade etmektedir (p<0,05)

Bu çalışmada *H. tubulosa*'nın vücut duvarına ait besin bileşenleri sırasıyla, su % 81,37- % 86,51, protein 7,75- 10,22, yağ % 1,61-1,90 kül miktarı ise % 4,14-5,10 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada mevsimlerin, vücut duvarı su, protein ve yağ miktarı üzerine önemli etkisinin olduğu (p<0,05), ancak kül miktarına bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05). *H. tubulosa* ile yapılan diğer çalışmalarda ise vücut duvarı su, protein, yağ ve kül değerleri % 84-86, % 7,2-8,2, % 0,11-0,16 ve % 7,4- 7,6 aralığında bildirilmiştir (Çaklı ve ark., 2004; Aydın ve ark., 2011; Sicura ve ark., 2012). Araştırmacıların bulguları bu çalışmada tespit edilen bulgular ile paralellik göstermektedir, ancak yaz mevsimindeki protein ve ham yağ miktarlarının diğer çalışmalarda rapor edilen miktarlardan fazla olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeninin yapılan çalışmalarda örneklemelerin tek seferlik ve bahar aylarında yapılmasından kaynaklandığı

düşünülmüştür. Bu çalışmada istatistiki açıdan da yaz mevsimindeki besin kompozisyonu değerlerinin, diğer mevsimlerden önemli derecede farklı olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Dolayısıyla *H. tubulosa*'ya ait olan diğer araştırmacıların bulguları da farklılık göstermekte, yaz mevsimindeki su sıcaklığı ve beslenmedeki optimum durumun, canlının besin kompozisyonuna etkisi, sonuç olarak ortaya çıkmaktadır.



Şekil 4.2. *Holothuria tubulosa*'nın vücut duvarı (a), iç organ (b) ve vücut sıvısı (c)'na ait besin kompozisyonu bulgularının mevsimsel değişimi

İç organların besin bileşenleri su %90,51 – 93,38, protein % 3,12- % 5,44, ham yağ içeriği %1,23 -%2,37, kül miktarı %0,88-0,81 arasında tespit edilmiştir. İç organların makro besin bileşenlerinde mevsimsel açıdan önemli derece farklılık tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Vücut sıvısında besin bileşenlerinin oranı; % 97,65 - %98,13 su, % 1,24 – % 1,41 protein ve %0,46 - % 0,67 kül miktarı olarak belirlenmiş, yağ içeriği ise tespit edilememiştir. Vücut sıvısı besin kompozisyonu değerlerinde mevsimlere göre istatistiki



açından önemli farklılık bulunmuştur (Şekil 4.2) ( $p < 0,05$ ). Deniz hıyarının iç organ ve vücut sıvısının besinsel özelliği, çeşitli araştırmacılar tarafından da farklı türlerde incelenmiştir. Örneğin, Mamelona ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, Atlantik deniz hıyarı olarak bilinen *Cucumaria frondosa*'nın iç organlarına ait su, protein, yağ ve kül miktarlarını sırasıyla, %92,3, %4,5, %2,0 ve %0,7 olarak bildirilmiştir. Aynı tür ile yapılan bir başka çalışma da ise iç organlarının toplam su, protein, yağ ve kül miktarları % 90,1, % 5,11, % 0,70 ve % 3,03 olarak rapor edilmiştir (Zhong ve ark., 2007). *Apostichopus japonicus* türü ile yapılan başka bir çalışma da ise, iç organlarının besin bileşenleri % 80 - 88 su, % 1 - 4 protein, % 0,6 - 1,3 yağ, % 5,34 - 6,85 kül olarak belirlenmiştir (Lee ve ark., 2012). Bu çalışmada *H. tubulosa*'dan elde edilen veriler araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermekte, sadece *H. tubulosa*'nın iç organlarında diğer türlere göre fazla yağ içeriği bulunmaktadır. Bunun nedeninin tür, yaşama ortamı ve beslenme rejiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Benzer farklılık vücut sıvısındaki protein miktarında da göze çarpmakta, *H. tubulosa* türünde tespit edilen % 1,24 – % 1,41 lük protein içeriği, *Stichopus badionotus*, *Stichopus variegatus* ve *Bohadschia mamorata* türlerinde sırasıyla, % 0,18, % 0,21 ve % 0,72 olarak belirlendiği ifade edilmektedir (Hawa ve ark., 1999).

#### 4.1.3. Amino Asit Kompozisyonu

Deniz hıyarı vücut duvarı ve iç organlarının amino asit kompozisyonu ve dağılımları Çizelge 4.2'de özetlenmiştir. Amino asit kompozisyonu gıdalardaki protein kalitesinin belirlenmesinde önemli bir faktör olarak bilinmektedir. Genel anlamda, yüksek protein içeriğine sahip gıdalar aynı zamanda esansiyel ve toplam amino asit bakımından da yüksek içeriğe sahip olarak bilinmektedir (Wu, 2009). Bu çalışmada toplam amino asit miktarı 100 g deniz hıyarı etinde 8,10 ila 9,80 g arasında belirlenmiş, glisin ve alanin baskın asitler olarak tespit edilmiştir. Deniz hıyarları değerli amino asitleri, farklı oranlarda kombine olarak bünyesinde barındırmaktadır. Glisin birçok türde baskın amino asit olarak (5,57 – 12,5 g/100g) rapor edilmiş, diğer amino asitler ise sırasıyla; glutamik asit (4,69 - 7,31 g/100g), aspartik asit (3,48 – 5,06 g/100g), alanin (2,95 - 5,77 g/100g) ve arjinin (2,71- 4,95 g/100g) olarak bildirilmiştir (Wen ve ark., 2010; Bechtel ve ark., 2012; Haider ve ark., 2015). *H. tubulosa* türüne ait Adriyatik Denizi'nde yapılan bir çalışmada ise, glisin (% 10,36) ve glutamik asit (% 8,3) en fazla bulunan asitler olarak bildirilmiştir (Sicuro ve ark., 2012). Aynı çalışmada esansiyel amino asitler arasındaki baskın asitlerin ise, bu çalışmada da tespit edildiği gibi, treonin ve valin'in olduğu ifade edilmiştir.

Çizelge 4.2. *Holothuria tubulosa* vücut duvarının amino asit kompozisyonu

	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış
<b>Esansiyel Amino Asitler (g/100g)</b>				
Histidin (His)	0,10 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,11 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,01 <sup>a</sup>
İzolösin (Ile)	0,25 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>a</sup>
Lösin (Leu)	0,38 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,02 <sup>a</sup>
Lisin (Lys)	0,02 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,03 ± 0,02 <sup>a</sup>
Methiyonin (Met)	0,16 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>a</sup>
Fenilalanin (Phe)	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>a</sup>
Triptofan (Trp)	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>
Treonin (Thr)	0,92 ± 0,03 <sup>ab</sup>	1,07 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,84 ± 0,04 <sup>bc</sup>
Valin (Val)	0,42 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,04 <sup>a</sup>
Toplam Esansiyel Amino Asitler	2,50 ± 0,04 <sup>ab</sup>	2,76 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,18 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,36 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>Esansiyel Olmayan Amino Asitler (g/100g)</b>				
Aspartik Asit (Asp)	0,63 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,67 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,60 ± 0,00 <sup>c</sup>
Alanin (Ala)	1,65 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,44 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,50 ± 0,08 <sup>a</sup>
Arjinin (Arg)	0,54 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,05 <sup>a</sup>
Sistin (Cys)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glutamik Asit (Glu)	0,81 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,91 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,72 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,01 <sup>a</sup>
Glisin (Gly)	1,72 ± 0,25 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,20 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,35 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,29 <sup>a</sup>
Hidroksiprolin (Hyp)	0,05 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,07 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,00 <sup>b</sup>
Prolin (Pro)	0,54 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,51 ± 0,09 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,12 <sup>a</sup>
Serin (Ser)	0,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,03 <sup>a</sup>
Tyrozün (Tyr)	0,35 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,39 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,32 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,33 ± 0,03 <sup>a</sup>
Toplam Esansiyel Olmayan Amino Asitler	6,56 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,04 ± 0,14 <sup>a</sup>	5,92 ± 0,00 <sup>a</sup>	6,04 ± 0,08 <sup>a</sup>
Toplam Amino Asit	9,06 ± 0,08 <sup>a</sup>	9,80 ± 0,09 <sup>a</sup>	8,10 ± 0,05 <sup>a</sup>	8,40 ± 0,07 <sup>a</sup>
EAA/EOAA	0,38	0,39	0,37	0,39

Değerler g/100 g toplam amino asit olup, iki tekrerrün ortalama ± SD (standart sapma) değerleridir (n=2) Aynı satırda farklı harfler istatistiki açıdan önem taşıyan farklılığı ifade etmektedir (p<0,05) EAA: Esansiyel amino asitler, EOAA; Esansiyel olmayan amino asitler

Canlının türü, yaşadığı ortam, beslenme, üreme ve avlandığı zaman besin bileşenlerine etki eden önemli unsurlardır. Mevsimlere bağlı olarak amino asit kompozisyonundaki değişimler incelendiğinde, bu çalışmada toplam amino asit miktarının en fazla yaz mevsiminde (9,80 g/100g), en düşük ise sonbahar mevsiminde (8,10 g/100g) olduğu tespit edilmiştir (p>0,05). Bazı amino asitlerin ise, treonin, aspartik asit ve hidroksiprolin, mevsimsel açıdan önemli farklılıklar gösterdiği bulunmuştur (p<0,05).

Besinlerde esansiyel amino asitlerin, esansiyel olmayanlara oranı, sağlığı optimize eden ve protein yararlanımını ifade eden “ideal protein” in göstergesi olarak kabul görmektedir (Wu, 2009). Bu çalışmada EAA: EOAA oranı 0,37 ila 0,39 arasında değerlerde belirlenmiştir. Bu oran, Sicuro ve ark. (2012) tarafından *Holothuria tubulosa*

için 0,40 olarak bildirilmiş, farklı türlere ait diğer çalışmalarda ise bu oranın 0,25 ila 0,60 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Wen ve ark., 2010; Omran, 2013). Çalışmamızda tespit edilen amino asit bulgularının genel anlamda yapılan çalışmalarda rapor edilen değerler içerisinde olduğu görülmüştür.

#### 4.1.4. Yağ Asidi Kompozisyonu

Yağlar fosfolipidler, trigliseritler ve steroidler olmak üzere üç gruptan oluşmakta su ürünlerinde yağlar genel olarak % 0,1-25 aralığında bulunmaktadır. Bu canlılarda yağ asitleri sayılarla karakterize edilmekte, içeriğini temelde doymamış yağ asitleri (UFA) oluşturmaktadır. Su ürünleri genel anlamda % 20 doymuş ve % 80 doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır. Bu çalışmada makro omurgasız bir canlı olan *Holothuria tubulosa*'nın vücut duvarı örneklerinden elde edilen yağ asidi kompozisyonu Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. *Holothuria tubulosa* vücut duvarının yağ asidi kompozisyonu

Yağ Asidi	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış
C12:0	n.d. <sup>c</sup>	n.d. <sup>c</sup>	0,62 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,21 ± 0,02 <sup>b</sup>
C14:0	0,70 ± 0,09 <sup>c</sup>	1,23 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,92 ± 0,25 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,13 <sup>b</sup>
C15:0	0,37 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,22 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,03 <sup>c</sup>
C16:0	12,49 ± 0,12 <sup>b</sup>	8,78 ± 0,35 <sup>c</sup>	12,57 ± 0,06 <sup>b</sup>	13,87 ± 0,11 <sup>a</sup>
C17:0	1,81 ± 0,08 <sup>b</sup>	2,29 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,14 <sup>c</sup>	1,42 ± 0,12 <sup>c</sup>
C18:0	8,45 ± 0,45 <sup>a</sup>	9,45 ± 0,67 <sup>a</sup>	7,03 ± 0,38 <sup>b</sup>	5,98 ± 0,23 <sup>b</sup>
C20:0	2,60 ± 0,05 <sup>b</sup>	2,21 ± 0,21 <sup>c</sup>	2,41 ± 0,02 <sup>bc</sup>	3,78 ± 0,13 <sup>a</sup>
C21:0	2,31 ± 0,06 <sup>b</sup>	3,09 ± 0,29 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,04 <sup>c</sup>	1,47 ± 0,03 <sup>c</sup>
C22:0	9,45 ± 0,11 <sup>b</sup>	14,17 ± 1,30 <sup>a</sup>	7,75 ± 0,04 <sup>bc</sup>	6,52 ± 0,06 <sup>c</sup>
C23:0	0,52 ± 0,05 <sup>bc</sup>	0,40 ± 0,18 <sup>c</sup>	1,03 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,75 ± 0,09 <sup>ab</sup>
C24:0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ΣSFA	38,72 ±	42,85 ± 2,90 <sup>a</sup>	37,04 ± 1,07 <sup>b</sup>	35,57 ± 0,80 <sup>b</sup>
C14:1	0,68 ± 0,06 <sup>b</sup>	1,24 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,17 <sup>c</sup>	0,32 ± 0,08 <sup>c</sup>
C15:1	0,54 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,05 <sup>d</sup>	0,45 ± 0,01 <sup>c</sup>
C16:1	3,72 ± 0,07 <sup>b</sup>	2,18 ± 0,07 <sup>c</sup>	4,20 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,10 ± 0,09 <sup>a</sup>
C17:1	1,10 ± 0,06 <sup>b</sup>	2,10 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,08 <sup>c</sup>	0,35 ± 0,05 <sup>c</sup>
C18:1n9 <sub>c</sub>	9,95 ± 0,43 <sup>b</sup>	10,73 ± 0,26 <sup>b</sup>	12,88 ± 1,19 <sup>a</sup>	11,41 ± 0,56 <sup>ab</sup>
C18:1n9 <sub>t</sub>	0,52 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,07 <sup>ab</sup>	0,44 ± 0,06 <sup>ab</sup>	0,35 ± 0,04 <sup>b</sup>
C20:1n9	2,96 ± 0,35 <sup>b</sup>	2,00 ± 0,08 <sup>c</sup>	3,29 ± 0,40 <sup>ab</sup>	4,10 ± 0,45 <sup>a</sup>
C22:1n9	1,90 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,46 ± 0,06 <sup>c</sup>	2,02 ± 0,14 <sup>b</sup>	2,72 ± 0,16 <sup>a</sup>
C24:1n9	4,85 ± 0,35 <sup>b</sup>	7,46 ± 0,48 <sup>a</sup>	3,92 ± 0,17 <sup>c</sup>	2,78 ± 0,21 <sup>d</sup>
ΣMUFA	26,22 ± 1,41 <sup>a</sup>	28,33 ± 1,03 <sup>a</sup>	27,90 ± 2,22 <sup>a</sup>	26,58 ± 1,63 <sup>a</sup>

Çizelge 4.3'ün devamı

C18:2n6c	4,84 ± 0,34 <sup>b</sup>	3,42 ± 0,42 <sup>c</sup>	5,92 ± 0,38 <sup>a</sup>	5,41 ± 0,41 <sup>ab</sup>
C18:2n6t	n.d. <sup>c</sup>	n.d. <sup>c</sup>	1,83 ± 0,20 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,09 <sup>b</sup>
C20:2	2,42 ± 0,12 <sup>b</sup>	3,16 ± 0,20 <sup>a</sup>	2,03 ± 0,14 <sup>c</sup>	1,92 ± 0,11 <sup>c</sup>
C22:2	3,41 ± 0,21 <sup>b</sup>	4,19 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,58 ± 0,27 <sup>d</sup>	2,56 ± 0,18 <sup>c</sup>
C18:3n3	0,78 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,39 ± 0,03 <sup>a</sup>	1,03 ± 0,04 <sup>b</sup>	1,35 ± 0,05 <sup>b</sup>
C18:3n6	2,36 ± 0,16 <sup>b</sup>	2,89 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,82 ± 0,18 <sup>c</sup>	1,98 ± 0,09 <sup>c</sup>
C20:3n3	1,78 ± 0,13 <sup>b</sup>	2,09 ± 0,12 <sup>a</sup>	1,52 ± 0,12 <sup>b</sup>	1,55 ± 0,11 <sup>b</sup>
C20:3n6	2,13 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,64 ± 0,09 <sup>b</sup>	1,67 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,80 ± 0,11 <sup>ab</sup>
C20:4n6	6,41 ± 0,39 <sup>a</sup>	3,06 ± 0,27 <sup>b</sup>	6,75 ± 0,90 <sup>a</sup>	7,89 ± 0,92 <sup>a</sup>
C20:5n3	4,98 ± 0,48 <sup>a</sup>	3,25 ± 0,21 <sup>b</sup>	4,12 ± 0,55 <sup>ab</sup>	5,12 ± 0,51 <sup>a</sup>
C22:6n3	5,97 ± 0,52 <sup>ab</sup>	4,72 ± 0,83 <sup>b</sup>	6,78 ± 0,64 <sup>a</sup>	7,40 ± 0,75 <sup>a</sup>
ΣPUFA	35,07 ±	28,80 ± 1,99 <sup>b</sup>	35,05 ± 3,49 <sup>ab</sup>	37,85 ± 3,23 <sup>a</sup>
Σn3	13,51 ±	10,45 ± 1,13 <sup>b</sup>	13,45 ± 1,32 <sup>a</sup>	15,42 ± 1,37 <sup>a</sup>
Σn6	15,73 ± 0,66 <sup>a</sup>	11,01 ± 0,71 <sup>b</sup>	17,99 ± 1,76 <sup>a</sup>	17,95 ± 1,58 <sup>a</sup>
n3 : n6	0,86	0,95	0,5	0,86
n6 : n3	1,17	1,06	1,34	1,16

Değerler % toplam yağ asidi olup, üç tekrarın ± SD (standart sapma) ortalama değerleridir (n = 3)  
n.d.; Belirlenmemiştir. Aynı satırda farklı harfler istatistikî açıdan önem taşıyan farklılığı ifade etmektedir (p<0,05)

Çalışmada beklenildiği gibi, *H. tubulosa*'ya ait doymamış yağ asitleri (UFA) (% 57-64), doymuş yağ asitleri (SFA)'nden (% 35-42) daha fazla miktarda tespit edilmiştir. Doymuş yağ asitlerinden palmitik asit (C16) (ort. % 12) baskın doymuş yağ asidi (SFA) olarak belirlenmiştir. Doymamış yağ asitleri arasında ise tekli doymamış yağ asidi (MUFA) olan oleik asit (C18) (ort. % 11), çoklu doymamış yağ asitleri arasında n-3 serisi yağ asitleri olarak bilinen araşidonik asit (C20:4) (ort. % 6) ve dokosaheksanoik asit (C22:6) (ort. % 6), vücut duvarında en bol bulunan (PUFA) olarak tespit edilmiştir.

Deniz hıyarı türlerinin besinsel nitelikleri ile çalışan bir çok araştırmacı, vücut duvarında yaptıkları analizlerde, dominant yağ asitlerini; doymuş yağ asidi olarak palmitik asit, tekli doymamış yağ asidi olarak oleik ve çoklu doymamış yağ asidi olarak da eikosapentaenoik asit şeklinde bildirmiştir (Fredalina ve ark., 1999; Zhong ve ark., 2007; Wen ve ark., 2010; Yahyavi ve ark., 2012). Bu çalışmalar arasında, Fredalina ve ark. (1999) *Stichopus chloronotus*'tan ekstrakte ettikleri majör yağ asitlerini sırasıyla % 25 eikopentaenoik asit (C20:5), % 21 oleik asit (C18:1), % 12 linoleik asit (C18:2), % 12 palmitik asit (C16:0) ve %12 steraik asit (C18:0) olarak bildirmiştir. Zhong ve ark. (2007) ise *Cucumaria frondosa*'nın majör yağ asitlerini sırasıyla %43 eikopentaenoik asit (C20:5), % 7 palmitoleik asit (C16:1), % 5 heksadekatetraenoik asit (C16:4 n-3) ve % 4 oleik asit

(C18) olarak ifade etmişlerdir. *H. tubulosa* türünde ise yağ asitleri ile çalışan araştırmacılar majör yağ asitlerini; eikosatrienoik asit (C20:3n3) (% 0,5- 21), dokoheksanoik asit (C22:6n3) (% 5-15), araşidonik asit (C20:4n6) (% 0 – 14), linolenik asit (C18:3n3) (% 0,5 – 11) olarak bulmuşlardır (Aydın ve ark., 2011; Sicuro ve ark., 2012). Bu çalışmada ise majör yağ asitleri palmitik asit C16 (%8-13), steraik asit C18 (%6-9), behenik asit C22 (%7-14) ve oleik asit C18:1n9 (%10-12) olarak tespit edilmiş ve diğer araştırmacıların çalışma sonuçları ile farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu farklılıkların en önemli nedeni; bu canlının yaşama alanındaki farklı besin kaynakları ve değişen çevresel faktörlerin yağ asidi kompozisyonu ve miktarını etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Fredalina ve ark., 1999; Ginger ve ark., 2000). Bu çalışmada özellikle mevsimler arasında oluşan farklılıklar istatistiki açıdan da değerlendirilmiş ve önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ), (Çizelge 4.3).

Majör yağ asitleri ve miktarlarında tespit edilen farklılıklar, aynı şekilde, toplam yağ asidi miktarlarının dağılımında da tespit edilmiştir. Bu çalışmada, *H. tubulosa*'ya ait  $\Sigma$ SFA,  $\Sigma$ MUFA ve  $\Sigma$ PUFA ile n3:n6 değerleri sırasıyla %35-43, %26-28, %29-38 ve 0,5-0,95 olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen değerler, önceki çalışmalarda *H. tubulosa* ve diğer türlere ait bulgulardan farklılık göstermektedir. *H. tubulosa*'nın aynı familyaya ait türlerden dahi farklı toplam yağ asidi miktarlarına sahip olduğu görülmüştür. Yahyavi ve ark. (2012)  $\Sigma$ SFA,  $\Sigma$ MUFA ve  $\Sigma$ PUFA değerlerini *Holothuria scabra*'da sırasıyla %37, %25, %36 ve *Holothuria leucospilota*'da ise %34, %30, %35 olarak bildirmiştir. Aynı araştırmacılar n3:n6 oranını *H. scabra* için 0,76, *H. leucospilota* için 1,14 olarak rapor etmiştir. Başka bir çalışmada ise yine bu iki türe ilave olarak *Holothuria atra* ve *Stichopus horrens*'de incelenmiş,  $\Sigma$ SFA,  $\Sigma$ MUFA ve  $\Sigma$ PUFA değerleri, sırasıyla, *H. atra* için %57, %4 ve %38 olarak, *H. leucispilota* için %36, %4 ve %43 olarak bildirilmiştir (Ridzwan ve ark., 2014). Bechtel ve ark. (2012) *Parastichopus californicus*'un vücut duvarı  $\Sigma$ SFA,  $\Sigma$ MUFA,  $\Sigma$ PUFA ve n3:n6 oranı değerlerini sırasıyla %26, %39, %28 ve 1,83 olarak bildirmişlerdir. *H. tubulosa*'ya ait toplam yağ asidi miktarlarının dağılımı ise,  $\Sigma$ SFA,  $\Sigma$ MUFA ve  $\Sigma$ PUFA sırasıyla %14-17, %13-14, %53-62 olarak bildirilmiştir (Aydın ve ark.,2011; Sicura ve ark., 2012). Bu çalışmada yağ asitleri bulgularının, diğer deniz hıyarı türleri ile yapılan çalışmalarda bildirilen değerler arasındaki farklılığın temel nedeninin tür farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir. *H. tubulosa* ile yapılan çalışmalarda bildirilen değerler ile farklılığın en önemli nedenleri ise; aynı türdeki deniz hıyarlarının farklı yağ asidi kompozisyonuna sahip olmalarının ana nedenleri olan, avlanma mevsimi ve bölgesi olduğu düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2017).

#### 4.1.5. Mineral Madde Kompozisyonu

Deniz hıyarı örneklerinde tespit edilen mineraller ve miktarları Çizelge 4.4'te sunulmuştur. Vücut sıvısı örneklerinde bor, demir, selenyum, silisyum, fosfor, sodyum magnezyum ve potasyum tespit edilmiş, diğer minerallere rastlanmamıştır. Bunlar arasında ise silisyum  $302,05 \pm 14,32$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  ile vücut sıvısında en fazla bulunan mineral olarak belirlenmiştir. Vücut duvarı ve iç organ örneklerinde de en bol bulunan iz mineral yine silisyum ( $91136,12$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) olarak tespit edilmiş, makro minerallerde ise her iki örnek gurubunda en fazla sodyum ( $1212,46$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) belirlenmiştir. Silisyum elementi yeryüzünde en çok bulunan elementlerden biridir ve deniz kumunda çok miktarda bulunmaktadır. Bu nedenle, bentik çamurunu sindirim kanalından geçirerek hayatlarını sürdüren deniz hıyarlarında genel olarak silisyumun yüksek oranda bulunması normal karşılanmaktadır (Lowenstam ve Rossman, 1975).

Bu çalışmada vücut duvarı ve iç organlar örneklerinde tespit edilen tüm minerallerin miktarı, bakır, kalay ve kükürt dışında, istatistiki açıdan farklılık göstermiştir ( $p < 0,05$ ) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *Holothuria tubulosa*'da tespit edilen mineraller ve miktarları

Element	Simge	Birim	Vücut Duvarı	İç Organlar	Vücut Sıvısı
Gümüş	Ag	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$<6,89$	$<6,89$	$<6,89$
Alüminyum	Al	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$<0,49^a$	$29703,88 \pm 3019,67^b$	$<0,49^a$
Arsenik	As	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$475,98 \pm 22,99^a$	$<1,38^b$	$<1,38^b$
Bor	B	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$2726,46 \pm 156,30^a$	$1178,33 \pm 67,78^b$	$42,1 \pm 0,12$
Bizmut	Bi	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$<10,43$	$<10,43$	$<10,43$
Kadmiyum	Cd	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$69,70 \pm 6,80^a$	$208,50 \pm 13,96^b$	-
Kobalt	Co	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$20,68 \pm 1,90^a$	$117,86 \pm 6,15^b$	-
Krom	Cr	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$86,76 \pm 2,09^a$	$285,16 \pm 14,89^b$	-
Bakır	Cu	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$839,69 \pm 35,03^a$	$963,40 \pm 32,41^a$	$0,07 \pm 0,01^c$
Demir	Fe	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$548,20 \pm 26,10^a$	$40008,74 \pm 2247,34^b$	-
Mangan	Mn	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$81,74 \pm 4,80^a$	$1092,78 \pm 36,01^b$	$0,03 \pm 0,01^c$
Molibden	Mo	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$<7,37$	$<7,37$	$<7,37$
Nikel	Ni	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$56,27 \pm 4,22^a$	$550,12 \pm 8,37^b$	-
Kurşun	Pb	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$<17,00^a$	$2115,25 \pm 135,66^b$	-
Platin	Pt	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$4,98 \pm 0,25^a$	$162,51 \pm 10,99^b$	-
Antimon	Sb	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$17,38 \pm 1,49^a$	$<6,01^b$	$<6,01^b$
Selenyum	Se	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$306,77 \pm 5,93^a$	$180,54 \pm 11,75^b$	$0,03 \pm 0,01^c$
Silisyum	Si	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$9861,49 \pm 253,31^a$	$91136,12 \pm 4789,22^b$	$302,0 \pm 53,31^c$
Kalay	Sn	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$554,57 \pm 14,29^a$	$325,67 \pm 11,96^a$	-
Titanyum	Ti	$\mu\text{g}/\text{kg}$	$<1,20^a$	$1105,40 \pm 60,60^b$	$<1,20^a$

Çizelge 4.4'ün devamı

Tungsten	W	µg/kg	<10,09	<10,09	<10,09
Çinko	Zn	µg/kg	2173,60±154,76 <sup>a</sup>	5277,24±208,98 <sup>b</sup>	-
Cıva	Hg	µg/kg	175,99±8,06 <sup>a</sup>	122,42±4,45 <sup>b</sup>	-
Fosfor	P	mg/kg	48,75±2,88 <sup>a</sup>	202,28±9,40 <sup>b</sup>	0,16±0,02 <sup>c</sup>
Kükürt	S	mg/kg	543,48±24,48 <sup>a</sup>	540,73±11,45 <sup>a</sup>	-
Sodyum	Na	mg/kg	3902,93±78,37 <sup>a</sup>	1212,46±69,67 <sup>b</sup>	5400,87±52,34 <sup>c</sup>
Magnezyum	Mg	mg/kg	431,24±13,97 <sup>a</sup>	189,26±6,37 <sup>b</sup>	1268,32±18,42 <sup>c</sup>
Potasyum	K	mg/kg	443,64±20,04 <sup>a</sup>	80,16±5,20 <sup>b</sup>	1181,42±38,21 <sup>c</sup>
Kalsiyum	Ca	mg/kg	2807,70±74,74 <sup>a</sup>	460,47±29,79 <sup>b</sup>	998,45±94,74 <sup>a</sup>

n=3, ortalama±std. sapma

Elde edilen bulgular toksik elementler açısından incelendiğinde ise vücut duvarı ve iç organlarda; arsenik, cıva, nikel, kurşun ve kadmiyum tespit edilmiş, arsenik ise sadece vücut duvarı örneklerinde (0,47 mg/kg) saptanmıştır. İç organlarda tespit edilmeyen bu metale vücut duvarında rastlanması, canlının biyolojik aktivitesinde bu metali kullanması ile açıklanabilmektedir. Bazı durumlarda, canlılar, arseniği fosfor kıtlığında depolayabilmekte ve depoladığı bu arseniği fosfor eksikliğinde kullanarak, biyolojik aktivitelerini devam ettirebilmektedir (Eisler, 1988; Peraza ve ark., 1998). Yasal düzenlemelerde arsenik için verilen limit değer, kabuklu ve yumuşakçalar için 1mg/kg olarak ifade edilmiştir (Türk Gıda Kodeksi, 2002). Bu çalışmada tespit edilen arsenik ve diğer toksik metal içerikleri, yasal düzenlemelerde verilen limit değerlerin altında belirlenmiştir. Bu elementlere ait limit değerler ve *H. tubulosa*'da elde edilen bulgular Çizelge 4.5'de karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.5. *Holothuria tubulosa*'da tespit edilen toksik metaller ve ulusal limit değerleri

<i>Element</i>	<i>Tespit Edilen Miktar(mg/kg)</i>	<i>*Limit Değer (mg/kg)</i>
<i>Arsenik</i>	0,47	1
<i>Cıva</i>	0,17	1,0
<i>Nikel</i>	0,06	0,2
<i>Kurşun</i>	<0,02	0,5-1,5
<i>Kadmiyum</i>	0,07	0,5-1

\* Türk Gıda Kodeksi'nin benzer deniz ürünleri için belirlediği limit değerler derlenmiştir

Wen ve Hu (2010) yaptıkları çalışmada, 11 farklı işlenmiş ticari deniz hıyarı türünde mineral madde kompozisyonunu belirlemişler, elde ettikleri bulgularda makro mineralleri sırasıyla, klor, sodyum, kalsiyum, magnezyum ve potasyum olarak rapor etmişlerdir. İz

minerallerden ise, demir, çinko, bakır-manganez, selenyum, krom ve nikel bulunduğunu, toksik metallere ise arsenik (1,1 – 6,1 mg/kg), kadmiyum ve kurşun varlığına rastladıklarını ifade etmişlerdir (Wen ve Hu, 2010). *H. tubulosa*'nın vücut duvarı mineral içeriği, bu çalışmada kullanılan 11 türün vücut duvarı mineral içeriğine, özellikle makro mineral miktarları bakımından, benzerlik göstermiştir. İz elementlerde tespit edilen bazı farklılıkların ise tür farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir.

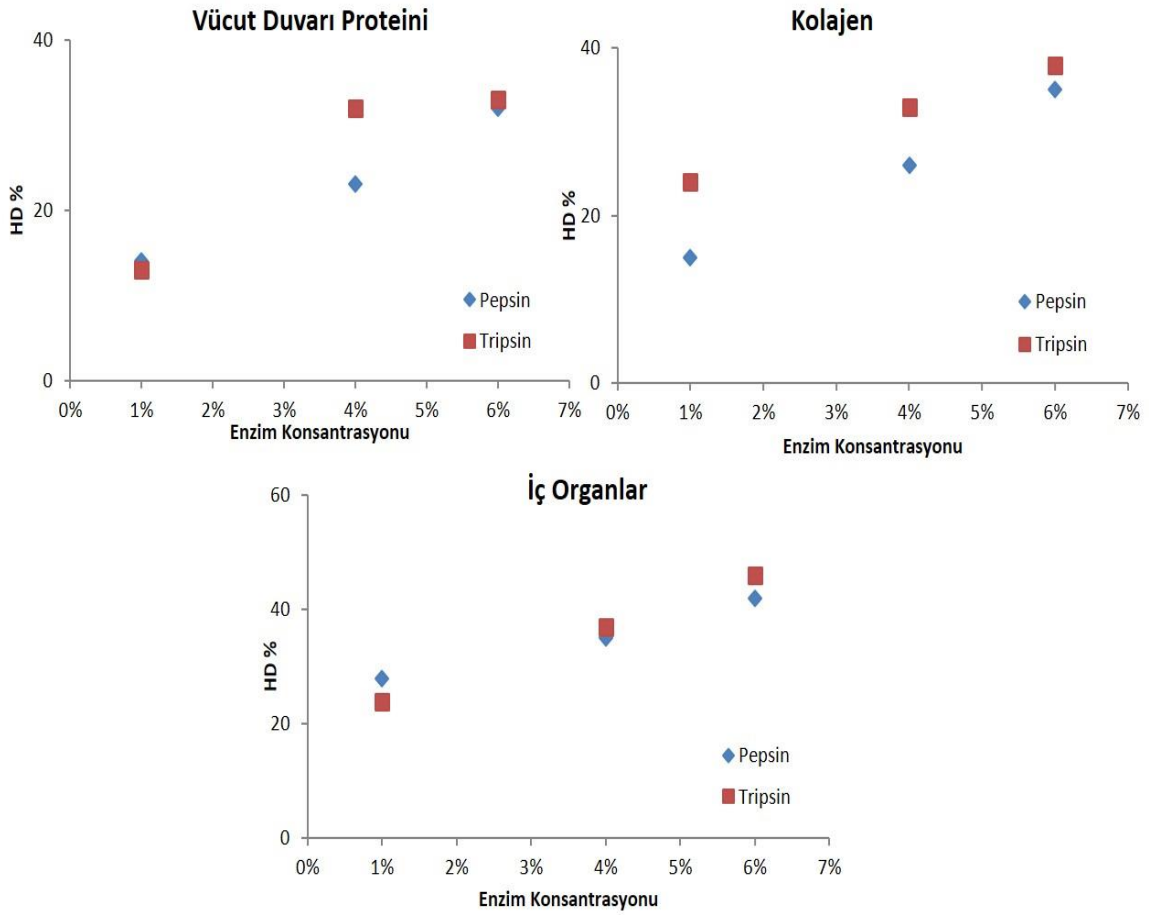
İç organların mineral içeriği ile yapılan bir çalışmada, *Cucumaria frondosa* türü kullanılmış ve makro elementlerin potasyum (18 g/kg), sodyum (12 g/kg), magnezyum (2 g/kg) ve kalsiyumdan (1 g/kg) oluştuğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada iz minerallerin ise başlıca, bakır (220 mg/kg), demir (188 mg/kg) ve çinko (91 mg/kg)'dan, ağır metallerin ise arsenik (9 mg/kg), nikel (3 mg/kg), kurşun ve kadmiyum (0,7 mg/kg)'dan oluştuğu bildirilmiştir (Mamelona ve ark. 2010). Bu çalışmada *H. tubulosa*'nın iç organlarına ait makro mineral bulguları *C. frondosa* türüne benzer bulunmuş, ancak iz mineraller, özellikle ağır metaller ile arasında bazı farklılıklar tespit edilmiştir. Çalışmamızda tespit edilen ağır metallerin, özellikle arsenik miktarı *C. frondosa* için rapor edilen değerden daha düşük seviyede tespit edilmiştir. Bu farklılığın deniz hıyarının direkt olarak yaşadığı bentik ve deniz suyu mineral yapısı ile alakalı olmasından, yanı sıra, türlere göre değişiklik gösteren mineral biriktirme eğiliminden kaynaklandığı düşünülmektedir.

## **4.2. Deniz Hıyarı Protein ve Hidrolizatlarına Ait Bulgular**

### **4.2.1. Hidrolizasyon Derecesi**

Deniz hıyarı vücut duvarı ve iç organlardan protein ve vücut duvarından kolajenin enzim ile hidrolizasyonu işleminde hidrolizasyon verimleri hesaplanmış, değerlendirmelerde her hidroliz aşamasında enzim konsantrasyonu, sabit değişken olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada hidrolizasyon derecesinin belirlenmesi amacıyla elde edilen bulguların sonuçları % HD olarak Şekil 4.3'te sunulmuştur.





Şekil 4.3. *Holothuria tubulosa*'ya ait toplam protein, kolajen ve iç organların farklı enzim konsantrasyonlarında tespit edilen hidrolizasyon dereceleri

Hidrolizasyon derecesi (HD) protein hidrolizatı içindeki ayrılan peptid bağlarının yüzdesi olarak tanımlanmaktadır. Su ürünleri proteinlerinin ticari enzimler ile hidrolizasyonlarının dereceleri, substratın yapısı, enzim-substrat oranı ve hidrolizasyon şartları; tampon, pH ve sıcaklık gibi parametrelere bağlı olarak değişim göstermektedir (Quaglia ve Orban, 1990; Kristinsson ve Rasco, 2000; De Holanda ve ark., 2006). Enzim oranının kısmi olarak artırılması, hidrolizasyon derecesini belirli seviyeye kadar artırırsa da, asıl etkili olanın enzim türü ile substrata uygunluğu olarak ifade edilmektedir (Quaglia ve Orban, 1990).

Bu çalışmada hidrolizasyon amacıyla pepsin ve tripsin enzimleri kullanılmış ve bu enzimlerin katalize etme özelliklerinin en iyi olduğu pH ve sıcaklıklarda (pepsin: pH 2,8-3,2 ve 37°C; tripsin pH 7,8-8,2 37-50°C) hidrolizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Örnekler arasındaki istatistiki ilişki enzim konsantrasyonu ve örnek grupları üzerinden yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre enzim konsantrasyonunun artması ile hidrolizasyon derecesinin genelde arttığı belirlenmiştir. Kullanılan % 6, % 4 ve % 1 enzim

konsantrasyonlarının hidrolizasyon derecesine etkileri tüm gruplarda önemli derecede farklı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). Yalnızca toplam proteinin tripsin ile hidrolizatında kullanılan enziminin %6 veya %4 olması herhangi önemli fark yaratmamıştır ( $p > 0,05$ ). Fonksiyonel ve biyoaktif peptidler ile protein makromoleküllerinin eldesi amacıyla yapılan çalışmalarda hidrolizasyon derecesinin, farklı koşulların denenerek belirlenmesi daha sağlıklı sonuçlar vermektedir. Yapılan çalışmalar arasında, deniz hıyarı proteinlerinin farklı enzim ve konsantrasyonları ile değişen koşullarda hidrolizasyon dereceleri bildirilmiştir. *S. horrens*'in vücut duvarının tripsin, protamex, papain ve bromelain enzimleri ile en yüksek hidrolizasyon dereceleri sırasıyla % 14,9, % 11,2, % 8,2 ve % 5,6 olarak rapor edilmiştir (Forghani ve ark., 2012). Deniz hıyarı iç organlardan elde edilen toplam proteinlerin, % 0,75 (w/w) oranında alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizatların hidrolizasyon derecesi % 5,6 olarak bildirilmiştir (Mamelona ve ark., 2009). Yan ve ark. (2016) *Cucumaria frondosa* deniz hıyarı türüne ait iç organların % 2 konsantrasyondaki (w/v) pepsin ve tripsin enzimleri ile hidrolizasyon derecelerini sırasıyla % 53 ve % 57 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada *Holothuria tubulosa* vücut duvarının pepsin ve tripsin enzimleri ile hidrolizasyon dereceleri % 14 - % 33 aralığında, iç organlarının hidrolizasyon dereceleri ise % 24 - % 46 aralığında tespit edilmiştir. *Holothuria tubulosa* proteinlerine ait belirlenen bu değerlerin enzim konsantrasyonları göz önünde bulundurulduğunda rapor edilen değerlere göre bazı farklılıkların olduğu belirlenmiş olup, bu farklılığın substrat, enzim ve deney şartlarındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmüştür (Gbogouri ve ark., 2004).

Çeşitli araştırmacıların diğer su ürünleri ile yaptıkları hidrolizasyon çalışmalarında ise düşük enzim konsantrasyonu kullanılarak yüksek düzeylerde (% 14 - % 28) hidrolizasyon dereceleri bulunmuştur (Jimenez ve ark., 2015; Duan ve ark., 2010; Forghani ve ark., 2012). Bu yüksek hidrolizasyon dereceleri, hidrolizasyon işlemi birden fazla enzimin kombin olarak kullanılmasından kaynaklanmış, enzim çeşitliliği aktiviteyi artırmıştır. Hidrolizasyon derecesinde, substrata uygulanacak olan yağdan arındırma gibi ön işlemlerin de dereceyi etkilediği, artırdığı veya düşürdüğü bilinmektedir (Duan ve ark., 2010). Hidrolizasyonda izole edilen proteinden yağ arındırması işlemi sırasında proteinlerin denatürasyona uğraması söz konusu olmakta, alkol ile çözündürme ve sonrasında uçurma amacıyla ısıtma işlemi buna neden olmaktadır. Bu işlemler sonucu denatüre olan proteinler, substrat olarak, nemsizleşme ve enzimlerin daha güçlükle bağlanması nedeniyle enzim hidrolizasyonuna daha az duyarlı hale gelmektedir (Hoyle ve Merritt, 1994).

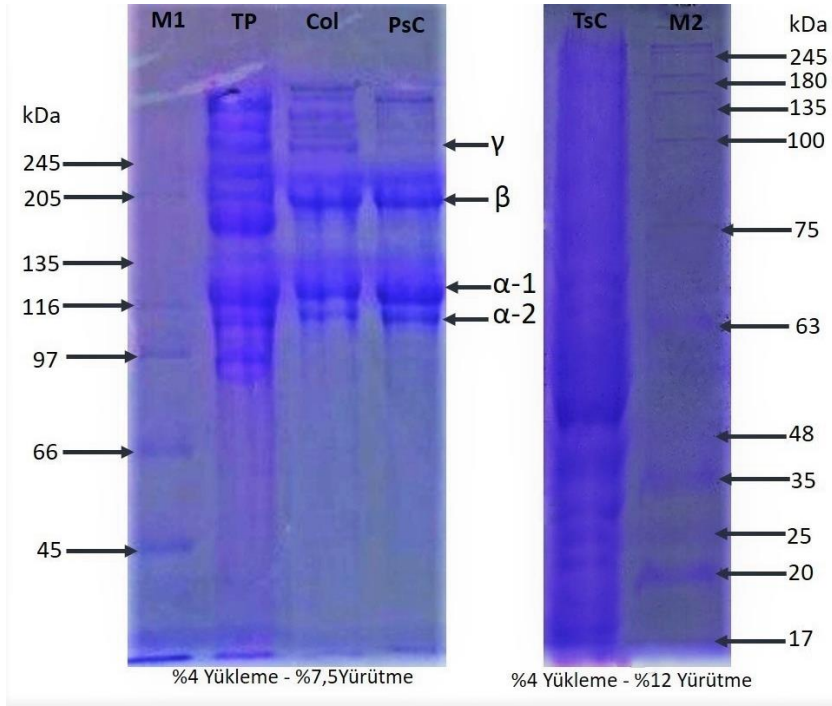
Kolajen hidrolizasyonunda ise kolajen kompakt bir molekül olduğu için

hidrolizasyonu oldukça yavaş gerçekleşmektedir (Benjakul ve Morrissey, 1997). Bu sebeple, bu çalışma da kolajen hidrolizasyonu, denatürasyon ve bozulma olmadan 1 hafta süresince + 4°C’de sürdürülmüştür. Kolajen için hidrolizasyon derecesi ise % 15 - % 38 aralığında belirlenmiştir. Deniz hıyarının farklı türlerine ait kolajen ile yapılan çalışmalarda ise araştırmacılar yüksek hidrolizasyon dereceleri bulmuşlardır. *Parastichopus californicus* deniz hıyarı türüne ait kolajenin % 5 tripsin enzimi ile hidrolizasyonu % 17 olarak bildirilmiştir (Zunying ve ark., 2011). Yine aynı tür ile yapılan başka bir çalışma da ise elde edilen kolajenin alkalaz enzimi ile tripsine göre daha iyi derecede hidroliz olduğu belirlenmiş, hidrolizasyon derecesi % 12 - % 17 aralığında rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2011). Denizhıyarı kolajenlerine ait bildirilen bu hidrolizasyon derecelerinin genel anlamda çalışmamızda *Holothuria tubulosa* için tespit ettiğimiz değerlere benzer olduğu görülmüş, küçük farklılıkların ana sebebinin ise substrat (kolajen)’ın saflığı ve izolasyon aşamasındaki şartların farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir (De Holanda ve ark., 2006; Quaglia ve Orban, 1990).

#### 4.2.2. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Page Analizi

*Holothuria tubulosa*’dan, fonksiyonel ve biyoaktif özellikler gösterebilecek potansiyele sahip bileşiklerin eldesi amacıyla, vücut duvarı ve iç organlarda bulunan proteinlerin izolasyonu ve hidrolizasyonu, vücut duvarından kolajen eldesi, elde edilen kolajenden Pepsin ve Tripsin enzimleri ile hidrolizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sonunda, elde edilen örneklerin fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi işleminden önce, proteinlerin varlığı ve molekül ağırlıklarına göre dağılımını incelemek amacıyla SDS-PAGE analizi uygulanmıştır. SDS-PAGE analizi sonrasında ürünlere ait jelde belirlenen bantların görüntüsü Şekil 4.4’te verilmiştir.

Deniz hıyarlarının toplam protein, kolajen ve kolajen hidrolizatlarındaki proteinlerin büyük kısmı  $\alpha$ -1 ve  $\alpha$ -2 proteinler rezidülerinden oluşmakta yanı sıra, örneklerin jel görüntülerinde  $\beta$  ve  $\gamma$  protein rezidülerinin bantları da görülebilmektedir. Bu protein bantları deniz hıyarı vücut duvarının büyük çoğunluğunu oluşturan kolajen yapısını oluşturan proteinler olarak bilinmektedir (Saito ve ark., 2002). Diğer taraftan, diğer küçük moleküler ağırlığa sahip (20 kDa ve altı) protein rezidüleri ise SDS-PAGE analizinde jellerde görüntülenememiştir. İç organların protein hidrolizatları protein konsantrasyonu çok düşük ve proteinlerin oldukça düşük molekül ağırlığına sahip olması muhtemel olduğundan SDS-PAGE jel görüntüleri elde edilememiştir.



M1: Geniş aralık protein markeri, TP: Vücut duvarı protein ekstraktı, Col: Kolajen, PsC: kolajen pepsin hidrolizati, TsC: Kolajen tripsin hidrolizati, M2: Geniş aralık protein marker

Şekil 4.4. *Holothuria tubulosa*'dan elde edilen proteinlerin SDS-PAGE görüntüsü

Deniz hıyarı, proteinlerinin özellikle antioksidan kapasitelerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, antioksidan özellik gösteren hidrolizat ve peptid grupları daha ileri düzeyde saflaştırma işlemleri ile daha küçük moleküler ağırlıkta SDS-PAGE protein bant görüntülerinin belirlendiği rapor edilmiştir (Saito ve ark, 2002; Liu ve ark., 2012; Mamelona ve ark., 2012). Ancak ilk aşamada kolajenin izole edikten sonraki protein bant görüntüleri ile bu çalışmada elde ettiğimiz protein bant görüntüleri hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu çalışma kapsamında, izole edilen toplam protein, kolajen ve hidrolizatlarının protein özellikleri bakımından incelenmesinin devamı elde edilen SDS-PAGE protein bant görüntüleri sonrasında gerçekleştirilebilmiştir.

### 4.3. Deniz Hıyarı Ekstraktı, Proteini ve Hidrolizatlarına Yapılan Fonksiyonel ve Biyoaktif Analizlere Ait Bulgular

#### 4.3.1. Fonksiyonel Özellikler

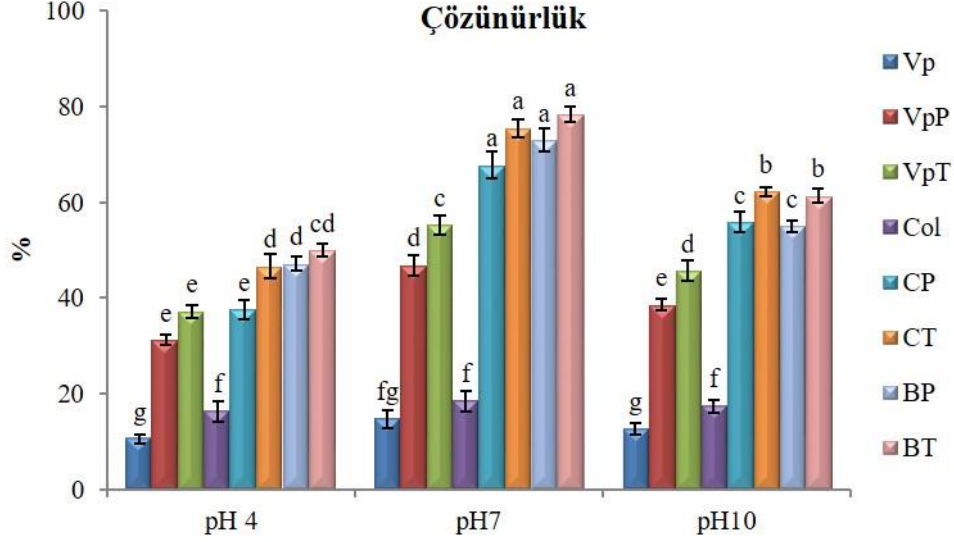
##### 4.3.1.1. Çözünürlük

Protein çözünürlüğü, örnek içinden çözücüye geçen protein miktarı olarak bilinmekte, emülsiyon ve köpürme gibi diğer fonksiyonel özellikler direkt olarak çözünürlük indeksine bağlı değişmektedir. İyi çözünürlüğe sahip proteinler, endüstriyel

kullanımında yer bulmaktadır. Proteinlerin çözünürlüğü, proteinin türüne, yapısına ve özellikle polar-apolar amino asit muhteviyatına göre değişmekte, sıcaklık, pH ve tuzluluk gibi çevresel parametrelerden de önemli derecede etkilenmektedir (Damodaran, 1996; Vojdani 1996).

Bu çalışmada pH'nın, protein türü ve kullanılan enzimin çözünürlük üzerine etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada elde edilen protein ekstrakt ve hidrolizatlarına ait çözünürlük dereceleri Şekil 4.5'te sunulmuştur. Proteinler genellikle izoelektrik noktasından uzakta, bazik veya çok asidik ( $< \text{pH } 4$ ) pH'larda daha iyi çözünme özellikleri göstermektedir (Krisstinson ve Rasco; 2000). Bu çalışmada elde edilen bulgularda da, pH 4'de çözünürlüğün düşük, pH 7 ve pH 10 gruplarında ise çözünürlüklerin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Çözünürlüğün en iyi olduğu pH derecesi ise nötral değer olan, pH 7 olmuştur.

Gruplar arasında, pH 4'te belirlenen minimum çözünürlük, toplam protein ekstraktında % 10,5, yüksek çözünürlük ise iç organ tripsin hidrolizatında % 50,0 olarak tespit edilmiştir. pH 7 ve pH 10 gruplarında en düşük çözünürlükler sırasıyla % 14,7 ve % 12,6 değerleri ile yine toplam protein ekstraktında belirlenmiştir. En yüksek çözünürlükler ise pH 7'de iç organ tripsin hidrolizatında % 78,4 olarak, pH 10'da kolajen tripsin hidrolizatında % 62,2 oranında tespit edilmiştir. Elde edilen protein ekstrakt ve hidrolizatlarının çözünürlüğüne, pH'nın etkisinin hidrolize edilmeyen büyük proteinler (toplam protein ekstraktı ve kolajen) için önemsiz olduğu ( $p > 0,05$ ), hidrolizasyon sonrası protein boyutunun küçülmesi ile bu etkinin artması neticesinde belirlenen farkın ise önemli olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,05$ ). Kullanılan enzimin ise pH gruplarında kendi içinde çözünürlüğe etkisinin önemsiz olduğu belirlenmiştir ( $p > 0,05$ ).



Vp: Vücut duvarı protein ekstraktı, VpP: Vp pepsin hidrolizatı, VpT: Vp tripsin hidrolizatı, Col: Kolajen, CP: Kolajen pepsin hidrolizatı, CT: Kolajen tripsin hidrolizatı, BP: İç organ pepsin hidrolizatı, BT: İç organ tripsin hidrolizatı

Şekil 4.5. Çalışmada elde edilen protein bazlı bileşiklerin çözünürlükleri

Proteinlerin belirli koşullar altında, molekülleri küçüldükçe çözünme özellikleri artmakta, hidrolizasyon sonrası elde edilen ürünlerde görülen çözünürlük artışının bu sebeple gerçekleşebileceği ifade edilmektedir (Krisstinson ve Rasco, 2000; Gbogouri ve ark., 2004). Bu çalışmada, toplam protein ekstraktı ve kolajen gibi büyük proteinlere sahip örneklerin, en az çözünürlük gösteren örnekler olduğu, diğer taraftan, hidrolizasyon sonrası elde edilen daha küçük proteinlerden oluşan hidrolizatların ise daha iyi çözünürlük gösterdiği dikkati çekmektedir. Bununla birlikte, pepsin ile hidrolize edilen örneklerden ziyade, pepsine göre daha spesifik peptid parçalarına ayırma özelliğine sahip tripsin ile hidrolize edilen örneklerin daha iyi bir çözünme özelliği gösterdiği ve en iyi çözünürlük özelliği gösteren örneklerin tripsin hidrolizatlarında olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen örneklerden, vücut duvarı toplam protein ekstraktı ve bu ekstraktın hidrolizatlarına ait çözünürlük değerleri, kolajen ile kolajenin hidrolizat örneklerine benzer şekilde tespit edilmiştir. Deniz hıyarının vücut duvarı proteininin ana bileşeni kolajen olduğu için (Saito ve ark., 2002), bu benzerlik oluşmaktadır. Kolajenin kompakt bir protein olması, fibriller yapısı, yapısındaki amino asitlerin genellikle apolar yapıda olması ve helix yapısındaki bağların iyonik bağ kurmaya eğilimi olmaması çözünürlüğünün düşük olmasına neden olmaktadır. Farklı materyallerden elde edilen kolajenlerin çözünürlük dereceleri genellikle % 50 ve altındaki oranlarda bildirilmiştir. Bu

çalışmalar arasında ot sazını derisinden elde edilen kolajenin çözünürlüğü %8 olarak rapor edilirken (Zhang ve ark., 2007), Nil levreğinden izole edilen kolajenin çözünürlüğünün ise % 50'den fazla oranda olduğu bildirilmiştir (Muyonga ve ark., 2004). Pelajik ahtapot türü olan Argonaut ve balon balığından elde edilen kolajenlerin çözünürlüğü ise sırasıyla % 5,2 ve % 10,7 olarak rapor edilmiştir (Nagai ve Suzuki, 2002). Yapılan bu çalışmalarda kolajenlerin farklı oranlardaki çözünürlüklerinin sebebi, çözücünün etki düzeyi, kolajenin elde edildiği kaynak farklılığı ve kolajendeki iç-çapraz bağlarının telopeptitlerdeki, yaş ile artan, sayısı ile alakalı olabilmektedir (Sims ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2007). Sonuç olarak, canlılardaki kolajenin çözünürlüğü tuzlu veya asidik ortamda yaş arttıkça azalmakta (Reich ve ark., 1962), dolayısıyla bu araştırmada deniz hıyarlarının olgun bireylerden seçilmesinin bu durumla ilişkili olarak elde edilen kolajenin çözünürlüğüne etkili olabileceği düşünülmektedir.

Deniz hıyarı iç organlarının hidrolizatları ise, vücut duvarı protein ekstraktı ve kolajenden daha iyi çözünürlük gösteren örnekler olarak belirlenmiştir. Tüm pH gruplarında en iyi çözünürlüğe sahip iç organ örneklerinde bu durum, iç organların vücut duvarı proteininde bol bulunan kolajeni daha az ihtiva etmesinden kaynaklanmaktadır. Mamelona ve ark. (2010), deniz hıyarı türü olan *Cucumaria frondosa* ve deniz kestanesi türü olan *Strongylocentrotus droebachiensis*'in iç organlarının alkalaz hidrolizatlarına ait çözünürlük oranlarını pH 7'de % 29 ve % 27 olarak bildirmişlerdir. Echinodermilerin iç organlarına ait bildirilen bu oranlar, bu çalışmada (pH 7) tespit edilen değerlerden daha düşüktür. Bu düşüklüğün, deneysel farklılıklardan (enzim farklılığı, proteinlerin ekstraksiyon aşamasındaki farklılıklar, çözünürlük testi sırasındaki sıcaklık ve tuz konsantrasyonu değerleri) kaynaklandığı düşünülmektedir.

Balıkların değerlendirilmeyen kısımlarından yapılan hidrolizatlarda ise echinoderm hidrolizatlarına göre genel anlamda daha yüksek protein çözünürlüğü elde edilmektedir. Örneğin, salmon baş kısmının ve ringa balığının gonadlarının hidrolizasyon sonrası protein çözünürlükleri % 51 ve % 56 olarak rapor edilmişken, bu oran balık protein hidrolizatlarında, özellikle yüksek hidrolizasyon derecesine sahip örneklerde % 80'den yukarı çıkabildiği bildirilmiştir (Gbogouri ve ark., 2004; Klompong ve ark., 2007; Thiansilakul ve ark., 2007). Balık kısımlarının hidrolizatlarına ait bildirilen değerler çalışmamızda *Holothuria tubulosa* iç organlarının hidrolizatlarında tespit edilen çözünürlük miktarına benzerlik göstermektedir. Protein kaynağının farklı olmasından ziyade (balık, echinoderm), elde edilen protein sınıfının benzer olması (fibriler, globüler), değerlerin benzerliğinin nedeni olarak düşünülmektedir (Adler-Nissen, 1976).

Proteinin elde edildiği metodunun farklılığı da çözünürlüğün artmasına imkan sağlayabilmektedir. Bu konuda Thiansilakul ve ark. (2007) bir çalışma yapmış ve *Decapterus punctatus* balığından yağ arındırma ve birçok santrifüj işlemi sonrası elde edilen toplam proteinin flavourzyme enzimi hidrolizasyonu sonrası çözünürlüğünü % 99 olarak rapor etmişlerdir. Bu yüksek çözünürlüğün yakalanmasının sebebi, proteinin elde edildiği tür farklılığından ziyade, araştırmacıların metotlarında yer alan yağ arındırma ve yanı sıra çok aşamalı santrifüj işlemleri ile çözünmeyen protein fraksiyonlarının uzaklaştırılması olarak açıklanmıştır. Aynı metot ile farklı kaynaktan elde edilen proteinin çözünürlüğünün belirlendiği başka bir çalışmada ise, çözünürlük % 75 olarak belirtilmiş, araştırmacılar hidrolize olan proteinin, hidrolize olmayan proteinlere göre daha iyi çözünürlüğe sahip olduğunu bildirmiştir (Gbogouri ve ark., 2004). Yine başka bir çalışmada ise hamsi balığının iç organ ve et kısımlarının alkalaz enzimi ile hidrolizasyonu sonrası çözünürlük değerleri % 90 - 100 olarak rapor edilmiş, hidrolizasyon süresinin çözünürlük düzeyine etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Koç, 2016).

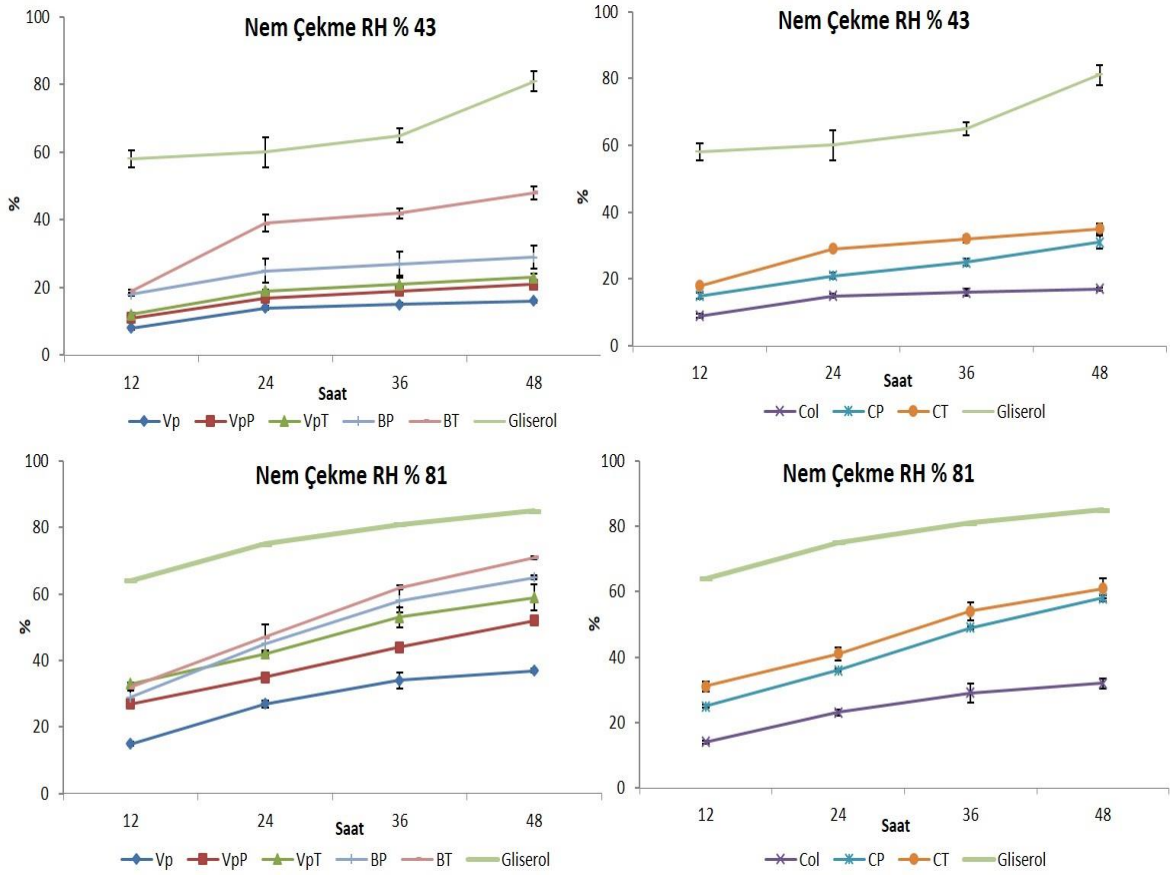
Bu çalışmada, *H. tubulosa*'nın toplam protein ekstraktının da kolajen gibi % 10 - 15 gibi düşük düzeylerde çözünürlüğe sahip olduğu tespit edilmiştir. pH değişiminin herhangi bir etkisinin olmadığı toplam protein ekstraktında çözünürlüğün az olmasının sebebi, izole edilen bu proteinin büyük çoğunluğunun kolajen ve kolajen türevi proteinlerden oluşmasından ileri gelmesi ve protein olmayan bazı safsızlıkların bu örnekte de varolabilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, hidroliz edilen proteinlerin, molekül bağlarını koruyan proteinlere göre daha kolay çözünebilir olması, hidrolizatlar ile büyük proteinlerin arasında çözünürlük farkının görülmesine neden olarak düşünülmektedir.

#### **4.3.1.2. Nem Çekme-Tutma Kapasitesi**

Nem çekme-tutma kapasiteleri özellikle fonksiyonel özellik taşıyan proteinlerin izolasyonu ve tanımlanmasında karakterizasyon amacıyla kullanılmaktadır. Kozmetik ve farmakoloji alanında önemli bir parametre olarak kabul edilen nem çekme-tutma kapasitesi, aynı zamanda gıda endüstrisinde de önemli bir parametre olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada *H. tubulosa*'dan elde edilen ekstrakt ve hidrolizatların nem çekme-tutma kapasiteleri Şekil 4.6'da özetlenmiştir. Nem çekme ve tutma özelliklerinin iyi olması sebebiyle gliserolün referans örnek olarak kullanıldığı testlerde, bağıl nemin (RH) % 43 olduğu ortamda 48 saat sonunda en iyi nem çekme özelliğini, gliserolden (% 81) sonra, kolajen ve iç organların tripsin hidrolizatları (% 35 ve % 48)



göstermiştir ( $p<0,05$ ). Bağıl nemin (RH) %81 olduğu ortamda ise 48 saat sonunda, en iyi nem çekme özelliğini yine iç organ hidrolizatları göstermiş (% 71 ve % 65), ardından kolajen ve toplam proteinlerin tripsin ile hidrolizatlarının (% 61 ve % 59) geldiği tespit edilmiştir. Her iki nem grubunda da en düşük nem çekme özelliğine sahip örneklerin toplam protein ve kolajen olduğu tespit edilmiştir. Yapılan testlerde süre ve enzim farklılığının nem çekme özelliğine etkisi olmamış ( $p>0,05$ ), bağıl nemin yüksek olduğu durumlarda (% 81) örneklerin nem çekme özelliğinin daha iyi olduğu belirlenmiştir, bu durum istatistiki açıdan da önemli bulunmuştur ( $p<0,05$ ).

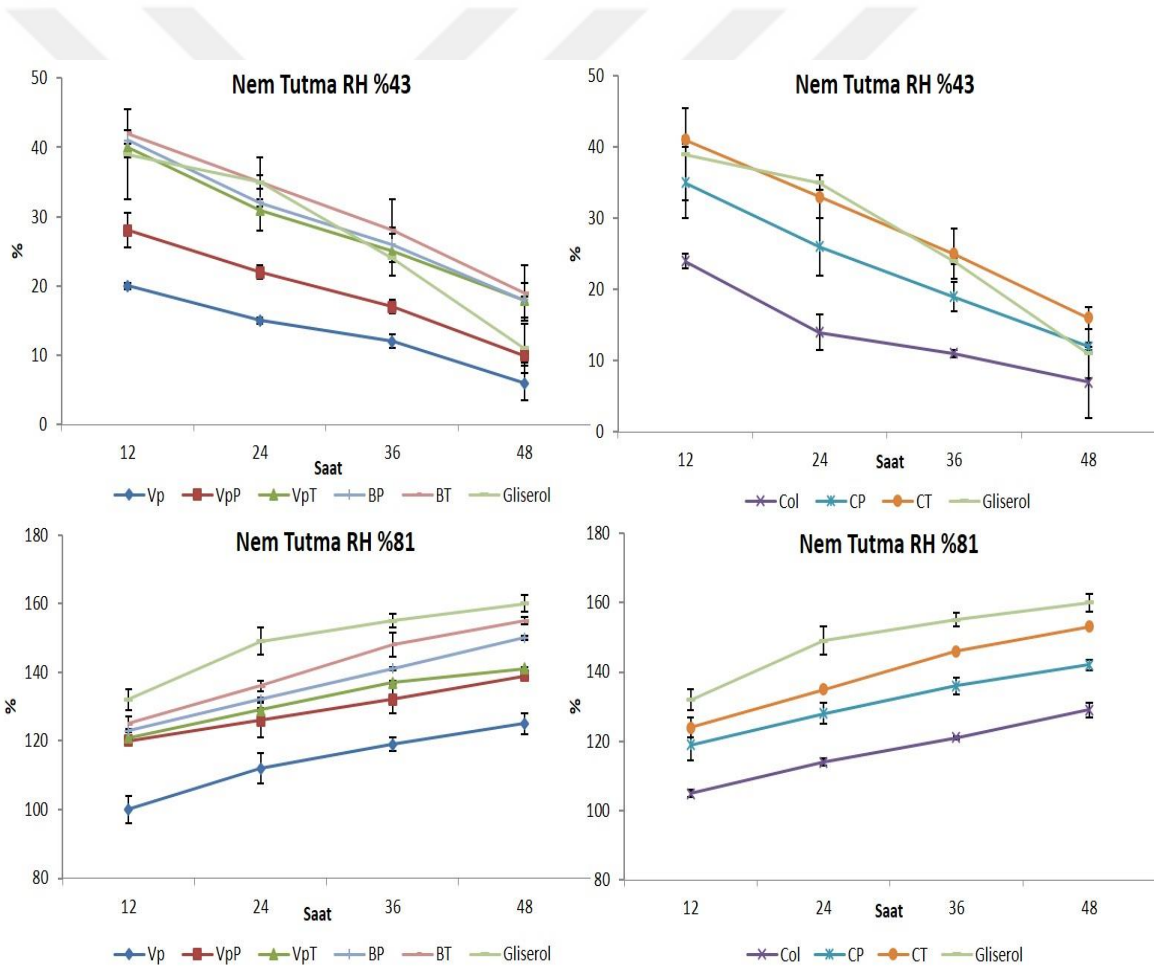


Vp: Vücut duvarı protein ekstraktı, VpP: Vp pepsin hidrolizatı, VpT: Vp tripsin hidrolizatı, Col: Kolajen, CP: Kolajen pepsin hidrolizatı, CT: Kolajen tripsin hidrolizatı, BP: İç organ pepsin hidrolizatı, BT: İç organ tripsin hidrolizatı, RH: bağıl nem

Şekil 4.6. Elde edilen örneklerin bağıl nem (RH) % 43 ve % 81'deki nem çekme kapasiteleri

Örnekler tarafından çekilen nemin tutulma özelliklerinin bağıl nem %43 ve % 81'deki özelliklerini gösteren sonuçlar, Şekil 4.7'de özetlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre bağıl nem % 43'te en iyi nem tutma kapasitesini sırasıyla, iç organ tripsin hidrolizatı

(% 19), toplam protein tripsin hidrolizatı (% 18) ve iç organ pepsin hidrolizatlarının (% 18) gösterdiği tespit edilmiştir. Bağlı nemin % 81 olduğu ortamda ise en iyi nem tutma özelliği, referans örneği olan gliserolde (% 160) görülmüş, iç organ (% 155) ve kolajenin tripsin hidrolizatları (% 153) bunu takip etmiştir. Her iki bağlı nemde de toplam protein ve kolajenin en düşük nem tutma kapasitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Kontrol örneği olan gliserol ile kolajen, toplam protein ve bu iki örneğin pepsin hidrolizatları arasındaki fark önemli bulunurken ( $p<0,05$ ), tripsin hidrolizatlarının gliserol ile benzer sonuçlara sahip olduğu belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Bağlı nemin % 81 olduğu ortamda ise gliserole en yakın sonuçları veren kolajenin tripsin hidrolizatı ile iç organların pepsin ve tripsin hidrolizatlarının benzer sonuçları verdiği ( $p>0,05$ ), ancak gliserole göre daha düşük nem tutma özelliği gösterdiği belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).



Vp: Vücut duvarı protein ekstraktı, VpP: Vp pepsin hidrolizatı, VpT: Vp tripsin hidrolizatı, Col: Kolajen, CP: Kolajen pepsin hidrolizatı, CT: Kolajen tripsin hidrolizatı, BP: İç organ pepsin hidrolizatı, BT: İç organ tripsin hidrolizatı

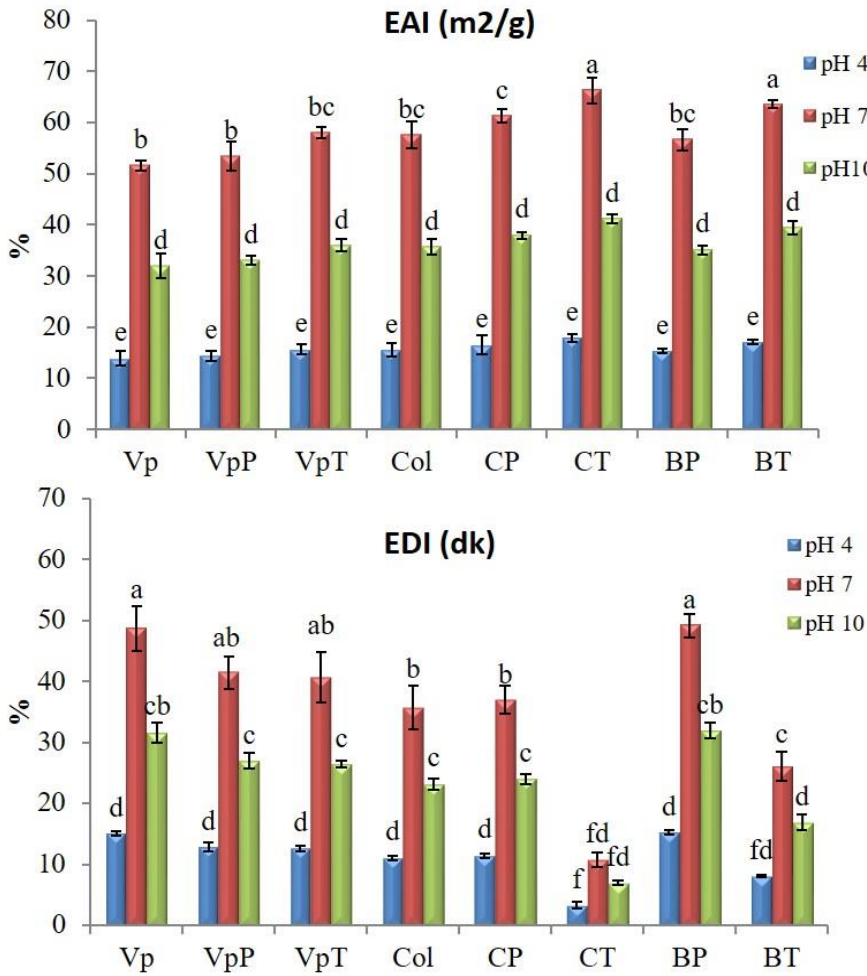
Şekil 4.7. Elde edilen örneklerin bağlı nem (RH) % 43 ve % 81’ de nem tutma kapasiteleri

Elde edilen bu bulgulara göre özellikle tripsin hidrolizasyonu sonrasında elde edilen hidrolizatların daha iyi nem çekme-tutma kabiliyetlerine sahip olduğu anlaşılmıştır. Bununla beraber, yine iç organlardan elde edilen protein hidrolizatlarının, kolajen ve toplam proteinlerden elde edilen hidrolizatlara göre daha iyi nem çekme-tutma özelliği gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar arasında, deniz hıyarından izole edilen pepsin ile çözünebilen kolajenin 48 saat sonunda nem çekme özelliği bağıl nem % 43 ve % 81’de sırasıyla % 38 ve % 62 olarak, nem tutma özelliği ise % 106 ve % 156 olarak tespit edildiği rapor edilmiştir (Zhu ve ark., 2012). Başka bir çalışmada ise *Stichopus vastus* türü deniz hıyarından elde edilen pepsin ile çözünebilen kolajenin 48 saatlik nem çekme kapasitesi % 43 ve % 81 için sırasıyla % 7,6 ve % 23,6 olarak ifade edilirken, nem tutma özelliği ise yine sırasıyla % 102 ve % 115 olarak bildirilmiştir (Abedin ve ark., 2014). Deniz hıyarlarının kullanıldığı bu çalışmalarda nem çekme-tutma kapasitesine ait bildirilen değerler, bu çalışmada pepsin ile çözünebilen kolajende elde edilen verilere benzerlik göstermektedir. Başka deniz canlılarının kullanıldığı çalışmalarda ise, deniz yıldızı türü olan *Asterina pectinifera*’dan izole edilen pepsin ile çözünebilen kolajenin 48 saat süre sonunda bağıl nem % 43 ve % 81’deki nem çekme kapasiteleri sırasıyla % 28 ve % 51; nem tutma kapasiteleri ise silika jel bulunan ortamda % 22 olarak bildirilmiştir (Qi ve ark., 2016). Kolajenin elde edildiği tür farklı olmasına rağmen çalışmamızda özellikle pepsin ile çözünebilen kolajene ait nem tutma özelliği Qi ve ark. (2016)’nın tespit ettiği bulgulara paralellik göstermiştir. Bu benzerliğin, kolajen yapısının tüm organizmalarda, Glisin – X – Y yapısındaki amino asit zincirinin (X genellikle prolin, y ise hidroksiprolin) olması ve helix yapısındaki hidrofobik-hidrofilik bölgelerin neredeyse aynı özelliklerde olmasından ileri geldiği düşünülmektedir. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen protein ve hidrolizatlarının benzer oranda nem tutma ve çekme özellikleri gösterdiği rapor edilmiştir. Hou ve ark. (2012)’nin balık derisinden izole ettikleri iki kolajen polipeptidin, 48 saatlik süre sonunda bağıl nem %43 ve %81’de sırasıyla % 30 - 50 ve % 20 - 40 düzeylerinde tespit etmişlerdir. Nem tutma özelliğini ise, bağıl nem % 43’te 48 saat sonunda % 116 ve % 150 olduğu bildirmişlerdir (Hou ve ark. 2012). Bu çalışmada, *Holothuria tubulosa*’dan elde edilen protein ürünlerinde tespit edilen nem çekme-tutma özelliğinin, referans örnek olan gliserol ve diğer araştırmacıların rapor ettiği bulgulara benzer, hatta bazılarında daha iyi sonuç verdiği belirlenmiştir.

### 4.3.1.3. Emülsiyon Özelliği

Proteinlerin yüzey özelliklerinden olan emülsiyon özelliği, protein bazlı solüsyonların yağı hacim bazında emülsifiye edebilme kabiliyeti (emülsiyon aktivite indeksi – EAI  $m^2/g$ ) ve oluşturdukları emülsiyonların süre bazında dayanıklılığı (emülsiyon dayanıklılık indeksi – EDI dk) ölçülerek test edilmektedir. Bu çalışmada deniz hıyarının protein ekstrakt ve hidrolizatlarında emülsiyon özellikleri ile ilgili elde edilen bulgular Şekil 4.8’de özetlenmiştir.



Vp: Vücut duvarı protein ekstraktı, VpP: Vp pepsin hidrolizatı, VpT: Vp tripsin hidrolizatı, Col: Kolajen, CP: Kolajen pepsin hidrolizatı, CT: Kolajen tripsin hidrolizatı, BP: İç organ pepsin hidrolizatı, BT: İç organ tripsin hidrolizatı

Şekil 4.8. Çalışmada elde edilen protein bazlı bileşiklerin % 0,5 konsantrasyonlarındaki emülsifikasyon özellikleri

Proteinlerin emülsiyon aktivitesi, protein yan zincirlerindeki yüklü grupların ve hidrofilik amino asitlerin varlığı ile alakalı şekillenmektedir. (Krisstinson ve Rasco, 2000).

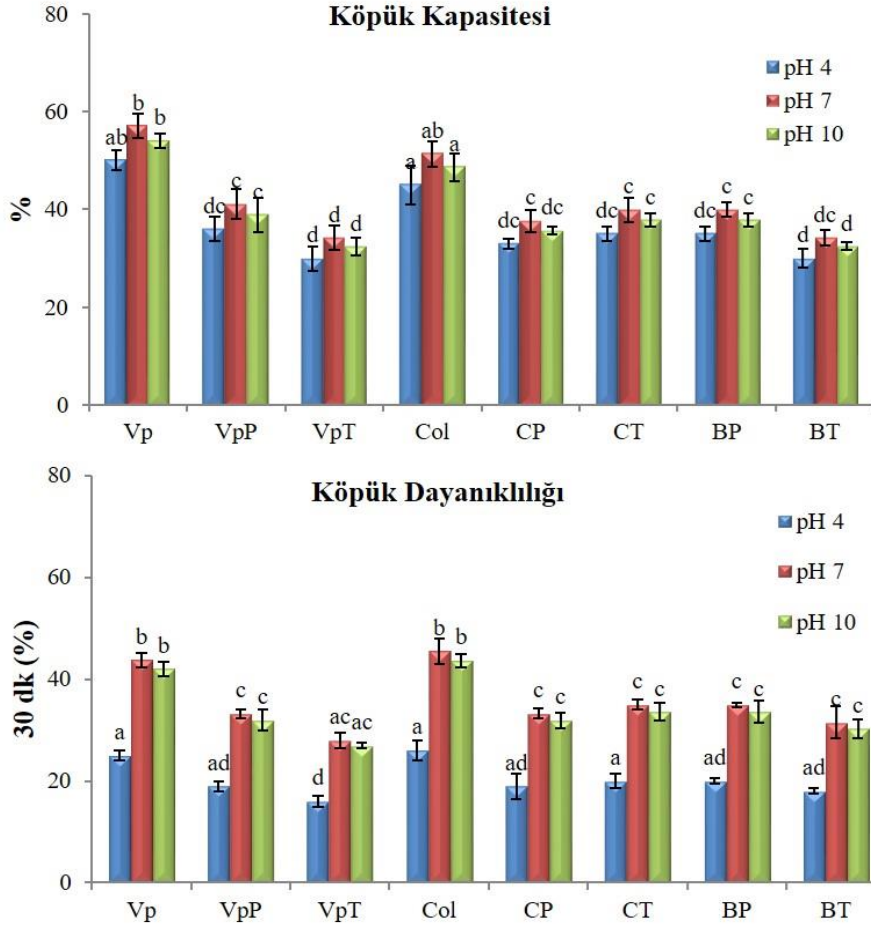
Emülsiyon oluşumunda, proteinin kaynağı, büyüklüğü, ortamın pH'sı ve hidrolizasyon işlemi için kullanılan enzimin türü emülsiyon özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir (Klompong ve ark., 2007). Hidrolizasyonda oluşan peptitlerin miktarını ifade eden hidrolizasyon derecesi azaldıkça, oluşan emülsiyonun aktivitesi ve dayanıklılığı artmaktadır. Bu konuda çalışan Klompong ve ark. (2007), hidrolizasyon derecesinin % 5, % 15 ve % 25 olduğu gruplarda en yüksek emülsiyon aktivite ve dayanıklılığının % 5'lik grupta olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da, emülsiyon dayanıklılık indeksinde ters orantıya rastlanmış, en yüksek hidrolizasyon derecesine sahip iç organ tripsin hidrolizatının, en kötü emülsiyon dayanıklılık indeksine sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak, emülsiyon aktivite indeksinin hidrolizasyon derecesiyle ters orantı ilişkisi bu çalışmada gözlenmemiştir. Diğer taraftan emülsiyon aktivitesi ve dayanıklılığının pH değişimi ile direkt ilişkili olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgularda, en iyi emülsiyon aktivite indeksi pH 7 grubunda tespit edilmiş ve en yüksek aktivite sırasıyla, kolajenin tripsin hidrolizatında 66,32 m<sup>2</sup>/g, iç organ tripsin hidrolizatında 63,56 m<sup>2</sup>/g ve pepsin ile çözünebilen kolajende 61,25 m<sup>2</sup>/g olarak belirlenmiştir. En iyi emülsiyon dayanıklılığı da yine pH 7 grubunda belirlenmiş ve en yüksek indekse iç organların pepsin hidrolizatında (49,2 dk) ve toplam protein ekstraktında (48,7 dk) saptanmıştır. Dolayısıyla, bu çalışmada en iyi emülsiyon oluşturma ve emülsiyon dayanıklılık özelliklerinin pH 7'de olduğu gözlenmiş, en düşük emülsiyon özellikleri ise pH 4'te belirlenmiştir (p<0,05). Emülsiyon oluşturma kapasitesinde örnek farklılığı ve pH etkisinin gruplar arasında önemli farka neden olduğu (p<0,05), ancak kullanılan enzimlerin ürünlerdeki emülsiyon özelliklerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (p>0,05). Emülsiyon özelliği üzerine pH'nın etkisi ile ilgili benzer tespit, Liu ve ark. (2011) tarafından *Parastichopus californicus* deniz hıyarı türünde yapılmıştır. Araştırmacılar, kolajenin tripsin hidrolizatı için yaptıkları emülsiyon özelliği testlerinde; en düşük emülsiyon özelliğini pH 4'te (EAI <10 m<sup>2</sup>/g, EDI < 10 dk) tespit etmiş olup, pH 7'de (EAI 38 m<sup>2</sup>/g, EDI 17 dk) bu özelliğin önemli derecede arttığını ve pH 10'da ( EAI 27 m<sup>2</sup>/g, EDI 16 dk) çok az bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun nedeni olarak, yağ-su majör interaksyonda yer alan hidrofilik ve hidrofobik protein rezidülerinin pH 7 ve pH 10'da, pH 4'e göre daha fazla yer almasından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Araştırmacıların bildirdiği bu değerlerin, çalışmamızda tespit ettiğimiz değerlere göre daha düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak, araştırmacıların küçük proteinleri testlerde kullandığı, küçük proteinlerin ise yağ-su interfazına hızlı nüfuz ettiğini ancak dayanıksız emülsiyon oluşturmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Liu ve ark., 2011; Gbogouri ve ark.,

2004). Diğer taraftan Kristinsson ve Rasco (2000) proteinlerin fiziko-kimyasal yapısının emülsiyon özelliklerine etki edebileceğini, ancak protein boyutunun direkt olarak emülsiyon özelliklerine etkisinin kesinlik taşımadığını ifade etmişlerdir. Farklı kaynaklardan elde edilen proteinlerin emülsiyon ve diğer fonksiyonel özellikleri Çizelge 4.6'da özetlenmiştir. Çizelge 4.6 incelendiğinde, bu çalışmada *Holothuria tubulosa*'dan elde edilen protein ekstraktları ve hidrolizatlarının iyi bir emülsiyon özelliğine sahip olduğu anlaşılmaktadır.

#### 4.3.1.4. Köpürme Özelliği

Proteinlerin köpürme özelliği, gıda üretiminde ürün hacminin genişlemesi, kıvamın değiştirilmesi ve dayanıklılığı gibi fizikokimyasal etkilerin oluşması açısından önem taşımaktadır (Kindsela, 1979; Kristinsson ve Rasco, 2000). Köpürme işlemi genellikle havalandırma işlemi ile çırpma veya hava dağıtımı ile gerçekleştirilmekte (Wilde ve Clark, 1996), güçlü havalandırma işlemleriyle, kapasite dahilinde, daha iyi köpük elde edilebilmektedir. Köpürme kapasitesi ve dayanıklılığı; moleküler boyutta proteinin konformasyonu, konformasyonu içerisinde yer alan bağların ve amino asitlerin türleri ve özelliklerine göre değişmekte (Kristinsson ve Rasco, 2000), makro boyutta ise pH değeri, protein molekülünün boyutu ve protein konsantrasyonu ile değişmektedir (Thiansilakul ve ark., 2007; Gimenez ve ark., 2009; Liu ve ark., 2011).

Bu çalışmada, *H. tubulosa*'ya ait protein ekstrakt ve hidrolizatlarının tespit edilen köpürme özellikleri Şekil 4.9'da sunulmuştur. Elde edilen bulgulara göre, pH düzeyi ve molekül büyüklüğünün köpük kapasitesi (KK) ve köpük dayanıklılığı (KD) tespitinde etkili olduğu görülmüştür. Çalışmada en düşük KK ve KD değerleri pH 4'te görülürken, en yüksek değerler pH 7'de görülmüştür ( $p < 0,05$ ). KK değeri en iyi olan örneğin toplam protein ekstraktı (pH 7'de % 57), en düşük olan örneğin ise toplam proteinin tripsin hidrolizati ve iç organ tripsin hidrolizati (her ikisi için de pH 4'te % 30) olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ). KD değerinin en iyi olduğu örnek kolajen (pH 7'de % 45,5), en düşük olduğu örnek ise toplam protein tripsin hidrolizati (pH 4'te % 16) olduğu belirlenmiştir. Köpük dayanıklılığı, istatistiki açıdan gruplar arasında benzer ( $p > 0,05$ ), pH değişkenliğinin gruplar arasında yarattığı farklılık ise önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).



Vp: Vücut duvarı protein ekstraktı, VpP: Vp pepsin hidrolizatı, VpT: Vp tripsin hidrolizatı, Col: Kolajen, CP: Kolajen pepsin hidrolizatı, CT: Kolajen tripsin hidrolizatı, BP: İç organ pepsin hidrolizatı, BT: İç organ tripsin hidrolizatı

Şekil 4.9. Çalışmada elde edilen protein ve hidrolizatlarının köpürme özellikleri

Bu çalışmada, pH 7 ve pH 10'da, özellikle büyük protein moleküllerinin en iyi köpürme özelliklerine sahip olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda tespit ettiğimiz bulgulara benzer olarak, Liu ve ark. (2011)'da benzer bulgulara rastlamış, *Parastichopus californicus* deniz hıyarı türünden elde edilen kolajen tripsin hidrolizatının KK ve KD oranlarını pH 7 ve pH 10'da moleküller büyüdükçe arttığını bildirmiştir. Gimenez ve ark. (2009) ise dil balığı ve kalamar protein hidrolizatlarının solüsyondaki konsantrasyonları arttıkça köpürme özelliklerinde de artış gözlemlemiş, bu çalışmada çalışılan konsantrasyon olan % 2'de dil balığı ve kalamarın köpürme kapasitelerini sırasıyla % 31 ve % 34 olarak tespit etmişlerdir. Diğer köpük özelliklerine ait çalışmalar Çizelge 4.6'da derlenmiştir. Farklı kaynaklardan ve deniz hıyarı türünden bu değerlere göre, çalışmamızda *Holothuria tubulosa* için tespit ettiğimiz KK ve KD değerlerinin benzer veya daha iyi olduğu anlaşılmaktadır. Aynı konsantrasyon ve hidrolizasyon derecesine ait olan koşullardaki bu

bulgulara göre *Holothuria tubulosa*'dan ekstrakte edilen protein ve hidrolizatlarının iyi bir köpürme ajanı olma potansiyeline sahip olduğu anlaşılmaktadır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Farklı deniz canlılarına ait protein ve hidrolizatların fonksiyonel özellikleri

<i>Protein Kaynağı</i>	<i>Protein</i>	<i>HD (%)</i>	<i>EAI - EDI (m<sup>2</sup>/g - %)</i>	<i>KK - KD (% - %)</i>	<i>NÇK-NTK</i>	<i>Çözünürlük (%)</i>	<i>Referans</i>
<i>Pennahia argentata</i>	Kas-Kemik Flovurzyme Hid.	18	15 - 58	-	-	20-30	Choi ve ark., 2008
	Kas-Kemik Protamex Hid.	12	5 - 98	-	-	20-30	
<i>Channa striatus</i>	Yumurtaların Alkalaz Hid.	28	21 -	88-54	-	90	Galla ve ark., 2012
<i>Labeo rohita</i>	Yumurtaların Alkalaz Hid.	18	50 -	100-37	-	23	
<i>Salmon</i>	Baş Atıkları Alkalaz Hid.	17	30 - 74	-	-	98	Gbogouri ve ark., 2004.
	Baş Atıkları Protein Eks.	-	-	-	-	28	
<i>Dil Balığı</i>	Jelatin Alkalaz Hid.	30	40 -	31 - 10	-	98	Gimenez ve ark., 2009
<i>Kalamar</i>	Jelatin Alkalaz Hid.	48	20 -	34 - 65	-	97	
<i>Yayın Balığı</i>	Deri Jelatini	-	-	130 -35	-	-	Jongjareonrak ve ark., 2010
<i>İstavrit</i>	Et Alkalaz Hid.	27	40 - 55	65-50	-	98	Klompong ve ark., 2007
	Et Flavourzyme Hid.	7	75- 50	145-78	-	93	
<i>Kalamar L. formosana</i>	Deri Jelatini	-	16- 15	157- 140	-	-	Nagarajan ve ark., 2012
<i>Mezgit</i>	Et alkalaz Hid.	15	90 - 60	3- 20	-	97	Pacheco-Aguilar ve ark., 2008.
<i>Ringa</i>	Bütün Alkalaz Hid.	12	20-48	-	-	85	Sathivel ve ark., 2003
	Baş Alkalaz Hid.	17	21-53	-	-	84	
	Gonad Alkalaz Hid.	9	11-54	-	-	56	
<i>Capelin Balığı</i>	Bütün Alkalaz Hid.	22	51-92	90-8	-	94	Shahidi ve ark., 1995.
<i>Sübye S. pharaonis</i>	Deri Jelatini	-	24-15	170-89	-	-	Aewsiri ve ark., 2009
<i>Sübye S. officinalis</i>	Deri jelatini	-	23-49	124-110	-	-	Balti ve ark., 2011
<i>Deniz hıyarı S. vastus</i>	PSC	-	-	7,6 -102 (RH %43) 23 - 115 (RH %81)	-	10	Abedin ve ark., 2013.
<i>Deniz Hıyarı P.californicus</i>	Kolajen Tripsin Hid.	16	36-18	210-180	-	-	LIU Zunying ve ark., 2011.
<i>Deniz Hıyarı S. japonicus</i>	PSC	-	-	38-114 (RH %43) 62-156 (RH % 81)	-	19	Zhu ve ark., 2012

HD; hidrolizasyon derecesi, EAI; emülsiyon aktivite indeksi, EDI; emülsiyon dayanıklılık indeksi, KK; köpürme kapasitesi, KD; köpük dayanıklılığı, NÇK; nem çekme kapasitesi, NTK; nem tutma kapasitesi, Hid.; Hidrolizat, PSC: Kolajen Pepsin Hidrolizatı, Eks.; ekstrakt



### 4.3.2. Biyoaktif Özellikler

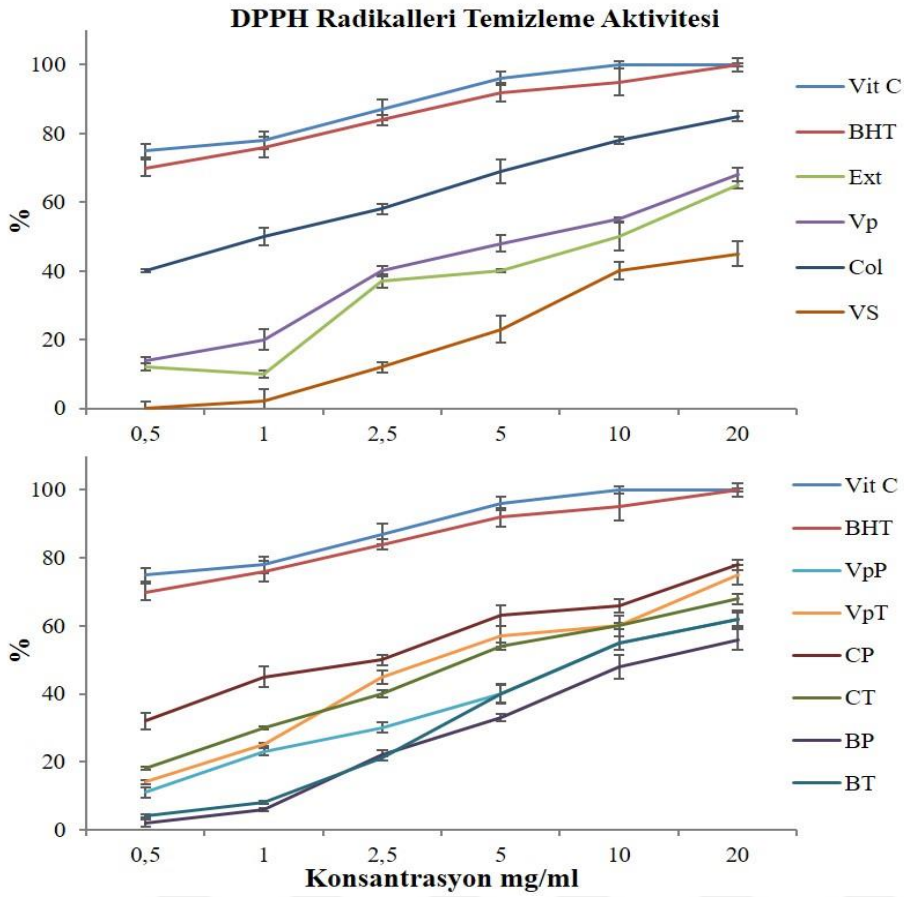
Su ürünleri, başta proteinler olmak üzere vücut sistemini koruyucu önemli besin elementlerini içeren, biyolojik değeri yüksek gıda maddeleridir. Son yıllarda sağlık konusunda yapılan çalışmalar sonucunda aktif peptidlerin ortaya çıkması ile bir çok deniz canlısından elde edilen hidrolizatların biyoaktif özellikleri ve aktif peptit kazanımı ile ilgili araştırmalar yapılmaya başlanmış, bu kapsamda su ürünleri proteinleri ilgi odağı olmuştur.

Bu çalışmada da *Holothuria tubulosa*'nın protein ekstraktı ve hidrolizatlarının biyoaktif özelliklerinden antioksidan ve antimikrobiyal aktivite özellikleri incelenmiştir. Antioksidan özellikleri; DPPH radikalleri süpürme etkisi, demir şelatlama yeteneği, indirgeme gücü ve DNA hasarı koruma parametreleri aracılığıyla, antimikrobiyal özellikleri ise patojen mikroorganizmalar üzerinde; *L. Monocytogenes*, *Sallmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ve *Bacillus cereus*, minimum inhibasyon konsantrasyonları ve disk difüzyon metodu ile in vitro olarak incelenmiştir.

#### 4.3.2.1. DPPH Radikalleri Süpürme Etkisi

DPPH radikalleri süpürme aktivitesi, antioksidan bileşiklerin potansiyellerini belirlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir parametredir. DPPH, kararlı bir radikal olup, 517 nm'de etanol içinde maksimum absorbansı göstermektedir (Molyneux, 2004). DPPH, antioksidant bileşikten bir elektron yada proton alarak süpürüldüğü zaman, radikal kendi rengini mordan sarıya döndürmekte ve absorbans azalmaktadır (Peng ve ark., 2009). Bu çalışmada deniz hıyarı protein ekstraktı, hidrolizatları ve vücut sıvısının, farklı konsantrasyonlarda DPPH radikallerini süpürme etkileri araştırılmış, pozitif kontrol örneği olarak C vitamini ve ticari antioksidant olan BHT kullanılmıştır. DPPH süpürme etkisine ait elde edilen bulgular Şekil 4.10'da özetlenmiştir.

Yapılan çalışmada, kontrol olarak kullanılan Vitamin C ve BHT'nin 0,5 – 20 mg /ml konsantrasyonları arasındaki DPPH süpürme etkileri % 70 - % 100 değerleri arasında tespit edilmiştir. Kontrol örnekleri yanında, en yüksek DPPH süpürme etkisi kolajende %40- % 85, kolajen pepsin hidrolizatında % 32 - % 78, toplam protein tripsin hidrolizatında % 14 - % 75 aralığında, en düşük ise vücut sıvısı (% 1 - % 45) ve iç organ pepsin hidrolizatında (% 2 - % 56) tespit edilmiştir. Çalışma bulguları DPPH radikallerini temizleme etkisinin, protein kaynağı, konsantrasyonu ve hidrolize edildiği enzimin türüne göre değişebileceğini göstermiştir (p<0,05).



Vit C: C Vitamini, BHT: Bütil Hidroksi Toluen, Ext: Total ekstrakt, Vp: Vücut duvarı protein ekstraktı, VpP: Vp pepsin hidrolizatı, VpT: Vp tripsin hidrolizatı, Col: Kolajen, CP: Kolajen pepsin hidrolizatı, CT: Kolajen tripsin hidrolizatı, BP: İç organ pepsin hidrolizatı, BT: İç organ tripsin hidrolizatı, VS: vücut sıvısı

Şekil 4.10. *Holothuria tubulosa*'nın çözücü ekstraktı, vücut sıvısı, proteinleri ve bu proteinlerin hidrolizatlarının, C vitamini ve BHT'ye göre DPPH radikalleri süpürme etkisinin konsantrasyona bağlı değişimleri

Çeşitli su ürünleri protein ve hidrolizatlarının DPPH aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalar arasından; Jimenez ve ark. (2015) jumbo kalamarın kol ve yüzgeçlerinden elde ettikleri kolajeni tripsin ve proteaz XIV enzimleri ile hidroliz ederek DPPH aktivitelerini incelemiştir. Araştırmacılar, kolajenin elde edildiği bölgeye göre antioksidan aktivitenin değiştiğini ifade ederek, 2,5 mg/ml konsantrasyonda en yüksek DPPH süpürme aktivitesini, kalamar kol kolajenin tripsin ve proteaz XIV hidrolizatlarında (% 45 ve % 43), daha sonra yüzgeçten elde edilen hidrolizatlarında (% 34 ve % 32), son olarak kol ve yüzgeç kolajenlerinde (% 20 ve % 18) tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise kolajen ve hidrolizatlarının 2,5 mg/ml konsantrasyonda tespit edilen DPPH aktivite değerleri (% 58, %50), Jimenez ve ark. (2015)'nin bildirdiği değerlerden (% 18 - % 45) daha yüksek bulunmuştur. *H. tubulosa* kolajenin tripsin hidrolizatı ile kalamar kolajenin tripsin

hidrolizatına ait DPPH aktivite değerleri (% 40 - % 45) arasında ise benzerlik tespit edilmiştir. Bu iki çalışma arasındaki DPPH aktivite değerleri arasındaki farklılığın, araştırmacıların da ifade ettiği gibi, enzim ve protein kaynağındaki farklılıklardan ileri geldiği düşünülmektedir. Tripsin enzimi için tespit edilen benzerliğin nedeni ise, tripsin enziminin lizin-arjinin amino asit rezidüsü olacak şekilde hidrolizasyon gerçekleştirmesi, burada kaynak farklı olsa da oluşan hidrolizatların büyük ölçüde benzer amino asit içeren peptidlere parçalamasından ileri geldiği düşünülmektedir. Protein kaynağı ve enzim türünün hidrolizatların antioksidan aktivite göstermesine etki ettiği kadar, kullanılan enzimin konsantrasyonu ve hidrolizasyon süresi, yani hidrolizasyon derecesinin de DPPH aktivitesini etkilediği bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada, Hint istavritinin pepsin ve papain ile hidrolizasyon derecesinin enzim konsantrasyonu arttıkça ve altı saat boyunca her iki enzim grubunda da sürekli arttığını, konsantrasyon ve hidrolizasyon süresi arttıkça DPPH radikalleri süpürme etkisinin arttığı ve pepsinin tüm gruplarda papainden daha iyi aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Sheriff ve ark., 2014). Jridi ve ark. (2013) ise kalamardan elde ettikleri pepsin ile hidrolize kolajenin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalleri temizleme aktivitesini, kullanılan enzim konsantrasyonunun en fazla olduğu 15 U/g grubunda % 68 olarak tespit etmişlerdir. Ghanbari ve ark. (2015) *Actinopyga lecanora* deniz hıyarı türünü altı farklı enzim ile hidrolize ettiğini, 1 mg/ml konsantrasyondaki bu hidrolizatların DPPH radikallerini süpürme aktivitesini sırasıyla, alkalaz, papain, bromelain, tripsin, pepsin ve flavourzyme hidrolizatlarında en yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir deniz hıyarı türü olan *Cucumaria frondosa*'nın pepsin ve tripsin de dahil olmak üzere yedi farklı enzim ile hidrolizasyonunda en yüksek DPPH radikalleri süpürme etkisini flavourzyme enziminde en düşük ise papain enzimlerinde tespit etmişlerdir (Yan ve ark., 2016). Araştırmacılar, pepsin ve tripsin enzim hidrolizatlarının 2 mg/ml konsantrasyonundaki bu değerleri sırasıyla % 5 ve % 9 olarak, bu çalışmadaki 2,5 mg/ml konsantrasyonunda pepsin (% 22) ve tripsin (% 21) değerlerinden düşük değerlerde bildirilmiştir. Buna karşın farklı materyal üzerinde yapılan bir çalışmada pepsin de dahil altı farklı ticari enzim ile salmon atıklarının hidrolizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hidrolizatlar arasında en yüksek DPPH süpürme aktivitesinin % 62 ile pepsin hidrolizatlarının saflaştırılmış fraksiyonlarında olduğu belirtilmiştir (Ahn ve ark., 2014).

Bu çalışmada, deniz hıyarının farklı protein ve hidrolizatları arasında, en yüksek DPPH radikalleri süpürme aktivitesi pepsin hidrolizatlarında belirlenmiştir. Bu bulgunun, farklı protein kaynaklarında, diğer enzimlere göre pepsin hidrolizatlarının daha iyi aktiviteye sahip olduğunu belirten çalışmalar ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ancak, aynı

çalışmalarda, hidrolizasyon sonrasında elde edilen fraksiyon ve saflaştırılmış peptidlerin ise, bu çalışmadaki tüm örnek gruplarından daha yüksek düzeyde DPPH radikallerini süpürme aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Dolayısıyla, hidrolizasyon amacıyla uygulanan enzimden daha önemli olarak, elde edilen hidrolizatların saflaştırılarak veya fraksiyonlarına ayrılarak kullanılması aktivitenin daha yüksek düzeylerde olmasına neden olmaktadır (Ahn ve ark., 2014; Jimenez ve ark., 2015).

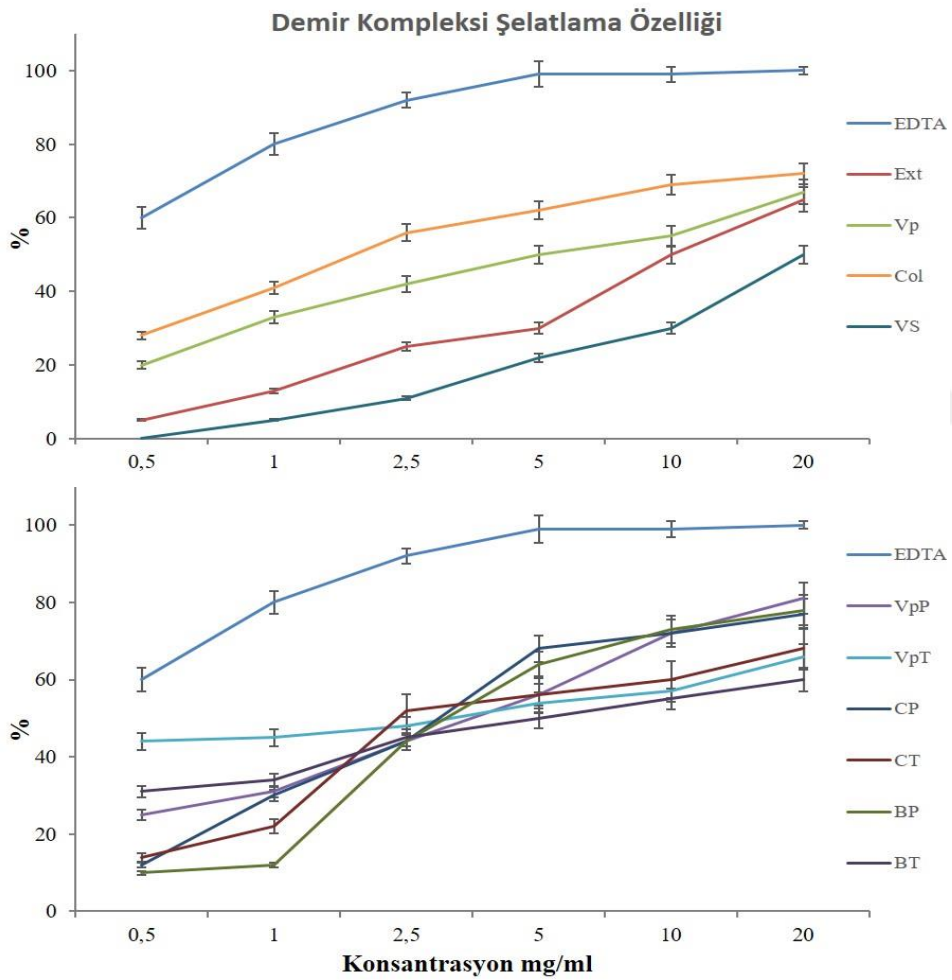
Bazı zcler ile canlıların vücut parçalarından veya tamamından elde edilen ekstraktlar farklı derece de antioksidan aktivite gösterebilmektedir. Althunibat ve ark. (2009)  farklı deniz hıyarı türünün vücut duvarı su ve metanol ekstraktlarının 25 mg/ml konsantrasyondaki en yüksek DPPH aktivitesini *Holothuria leucospilota*'da türünde sırasıyla % 37 ve % 55 olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada toplam üzücü ekstraktının DPPH aktivitesi ise 20 mg/ml'de % 65 olarak araştırmacıların bildirdiği en yüksek değerden daha iyi bulunmuştur. Başka bir çalışmada aynı türün kurutulmuş vücut duvarı metanol ekstraktlarının DPPH aktivitesi ise 1 mg/ml konsantrasyonda % 52 olarak bildirilmiştir (Soltani ve Baharara, 2014). *Holothuria atra*'nın vücut duvarı, iç organları ve tüm vücudunun metanol ekstraktlarının 20 µg/ml'deki DPPH aktivitesi ise sırasıyla, % 32, % 34 ve % 18 olarak bildirilmiştir (Nobsathian ve ark., 2016). Bu türlerden ayrı, dört farklı deniz hıyarı türünün vücut duvarı metanol ekstraktlarının 1 mg/ml konsantrasyonlarında DPPH aktivitesi % 10 - 40 arasında olduğu rapor edilmiştir (Pangestuti ve ark., 2016). Bu araştırmacıların metanol ekstraktının ≤ 1 mg/ml konsantrasyonlarında bildirdikleri sonuçlar, bu çalışmadaki 10 mg/ml konsantrasyonunda tespit edilen oranlardan daha yüksek düzeydedir. Bunun nedeninin, laboratuvar uygulamaları ve tür farklılığından ileri geldiği düşünülmektedir. Metanol ekstraktları ile znebiilen potansiyel antioksidantlar, proteinlerin aksine, türlere göre çok varyasyonlarda olabilmektedir. Fenolik bileşikler ve yağlar başta olmak üzere bu ekstraktların miktarı ve çeşidi antioksidan etkinin çok çeşitli derecelerde olmasına neden olmaktadır. Genel olarak bakıldığında ise, *H. tubulosa*'nın protein hidrolizatları ve üzücü ekstraktının diğer türlere göre oldukça iyi, vitamin C ve ticari antioksidan BHT'ye göre, doğal olduğu göz önünde bulundurulursa, iyi bir DPPH süpürme aktivitesine sahip olması yönünden, antioksidan ajan olma potansiyeline sahip olduğu anlaşılmaktadır.

#### **4.3.2.2. Demir şelatlama özelliği**

Demir (Fe<sup>+2</sup>) gibi iz element iyonları, hidroksil radikal ve süperoksit anyon gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalize etmektedir. Özellikle Fe<sup>+2</sup>, önemli bir reaktif

oksijen türü olan lipid hidroperoksitlerini, fenton reaksiyonu sırasında dekompoze ederek oluşturmaktadır. Potansiyel olarak bu serbest radikaller oksidatif strese bağlı bazı hastalıkların oluşumunu hızlandırmaktadır. Bu yüzden bu metal iyonları anti-oksidatif peptidler ile şelatlanarak inaktif hale getirilmekte ve oksidasyon reaksiyonları geciktirilmektedir (Baugatef ve ark., 2012).

Deniz hıyarı protein ekstrakt ve hidrolizatların şelatlama özellikleri  $Fe^{+2}$  – ferrozin kompleks formasyonunun inhibasyonu ile ölçülmüştür. Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA)'in referans şelatlayıcı ajan olarak kullanıldığı analizlerin bulguları şekil 4.11'de özetlenmiştir.



Ext: Total ekstrakt, Vp: Vücut duvarı protein ekstraktı, VpP: Vp pepsin hidrolizati, VpT: Vp tripsin hidrolizati, Col: Kolajen, CP: Kolajen pepsin hidrolizati, CT: Kolajen tripsin hidrolizati, BP: İç organ pepsin hidrolizati, BT: İç organ tripsin hidrolizati, VS: vücut sıvısı

Şekil 4.11. *H. tubulosa*'nın çözücü ekstraktı, vücut sıvısı, proteinleri ve bu proteinlerin hidrolizatlarının, EDTA'ya göre şelatlama yeteneğinin konsantrasyona bağlı değişimleri

Elde edilen bulgulara göre,  $Fe^{+2}$  – ferrozin kompleks formasyonunun şelatlamasını EDTA ajanının 0,5 mg/ml konsantrasyonunda % 60 ve 20 mg/ml konsantrasyonunda % 100 olarak gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. EDTA'ya en yakın şelatlama yeteneğini 20 mg/ml'de sırasıyla, protein pepsin hidrolizatı (%81), iç organ pepsin hidrolizatı (% 78) ve pepsin ile çözünebilen kolajen (% 77)'nin gösterdiği tespit edilmiştir. Yine aynı konsantrasyonda en düşük şelatlama özelliğini ise vücut sıvısı örneği göstermiş (% 50), vücut sıvısını iç organ tripsin hidrolizatı (% 60) ve protein ekstraktı (% 65) takip etmiştir. Kolajenin 2,5 g/ml'ye kadar olan konsantrasyonlardaki şelatlama yeteneğinin tüm gruplardan üstün olduğu istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur ( $p<0,05$ ). En düşük konsantrasyon olan 0,5 mg/ml'de ise protein tripsin hidrolizatının şelatlama yeteneğinin diğer gruplara göre farkının önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0,05$ ). Tüm örnekler için konsantrasyon, protein kaynağı ve enzim farklılığının şelatlama yeteneği üzerine etkisinin önemli olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ).

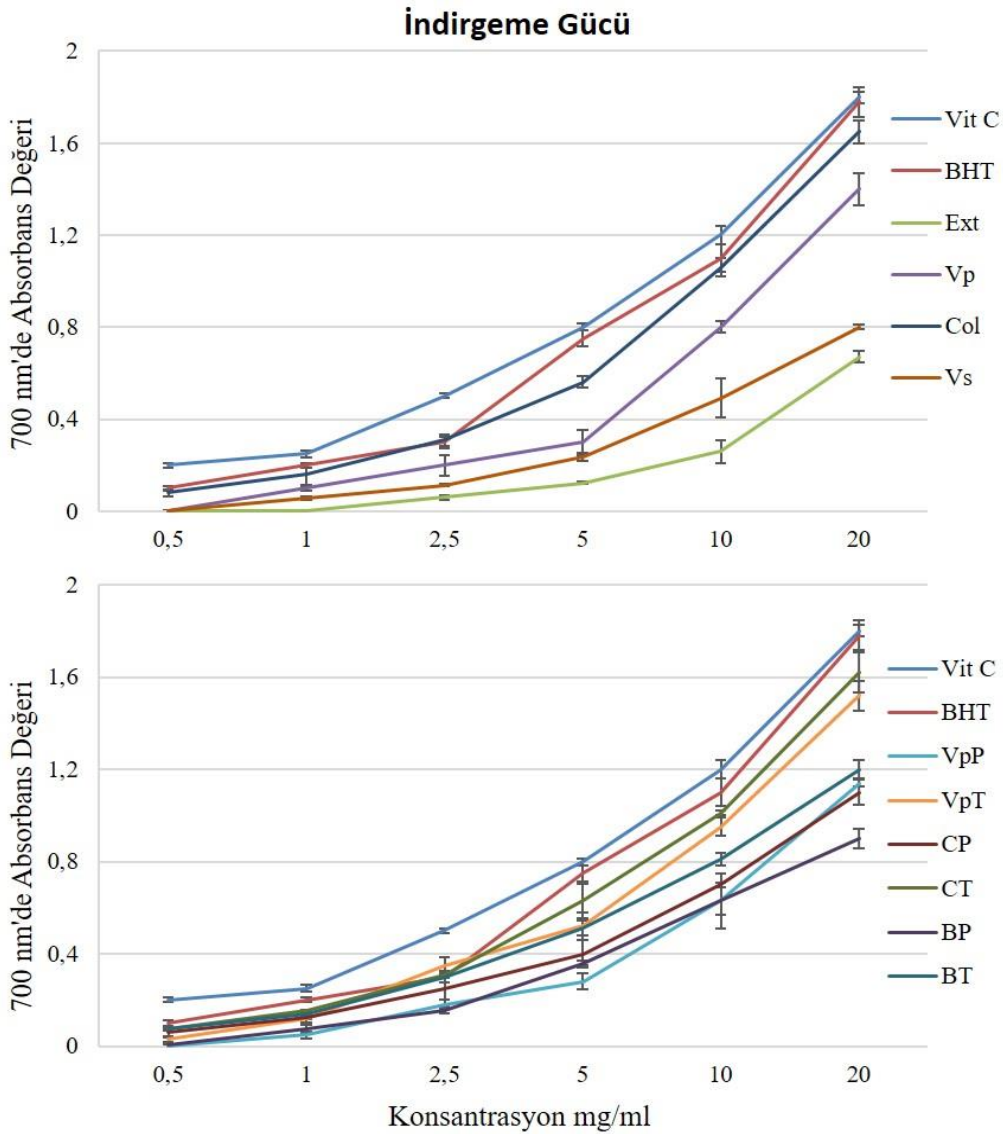
Proteinlerin antioksidan aktivitelerinin incelendiği birçok çalışmaya literatürde rastlamak mümkündür. Antioksidan özelliğın belirlenmesinde önemli bir test olan demir şelatlama özelliğı, daha çok karasal kaynaklı canlıların protein ekstraktları, yağ ekstraktları veya toplam çözücü ekstraktlarında incelenmiş, deniz canlılarının incelendiğı çalışmalar ise son yıllarda yoğun olarak yapılmıştır. Deniz canlılarından elde edilen proteinlerin ve bu proteinlerin çeşitli enzimler ile hidrolizatlarının çalışıldığı araştırmalarda, antioksidan aktivitenin, özellikle izole edilen proteinin hidrolize edilmesiyle daha etkili şekilde gözlemlendiğı belirtilmektedir (Dong ve ark., 2008; Gimenez ve ark., 2009; Aleman, ve ark., 2011). Bunun nedeni ise, proteinlerin üçüncül yapılarında gösteremedikleri bazı biyokimyasal özelliklerini, hidrolize edildiklerinde, aktif peptidlerin açığa çıkarak daha net göstermesidir. Kalamar jelatinini ile yapılan bir çalışmada, jelatinin şelatlama yeteneğı oldukça düşük bildirilirken, bu jelatinin tripsin, alkalaz ve esperaz enzimleri ile hidrolizasyonun % 80  $Fe^{2+}$  şelatlama kapasitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Aleman ve ark., 2011). Aynı şekilde, sazan balığının alkalaz enzimi ile hidrolizasyonunun kimyasal ticari şelatlama ajanları gibi bir özellik göstererek, %100 değerine yakın şelatlama özelliğı gösterdiğı tespit edilmiştir (Dong ve ark., 2008). Alkalaz enzimi ile yapılan başka bir çalışmada ise, dil balığı ve kalamardan elde edilen jelatinlerin 25 mg/ml konsantrasyonda şelatlama özelliğı % 2-5 civarında bulunurken, bu jelatinlerin hidrolizasyon sonrasında aynı konsantrasyondaki şelatlama yeteneğı % 97 - 99 olarak rapor edilmiştir (Gimenez ve ark., 2009). Je ve ark. (2015)'da abalon iç organ alkalaz hidrolizatının şelatlama yeteneğini 2 mg/ml gibi çok düşük konsantrasyonda, % 90 civarında tespit etmiş ve potansiyel  $Fe^{2+}$

şelatlama ajanı olarak bu hidrolizatlarının değerlendirilebileceğini vurgulamıştır. Nil tilapya derisinin yedi farklı enzim ile hidrolizasyonunda en fazla aktiviteyi % 83 oranında tripsin enziminin gösterdiği ve alkalaz enzimi hidrolizatından daha iyi bir şelatlama potansiyeli olduğu sonucuna varılmıştır (Choonpicharn ve ark., 2015). Enzimler genel anlamda farklı peptid karışımları içeren hidrolizatlar meydana getirmekte, hidrolizatların şelatlama yeteneği bu oluşan hidrolizatlardaki peptidlerin moleküler ağırlıkları ile alakalı şekillenmektedir. Hidrolizasyon sonrasında elde edilen fraksiyonlardan düşük moleküler ağırlığa sahip olanların daha iyi şelatlama özelliği gösterdiği bildirilmektedir (Dong ve ark., 2008). Ancak, çok düşük moleküllere sahip peptidlerin kuaracağı şelatlamaların ise dayanaksız olabileceği ve dolayısıyla sabit olmayacağı da ifade edilmektedir (Aleman ve ark., 2011). Bu çalışmada genel anlamda, Lys-Arj rezidüsüne sahip hidrolize peptidler oluşturan tripsin hidrolizatlarının (Adler-Nissen, 1993), pepsin hidrolizatlarına göre daha iyi şelatlama yeteneğine sahip olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0,05$ ).

Literatürde rapor edilen çalışma sonuçlarına göre, proteinlerin alkalaz, tripsin ve esmeraz gibi bazı spesifik enzimler ile hidrolizasyonu sonrasında, bu hidrolizatlardan hazırlanan 5 mg/ml konsantrasyondaki solüsyonların, genel olarak iyi bir şelatlama özelliği gösterdiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada ise, *Holothuria tubulosa*'dan elde edilen kolajen, toplam protein ve hidrolizatlarının özellikle 1 mg/ml üzerindeki konsantrasyonlarda, literatürde bildirilen değerler ile kıyaslandığında iyi bir şelatlama ajanı potansiyeline sahip olduğu kanısına varılmıştır.

#### 4.3.2.3. İndirgeme Gücü Özelliği

İndirgeme gücü kabiliyeti, moleküllerin elektron veya hidrojen donörü vererek ortamda kararsız halde bulunan serbest radikalleri daha kararlı hale getirmesi ile alakalıdır. İndirgeme gücü yüksek moleküller, radikal zincir reaksiyonlarını hızla sonlandırmakta ve spektrofotometrede belirli dalga boyunda, daha yüksek absorbans değerine sahip olmaktadır (Qi ve ark., 2006). İndirgeme gücü antioksidan aktivite ile ilişkili olup, indirgeme gücüne sahip antioksidanlar  $Fe^{+3}$  /ferrisisiyanid kompleksini demir formuna dönüştürmektedir (Bougatef ve ark., 2009). Bu çalışmada deniz hıyarı protein ekstraktı, hidriolizatlar ve vücut sıvısının farklı konsantrasyonlarda indirgeme yetenekleri, pozitif kontrol olan C vitamini ve BHT eşliğinde ölçülmüş ve tespit edilen bulgular Şekil 4.12'de özetlenmiştir.



Vit C: C Vitamini, BHT: Bütil Hidroksi Toluen, Ext: Total ekstrakt, Vp: Vücut duvarı protein ekstraktı, VpP: Vp pepsin hidrolizatı, VpT: Vp tripsin hidrolizatı, Col: Kolajen, CP: Kolajen pepsin hidrolizatı, CT: Kolajen tripsin hidrolizatı, BP: İç organ pepsin hidrolizatı, BT: İç organ tripsin hidrolizatı, VS: vücut sıvısı

Şekil 4.12. *Holothuria tubulosa*'nın çözücü ekstraktı, vücut sıvısı, protein ve hidrolizatlarının, C vitamini ve BHT'ye göre indirgeme özelliğinin konsantrasyona bağlı değişimleri

Elde edilen bulgulara göre tüm konsantrasyonlarda en yüksek indirgeme gücü, pozitif kontrol olan Vitamin C örneğinde, ardından ise BHT örneğinde tespit edilmiştir. 20 mg/ml konsantrasyonda en yüksek indirgeme gücünü C vitamini (1,80) ve BHT (1,78)'den sonra kolajen (1,65) ve kolajenin tripsin hidrolizatı (1,63) vermiştir. Aynı konsantrasyonda en düşük indirgeme gücü ise toplam çözücü ekstraktı (0,67) ve vücut sıvısı (0,80) örneklerinde belirlenmiştir. Örnek konsantrasyonu 2,5 mg/ml olduğunda, protein



ekstraktının BHT'ye göre daha yüksek absorbans vererek daha iyi bir indirgeme özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Hidrolizat ve kullanılan enzim ile örnek konsantrasyonunun, indirgeme gücü üzerindeki etkisi istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda da, farklı materyal ve enzim tiplerinin kullanılması ile farklı indirgeme gücü aktiviteleri rapor edilmiştir. Ekonomik deniz hıyarı türü olan *Cucumaria frondosa*'nın iç organlarının yedi farklı enzim ile hidrolizasyonu sonrasında, 2,5 mg/ml'deki en yüksek indirgeme gücü alkalaz (0,23) ve tripsin (0,22) hidrolizatlarında, en düşük ise pepsin hidrolizatlarında tespit edilmiş, kullanılan enzim farklılığının amino asit rezidüsünde değişikliğe neden olması nedeniyle indirgeme gücünde farklılıklar olduğu ifade edilmiştir (Yan ve ark., 2016). Abalonun dört farklı enzimle hidrolizasyonu sonucunda ise, flavourzyme hidrolizatlarının en yüksek aktiviteye sahip olduğu ifade edilerek, 2,0 mg/ml konsantrasyonda bu hidrolizatın indirgeme gücü 0,83 (700 nm absorbans) olarak bildirilmiştir (Park ve ark., 2015). Hint istavritinde papain ve pepsin ile yapılan çalışmada ise, 2,5 mg/ml konsantrasyonda pepsin hidrolizatlarının (0,24), papain hidrolizatlarına (0,19) göre daha üstün indirgeme gücüne sahip olduğu, her iki enzim hidrolizatında yakalanan absorbans değerlerinin ise,  $\alpha$ -tokoferol ve BHT ile benzer düzeyde olduğu rapor edilmiştir (Sheriff ve ark., 2014).

Başka bir deniz hıyarı türü olan *Isostichopus badionotus*'un kendi mide-bağırsak enzimleri ile yapılan hidrolizasyonu sonucunda hidrolizatların indirgeme gücünün askorbik aside göre oldukça düşük olduğu bildirilmiştir (Vega ve ark., 2013). Li ve ark. (2013) ise, *Apostichopus japonicus* Selenka deniz hıyarı işleme sıvısı atıklarında yaptıkları çalışmada indirgeme gücünün aktivitesini 1,0 mg /ml konsantrasyonda 0,85 olarak, aynı konsantrasyonda C vitaminin aktivitesini ise 0,92 olarak bildirmişlerdir. Tarak (*Patinopecten yessoensis*) proteininin nötraz enzimi ile hidrolizatlarının 3 - 21 mg/ml konsantrasyon aralığındaki indirgeme güçleri 0,32 - 1,2 olarak, C vitaminin ise 0,4 - 1,3 değerleri arasında olduğu rapor edilmiştir (Wu ve ark., 2016).

Farklı protein kaynaklarının indirgeme gücüne ait yukarıda verilen bulgularla, bu çalışmada benzer konsantrasyonda *H. tubulosa*'dan elde edilen örneklerin indirgeme gücü benzerlik göstermektedir. Araştırmacıların genel olarak 2 - 3 mg/ml konsantrasyonlarda bildirdikleri ve iyi absorbans değerleri olarak ifade ettikleri değerler olan 0,22 - 0,83 absorbans değerleri, bu çalışma da 0,12 - 0,63 değerleri aralığında belirlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada, hem referans örneklere göre, hem de referans çalışmalardaki ifadelerle göre, *H. tubulosa*'ya ait protein ve hidrolizatlarında, indirgeme ajanı potansiyeline sahip olduğu anlaşılmaktadır.

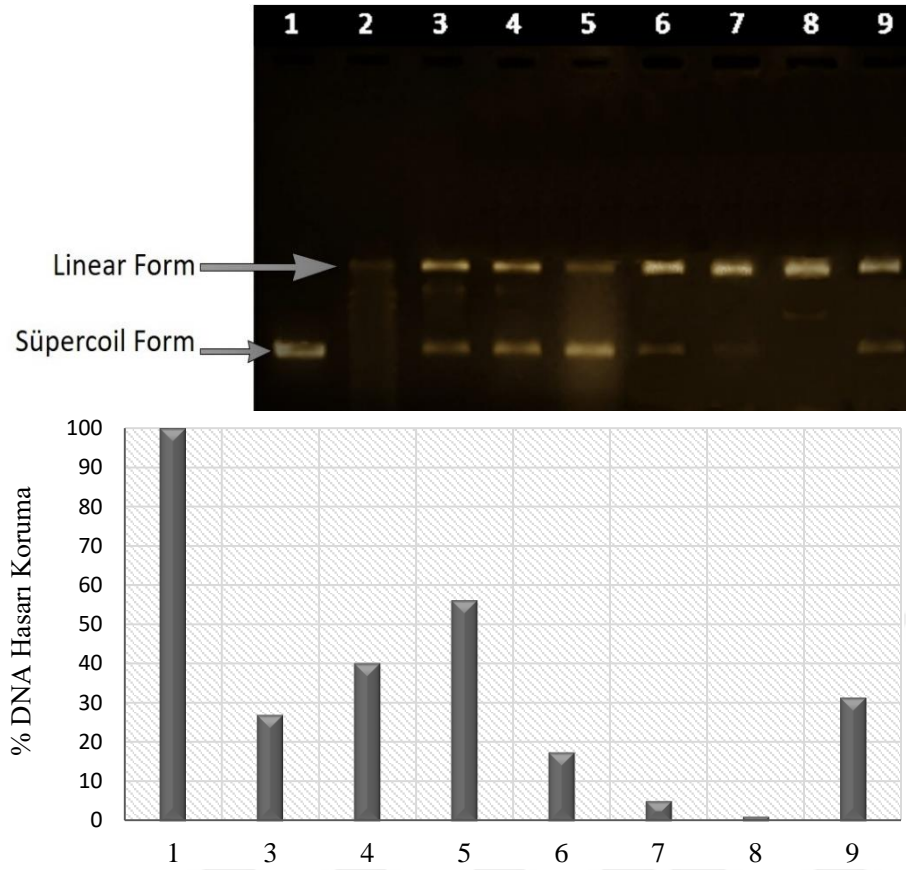
#### 4.3.2.4. Hidroksil Radikal Tesiriyle Oluşan DNA Hasarını Koruma Özelliği

DNA, serbest radikaller tarafından oluşan oksidatif hasarının bir diğer hassas hedefidir. Bu yüzden, aşırı serbest radikal oluşumunun canlıda DNA hasarına yol açması çok muhtemeldir. DNA hasarı sonucu kanser ve sinir hastalıkları oluşmakta, bunların oluşmasında ise hidroksil radikaller ( $\bullet\text{OH}$ ) büyük rol oynamaktadır (Je ve ark., 2015; You ve ark., 2002).

Bu çalışmada deniz hıyarı protein ekstrakt ve hidrolizatlarının in vitro olarak hidroksil radikallerin tesiriyle oluşan DNA hasarını koruma potansiyeli incelenmiştir. Oksidatif şartlar altında süper sarmal DNA, açık hale dönüşmekte ve ethidium bromür ile bu değişim, elektroforez ile gözlemlenebilmektedir. Süpercoil plasmid DNA'sı tek bir güçlü bant olarak jelin alt kısımlarında görülürken, hidroksil radikal tesiriyle hasar görerek konformasyonu değişen DNA'lar süpercoil formdan önce bir bant oluşturmaktadır. Oluşan hasar ne kadar güçlü ise süpercoil DNA bantının ışması o kadar azalmakta, linear formdaki bantın görüntüsü artmaktadır.

Bu çalışmada, *H. tubulosa*'dan elde edilen, çözücü ekstraktı, protein ve hidrolizatlarının, 50 µg konsantrasyonda, *E. coli* pBR3222 plasmid DNA'sının süpercoil yapısını koruma özelliği araştırılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.13'te özetlenmiştir.

Hidrojen peroksit eklenmemiş olan kontrol grubunda DNA süpercoil bantının % 100 olarak kabul edildiği testlerde, vücut duvarı toplam protein ekstraktının maksimum konsantrasyon olan 20 mg/ml'de % 27,13 oranında koruma yapabildiği belirlenmiştir. Aynı konsantrasyonda kolajen ise % 40,27, pepsin ile çözünebilen kolajen ise % 56,24 oranı ile en yüksek koruma özelliğini gösterdiği tespit edilmiştir. İç organ tripsin hidrolizatı ise % 5,12'lik oranla en düşük DNA hasarı koruma özelliğine sahip örnek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.13).



1: Kontrol (Bozulmamış DNA yapısı) 2: Pozitif Kontrol (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile tamamen hasar verilen DNA) 3: Vücut duvarı protein ekstraktı, 4: Kolajen 5: Kolajen pepsin hidrolizati, 6: Kolajen tripsin hidrolizati, 7: İç organ pepsin hidrolizati 8: İç organ tripsin Hidrolizati 9: Total ekstrakt

Şekil 4.13. *Holothuria tubulosa*'dan elde edilen örneklerin *E. coli* pBR32 plasmid DNA'sını oksidatif hasara karşı koruma dereceleri

DNA hasarı belirleme çalışmalarında kullanılan konsantrasyon ve saflaştırmanın hasarın belirlenmesinde önemli rol oynadığı görülmüştür. *Stichopus japonicus* deniz hıyarı türünün iç organ hidrolizati ile yapılan bir çalışmada, hidrolizatlar önce fraksiyonlarına ayrıştırılmış ve ayrıştırılan fraksiyonlar saflaştırılarak elde edilen oligopeptidlerin, 2 mg/ml konsantrasyonlarında pBR3222 plasmid DNA'sının hidroksil radikal tesiriyle oluşan hasara karşı koruma sağlamadığı, ancak 30 mg/ml konsantrasyonlarda etkili bir koruma sağladığı rapor edilmiştir (Zheng ve ark., 2012). Ahn ve ark. (2014) salmon atıklarından yaptıkları hidrolizatlardan elde ettikleri octapeptidin antioksidan aktivitesini inceledikleri çalışmada, *E. coli* PBR3222 plasmid DNA'sının süpercoil formunu koruma özelliğini de incelemişler ve araştırmacılar saflaştırdıkları octapeptidin 400 µM konsantrasyonunun % 48,58'e kadar DNA hasarı koruma özelliği gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Je ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada ise orkinos balığı karaciğer hidrolizatlarında,

farklı enzimler ile elde ettikleri hidrolizatlardan farklı boyutlarda peptid fraksiyonları elde etmiş ve bu fraksiyonların iyi bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ifade etmişlerdir. *E. coli* pBR3222 plasmid DNA'sını hidroksil radikal tesiriyle oluşan hasara karşı 2 - 4 mg/ml konsantrasyonların koruma potansiyeli olduğunu ifade eden araştırmacılar, bu potansiyelin ikinci hidroliz aşamasında elde edilen peptidlerde daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (Je ve ark., 2009).

Himaya ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada ise Pasifik morina balığı deri jelatin hidrolizatından elde ettikleri peptid fraksiyonlarının iyi bir antioksidant kapasiteye sahip olduğunu ve hidroksil radikal tesiriyle oluşan DNA hasarını koruyucu özellik taşıdığını rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen tüm numune gruplarında DNA hasarı koruma özellikleri farklı oranlarda tespit edilmiş, ancak genel anlamda sonuçların yukarıda verilen araştırmacıların bulgularına benzer oranlara sahip olduğu görülmüştür (Je ve ark., 2009; Zheng ve ark., 2012; Ahn ve ark., 2014). *E. coli* pBR3222 plasmid DNA'sının süpercoil formunun korunduğu bariz belli olan, kolajen ve pepsin ile çözünebilen kolajen örneklerinin aynı zamanda demir şelatlama, indirgeme gücü gibi antioksidan özellikler bakımından da iyi bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir. Kolajen ve pepsin ile çözünebilen kolajenin hidrofobik özelliğinin olması ve vücudun hidroksil radikallere karşı savunma mekanizmalarında yer alan antioksidatif enzimlere (süperoksit dismutaz, glutatyon ve katalaz) benzer amino asit içeriğe sahip olması (peptidlerin N-terminallerindeki lösin amino asidinin varlığı), DNA hasarına karşı koruma özelliğini artıran ana nedenler olarak düşünülmektedir (Himaya ve ark., 2011).

#### **4.3.2.5. Antimikrobiyal Özelliği**

Antibiyotiklerin keşfinden sonra, insan ve hayvanların sağlıklı olabilmeleri için yoğun antibiyotik kullanımı gerçekleşmiştir. Ancak, yanlış ve uzun antibiyotik kullanımı ile özellikle bakterilerin, özel hücresel karakteristikleri aracılığıyla, antibiyotiklere karşı direnç göstermesine neden olmuştur. Bu sebeple, farklı kaynaklardan yeni antibiyotiklere ve daha önemlisi, doğal olan antimikrobiyal etkideki alternatif kaynaklara ihtiyaç doğmuştur. Bu ihtiyacın karşılanması amacıyla, karasal ve denizel canlılar üzerine bir çok araştırma yapılmış ve bazılarında antimikrobiyal etkiye sahip bileşikler elde edilmiştir. Ancak, henüz bu ihtiyaç tam anlamıyla karşılanmamış olup, özellikle deniz canlıları arasında bu yönde araştırılmayı bekleyen bir çok tür bulunmaktadır. Özellikle farklı immün ve savunma sistemlerine sahip olan canlılarda, nötrofil ve diğer fagositik hücrelerin

yanısına (Hancock, 1997), canlının vücut kısımlarında ihtiva ettiği proteinaz K, lizozim, laktoferrin, gibi doğal proteinlerin de antimikrobiyal aktivitesi olabilmekte, yanı sıra diğer proteinlerin enzim hidrolizasyonu ile de antimikrobiyal aktiviteye sahip proteinler elde edilebilmektedir.

Bu çalışmada deniz hıyarı protein ekstraktı, ve hidrolizatları, toplam çözücü ekstraktı ile vücut sıvısının belirlenen MİK değerleri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış, pozitif kontrol ve kıyaslama amacıyla Amoxycillin-Kluvanaik asidin kullanıldığı testin sonuçları 4.7’de gösterilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubu Amoxicillin-Kluvanaik aside göre protein ekstraktı ve kolajenin 50 mg/ml konsantrasyonda benzer etkide olduğu belirlenmiş, bu iki örneğin diğer örnek gruplarından daha üstün antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. İç organ, protein ve kolajen hidrolizatlarının önemli bir antimikrobiyal etkisi gözlenmemiş olup, vücut sıvısı ve toplam ekstraktında ise konsantrasyonlara bağlı olarak, 25 mg/ml üzerinde antimikrobiyal etki gözlemlenmiştir.

Uzun yıllardır doğal antimikrobiyal ajanların keşfedilmesine yönelik yapılan çalışmalara ilave olarak, son yıllarda deniz kaynaklı canlılar üzerine yapılan çalışmalar oldukça artmıştır. Özellikle kabuklular üzerine yapılan çalışmalar yoğunluktadır. Mavi yengeç (*Callinectes sapidus*) (Edward ve ark., 1996), Amerikan ıstakozu (*Homarus americanus*) (Battison ve ark., 2008), örümcek ıstakozu (*Hyas araneus*), (Stensvag ve ark., 2008) ve ıstiridyeye (*C. gigas*) (Liu ve ark., 2008) ile yapılan çalışmalarda; elde edilen protein ve protein hidrolizatlarının, bazı bakteri, mantar ve protozoa türlerine karşı antimikrobiyal, antiprotozoan ve antifungal aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Çizelge 4.7. *Holothuria tubulosa*'nın ekstraktı, vücut sıvısı, proteinleri ile bu proteinlerin hidrolizatlarının ve Amoxicillin-kluvanaik asit antibiyotığının antimikrobiyal aktiviteleri

<b><i>Salmonella typhimurium</i> (ATTC 51812)</b>											
mg/ml	AmxC	Ext	Vp	VpP	VpT	Col	CP	CT	BP	BT	VS
50	S	S	S	I	I	S	R	R	R	R	S
25	S	I	I	R	R	I	R	R	R	R	I
12,5	S	I	I	R	R	I	R	R	R	R	I
6	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1,5	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
0,75	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b><i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)</b>											
mg/ml	AmxC	Ext	Vp	VpP	VpT	Col	CP	CT	BP	BT	VS
50	S	I	S	I	I	S	R	R	R	R	S
25	S	R	S	R	R	I	R	R	R	R	I
12,5	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
6	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1,5	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
0,75	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b><i>Bacillus cereus</i> (ATTC 7464)</b>											
mg/ml	AmxC	Ext	Vp	VpP	VpT	Col	CP	CT	BP	BT	VS
50	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	I
25	S	R	I	R	R	I	R	R	R	R	R
12,5	S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R
6	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1,5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
0,75	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<b><i>Staphylococcus aureus</i> (ATTC 25923)</b>											
mg/ml	AmxC	Ext	Vp	VpP	VpT	Col	CP	CT	BP	BT	VS
50	S	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R
25	S	I	S	R	R	S	R	R	R	R	R
12,5	S	I	I	R	R	I	R	R	R	R	R
6	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
3	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
1,5	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
0,75	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

AmxC: Amoxicillin-Kluvanaik Asit, Ext: total ekstrakt, Vp: Vücut duvarı protein ekstraktı, VpP: Vp pepsin hidrolizati, VpT: Vp tripsin hidrolizati, Col: Kolajen, CP: Kolajen pepsin hidrolizati, CT: Kolajen tripsin hidrolizati, BP: İç organ pepsin hidrolizati, BT: İç organ tripsin hidrolizati, VS: vücut sıvısı

Derisidikenliler sınıfına ait canlılarda da antimikrobiyal etki gösteren bileşikler içeren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Haug ve ark. (2002), deniz kestanesi (*Strongylocentrotus droebachiensis*), deniz hıyarı (*Cucumaria frondosa*) ve deniz yıldızı

(*Asterias rubens*) türlerinin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla, bu canlıların iç organ, gonad, solunum ağaçları, vücut sıvısı ve vücut duvarlarını toplayarak, asetonitril ve triflorik asidik asit ile ekstraksiyonlarını yapmışlardır. Araştırmacılar, *Vibrio anguillarum*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerinde, üç türün hepsinde vücut duvarı ve vücut sıvısının antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu gözlemlemiş, deniz kestanesi iç organ ekstraktlarında antimikrobiyal aktivitenin hiç tespit edilmediğini, genel olarak diğer kısımların ekstraktlarında ise, deniz hıyarında oldukça az ancak, deniz yıldızında yüksek oranda antimikrobiyal aktivite görüldüğünü rapor etmişlerdir. Deniz hıyarının vücut duvarı yaşadığı ortamda olumsuz şartlara, özellikle mikroorganizmalara karşı dayanıklılık gösterdiğinden, araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Bir deniz hıyarı türü olan *Parastichopus parvimensis* vücut duvarı ekstraktı ile yapılan çalışmada ise araştırmacılar, Ampicillin ve Tetracycline antibiyotiklerinin yaklaşık % 7-10'u kadar etkide antimikrobiyal aktivite tespit ettiklerini bildirmişlerdir (Villasin ve Pomory, 2000). Yapılan bir çalışmada, *Holothuria atra*, *Holothuria scabra*, *Actinopyga echinites* ve *Actinopyga miliaris* deniz hıyarı türleri vücut duvarı alkol ekstraktlarının, *Aeromonas*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *S. aureus*, *Vibrio* ve *Aspergillus* cinsi mikroorganizmaların üzerinde çeşitli derecelerde antimikrobiyal etki tespit edildiği, ancak hiçbir vücut duvarı ekstraktının *Bacillus* sp. üzerinde bir etkiye sahip olmadığı rapor edilmiştir (Abraham ve ark., 2002). Bu çalışmada da, test edilen dört mikroorganizma içerisinde, referans antibiyotik de dahil olmak üzere, örneklerle en dirençli türün *B. cereus* olduğu tespit edilmiştir. Mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara dirençlilik göstermesi büyük ölçüde daha önceden bu ajanlar ile karşılaşmaları veya bu ajanlar ile karşılaşmış hayatta kalma becerisini kazanmış hücreler ile aynı popülasyonda bulunmaları ile alakalıdır. Diğer taraftan hücre duvarındaki farklılıkların (gram pozitif-negatif, maya-küf) antimikrobiyal ajanların etkisini değiştirmektedir. *B. cereus*, hücre kılıfı olan mikroorganizma türü olmasının, hem bu çalışmada hem de Abraham ve ark. (2002)'nin çalışmasında en dirençli organizma olmasının ana nedeni olarak düşünülmektedir. Tüm örnekler arasında en fazla antimikrobiyal aktivite, toplam protein ekstraktı ile kolajen örneklerinde tespit edilmiştir. Bu iki örnek gurubunda tespit edilen antimikrobiyal aktivitenin, büyük oranda, canlının temel savunma proteinlerini, hidrolize edilmeden doğal formunda kapsamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hayvanlarda bulunan antimikrobiyal özellikteki peptidlerin büyük çoğunluğunun dış ortama temas eden ve bakteri, virüs, mantar gibi mikroorganizmalara karşı immün sistemin temeli olan doku veya organlarda olduğu ifade

edilmektedir (Zasloff, 2002; Schaubert ve Gallo, 2008). Dolayısıyla, deniz hıyarlarında dış ortama temas eden birincil doku vücut duvarında bulunan proteinlerin, bu nedenle daha iyi antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu düşünülmektedir.

Yapılan önceki çalışmalardaki bulgular ile bu çalışmada referans antimikrobiyal ajan olarak kullanılan Amoxicillin-Kluavanaik asidin farklı konsantrasyonlarındaki antimikrobiyal aktivitelere göre, *H. tubulosa*'nın özellikle vücut duvarı proteinlerinin 50 mg/ml konsantrasyonlarda iyi düzeyde antimikrobiyal aktivite özellikleri tespit edilmiştir. Mevcut antimikrobiyal aktivitenin, artırılması veya daha etkin olabilmesi amacıyla ekstraksiyon, izolasyon aşamalarını takiben örneklerin saflaştırması ile antimikrobiyal aktivitenin daha iyi sonuçlar vereceği düşünülmektedir.





## BÖLÜM 5

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Su kaynaklarının ve bu kaynaklardan elde edilen ürünlerin etkin kullanımına yönelik yapılan çalışmalar, ülkemizin geleceğe dönük ekonomik faaliyetleri kapsamında büyük önem taşımaktadır. Çünkü su ürünleri sektörü ülke ekonomisine önemli katkılar sunan ve daha fazlası için de, potansiyeli bulunan bir sektördür. Ekonomiye katkı sağlayan başlıca su ürünleri; balık, kabuklu eklembacaklı ve yumuşakçalar, omurgasız canlılar ve alglerdir. Bu ürünlerin bir kısmı gıda olarak sunulmakta bir kısmı ise çeşitli endüstriyel alanlarda katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmektedir.

Deniz hıyarı, omurgasız ve derisi dikenli bir canlıdır. Ülkemiz denizlerinde; Karadeniz, Marmara ve Ege Denizi'nin kıyısal alanlarında, şu an 11 tür olarak varlıklarını sürdürmektedirler. Bu canlıların avcılığı, dalarak toplama usulü yapılmakta, toplanan deniz hıyarları ülke içinde değerlendirilmeden ihraç edilmektedir. Yani, ülkemizde bu canlıdan etkin fayda sağlayan bir sektör bulunmamaktadır. Bu durumu nispeten duyurabilmek için yapılan bu çalışmada, dünyanın bir çok ülkesinde değerli bir su ürünü olan deniz hıyarının ülkemizdeki yaygın türü *H. tubulosa*'nın, besin olarak nitelikleri belirlenmiş ve çeşitli endüstrilerde kullanımına yönelik değerinin de belirlenmesi amacıyla, fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri araştırılmıştır.

#### 5.1. Sonuçlar

Yapılan inceleme ve araştırmalar sonucunda elde edilen tespitler şu şekildedir;

- 1- Deniz hıyarının yenilebilir kısmı olarak tavsiye edilen vücut duvarında %81-86 su, % 7 -10 protein, % 1 yağ ve % 4 - 5 kül tespit edilmiş, iç organlarda ise besin içeriğinin %90 - 93 su, % 3- 5 protein, % 1-2 yağ ve % 1 kül'den oluştuğu belirlenmiştir. Vücut sıvısının besin içeriğinin olmadığı belirlenmiştir.
- 2- Deniz hıyarının içerdiği toplam amino asit miktarı 100 g deniz hıyarı etinde 8,10-9,80 g arasındadır. Glisin ve alanin majör amino asitler olarak belirlenmiştir.
- 3- Deniz hıyarının sahip olduğu yağ içeriğinde, doymamış yağlar (%57-64), doymuş yağ miktarından (%35-42) fazladır. Palmitik asit (%11), araşidonik asit (%6) ve dokoheksanoik asit (%6) ise, baskın yağ asitleridir.
- 4- En fazla bulunan mineral madde silisyum (91mg/kg) olarak belirlenmiş, ayrıca toksik elementlerden bazıları; arsenik, civa, nikel kurşun ve kadmiyum, Türk Gıda Kodeksinin belirttiği sınır değerlerin altında ihtiva ettiği tespit edilmiştir.

- 5- Deniz hıyarı proteinlerinin hidrolizasyonunda et en etkili enzim tripsindir. Enzimin % 1 - 6 konsantrasyonlarında, % 50'ye kadar hidroliz sağlanabilmektedir.
- 6- Deniz hıyarı proteinleri ve hidrolizatlarında çözünürlük özelliği; en iyi pH 7'de belirlenmiş ve % 80'e kadar gerçekleşmiştir. En iyi çözünürlük ise, iç organ hidrolizatlarında belirlenmiştir.
- 7- Nem-çekme ve tutma kapasitesi ise yine en iyi iç organ hidrolizatlarında % 71 - % 155 olarak tespit edilmiştir. İç organ hidrolizatlarının RH % 43'te nem tutma özelliğinin, referans madde olan gliserolden daha iyi olduğu belirlenmiştir.
- 8- Emülsiyon aktivite indeksi ise; en iyi pH 7'de kolajen hidrolizatında (66 m<sup>2</sup>/g), emülsiyon dayanıklılığı ise pH 7'de ile iç organ pepsin hidrolizatında (% 49 / 30 dk) tespit edilmiştir.
- 9- En iyi köpük özellikleri, pH 7 ve 10'da kolajen ve vücut duvarı proteininde % 45-57 oranlarında belirlenmiştir.
- 10- DPPH radikallerini en iyi süpürme yeteneği, kolajen ve hidrolizatlarında (% 75 - 85) bulunmuştur.
- 11- Şelatlama yeteneğinin en iyi olduğu örnekler ise, vücut duvarı pepsin hidrolizatı (% 81), iç organ (% 78) ve kolajen pepsin (% 77) hidrolizatlarında, tespit edilmiştir.
- 12- İndirgeme gücü en iyi, vücut duvarı proteini ile kolajen ve bunların hidrolizatlarında (1,63 - 1,65 nm) belirlenmiş, örneklerin indirgeme gücünün C vitamini ve BHT (1,78 - 1,80) referans antioksidanlarına çok yakın olduğu tespit edilmiştir.
- 13- Hidroksil radikal tesiriyle oluşan DNA hasarına karşı, kolajen pepsin hidrolizatının % 56 oranı ile gruplar arasında en yüksek derecede koruma sağladığı belirlenmiştir.
- 14- Amoksisilin-kluvanaik asit referans antibiyotigine göre, deniz hıyarından elde edilen ekstrakt ve hidrolizat numuneleri arasında, kolajen ve vücut duvarı proteinin 20 mg/ml konsantrasyonda diğer gruplardan daha iyi antimikrobiyal etkisi olduğu belirlenmiştir.

## **5.2. Öneriler**

- 1- Deniz hıyarı besin olarak, fonksiyonel özellik taşıyan iyi nitelikte bir üründür. Dolayısıyla Türkiye'de de tüketiminin gerçekleşmesi için girişim ve tanıtım çalışmalarının yapılması gereklidir.
- 2- Deniz hıyarının ülkemiz denizlerindeki stokları belirlenerek, bu canlıya ait üreme dönemlerinin net olarak tespit edilmesi, gerekli yasal düzenlemeler yapılarak kontrol altında sürdürülebilir avcılığın sağlanması gerekmektedir.

- 3- Avcılık ile yoğun olarak sömürülen bu canlının doğadaki sürdürülebilir üretimi için; yetiştiriciliğinin teşvik edilmesi, gerekli bilimsel çalışma ve projelerin yapılarak girişimcilerin desteklenmesi gerekmektedir.
- 4- Deniz hıyarının içerdiği proteinlerin gıda endüstrisinde, özellikle emülsiyon ve köpük ajanı olarak kullanımının detaylı araştırılması önemlidir. Bu bilgiler doğal katkı maddeleri ile gıda üretim hedefinde olan sektör unsurları için oldukça yararlı olacaktır.
- 5- Deniz hıyarı kolajeni, çalışılması ve eldesi zor bir bileşendir. Kolajenin kısa sürede, verimi yüksek ve maliyeti düşük şekilde elde edilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
- 6- Deniz hıyarı proteinlerinin, özellikle vücut duvarı proteinlerinin farklı enzimler ile hidrolizasyonu ve elde edilen hidrolizatların peptidlere ayrılarak daha ayrıntılı özelliklerin tespitinin yapıldığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abedin Z., Karim A.A., Latiff A., Gan C.Y. Ghazali F.C. Barzideh Z. Ferdosh S. Akanda J.H., Zzaman W. Karim R. ve Sarker Z.I. 2014. Biochemical and radical-scavenging properties of sea cucumber (*Stichopus vastus*) collagen hydrolysates. Natural Product Research:Formerly Natural Product Letters.
- Abraham T.J., Nagarajan, J. ve Shanmugam, S.A. 2002. Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. Indian Journal of Marine Sciences.31:161-164.
- Achour A., Lachgar A.ve Astgen A. 1997. Potentialization of IL-2 effect on immune cells by oyster extract (JCOE) in normal and HIV-infected individuals. Biomed. & Pharmacother. 51: 427-429
- Adler-Nissen J. 1976. Enzymic hydrolysis of proteins for increased solubility. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 24: 1090-1093
- Adler-Nissen, J. 1993. Proteases. In: Nagodawithana T, Reed, G. (Eds). Enzymes in food processing, 3rd ed. New York: Academic Press, Inc.p. 159-203.
- Aewsiri T., Benjakul S. ve Visessanguan W. 2009. Functional properties of gelatin from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin as affected by bleaching using hydrogen peroxide. Food Chemistry. 115:243-249.
- Ahn C.B., Kim J.G. ve Je J.Y. 2014. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. Food Chemistry. 147: 78-83.
- Aleman A., Santin, E.P., Juchereau B., Arnaudin, I., Guillen, M.C.G. ve Montero, P. 2011. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. Food Research International. 44: 1044-1051.
- Ameye L., De Becker G., Killian C., Wilt F., Kemps R., Kuypers S. ve Dubois P. 2001. Proteins and saccharides of the sea urchin organic matrix of mineralization: characterization and localization in the spine skeleton. Journal of Structural Biology, 134: 56-66.
- Anonim 2014. Retrieved March 12, 2017, from <http://bucaio.blogspot.com.tr/2014/03/hong->

kong-sheung-wan-dried-seafood.html.

Anonim, 2015. Retrieved April 25, 2016, from, en.wikipedia.org/holothuria\_tubulosa

Anonim 2016a. Retrieved October 12, 2016, from

[https://projects.ncsu.edu/project/bio402\\_315/Echinodermata/Echinoderms%203%202015.html](https://projects.ncsu.edu/project/bio402_315/Echinodermata/Echinoderms%203%202015.html)

Anonim 2016b. Tebliğ no: 2016/35: 4/1 Numaralı ticari amaçlı su ürünleri avcılığının düzenlenmesi hakkında tebliğ.

Althunibat O.Y, Ridzwan, B.H., Taher, M., Jamaludin, M.D., Ikeda, M.A. ve Zali, B.I. 2009. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. Eur. J. Sci. Res.37: 376–387.

AOAC 2000. Official Methods of Analysis of the AOAC International (17th). Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA. 2000 p.

Aydın M., Sevgili H., Tufan B., Emre Y. ve Köse S. 2011. Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. International Journal of Food Science & Technology,46, 500-508.

Badawy A.A.B. Morgan C.J. ve Turner J.A., 2008. Application of the Phenomenex EZ:faast™ Amino Acid Analysis Kit for Rapid Gas-Chromatographic Determination of Concentrations of Plasma Tryptophan and Its Brain Uptake Competitors. Amino Acids, 34: 587-596.

Balti R. Jridi M., Sila A., Souissi N., Arroume N.N. Guillochon D. ve Nasri M. 2011. Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process. Food Hydrocolloids. 25:943-950.

Bartlett T.C. Cuthbertson B.J. Shepard E.F. Chapman R.W. Gross P.S. ve Warr G.W. 2002. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. Marine Biotechnology. 4: 278-293.

Battaglione S.C. Seymour J.E. ve Ramofafia C. 1999. Survival and growth of cultured juvenile sea cucumbers, *Holothuria scabra*. Aquaculture. 178: 193-322.

- Battison A.L., Summerfield R. ve Patrzykat A. 2008. Isolation and characterization of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster *Homarus americanus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 181-187.
- Bechtel P.J. Oliveira A.C.M.,- Demir N. ve Smiley S. 2013. Chemical composition of the giant red sea cucumber, *Parastichopus californicus*, commercially harvested in Alaska. *Food Science and Nutrition*.1:63-73.
- Belitz H.U., Grosch W. ve Schieberle P. 2009. Fish, Whales, Crustaceans, Mollusks. In: *Food Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 617-639.
- Benjakul S. ve Morrissey M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 3423–3430.
- Benjakul S. ve Sutthipan N. 2009. Comparative study on chemical composition, thermal properties and microstructure between the muscle of hard shell and soft shell mud crabs. *Food Chemistry*,112: 627-633.
- Blackburn S. 1978. Sample preparation and hydrolytic methods.p.7-45 in: *Amino acid determination: Methods and Techniques*. 2nd eds. S. Blackburn, Marcel Dekker, Inc. NewYork.
- Blackburn S. 1983. *Amino Acids and Amines*. CRC Handbook of Chromotography: Amino acids and amines Volume 1. 312.
- Bligh E.G. ve Dyer W.J. 1959. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37: 911-917.
- Bougatef A. Balti, R. Haddar, A. Jellouli, K. Souissi, N. Nasri, M. 2012. Protein hydrolysates from Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) heads as influenced by the extent of enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 17: 841–852.
- Bruckner A., Johnson K. and Field J. 2003. Conservation strategies for sea cucumbers: can a CITES Appendix II promote international trade? *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin* 18:24–33.
- Brooks J.M. ve Wessel G.M. 2002. The Major Yolk Protein in Sea Urchins Is a Transferrin-like, Iron Binding Protein. *Developmental Biology*, 245: 1-12.
- Bulet P., Stocklin, R. ve Menin L. 2004. Anti-microbial peptides: From invertebrates to

- vertebrates. *Immunological Reviews*. 198:169–184
- Butterfield D.A., Castenga, A., Pocernich, C.B., Drake, J., Scapagnini, G. ve Calabrese V. 2002. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease *Journal of Nutritional Biochemistry*.13: 444–46
- Byun H.G., Lee, J.K., Park, P.J., Lin, X. ve Kim, S.K. 2009. Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Process Biochemistry*.44:842-846.
- Cameron J.L. ve Fankboner, P.V. 1984. Tentacle structure and feeding processes in life stages of commercial sea cucumber *Parastichopus californicus* (Stimpson). *Journal of Experimental Biology and Ecology*. 81:193-209.
- Campbell N.A. ve Reece J.B. 2002. *Biology*. 6th Edition. Benjamin Cummings, USA.Pp: 1247.
- Chen 2003. Chen, J. 2003. Overview of seacucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC Beche-de-mer Inf. Bull.* 18: 18–23.
- Chen 2004. Chen, J.X. (2004): Present status and prospects of sea cucumber industry in China. *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management (ASCAM)*. FAO, Rome, Italy, pp. 25-38.
- Chi Z.M., Yan K.R., Gao L.M., Li J., Wang X.H. ve Wang L., 2008. Diversity of marine yeasts with high protein content and evaluation of their nutritive compositions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88: 1347- 1352.
- Choi Y.J. Hur, S., Choi, B.D., Konno, K. ve Park, J.W. 2008. Enzymatic Hydrolysis of Recovered Protein from Frozen Small Croaker and Functional Properties of Its Hydrolysates. *Journal of Food Science C: Food Chemistry*. 74: 17-24.
- Choonpicharn S., Jaturasitha S., Rakariyatham N. Suree N. ve Niamsup H. 2015. Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin. *Journal of Food Science and Technology*.52: 3134-3139.
- Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H. ve Catignani G.L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins . *Journal of Dairy Science*. 66:1219-1227

- Clemente A., Vioque J., Sánchez-Vioque R., Pedroche J., Bautista J., Millán F. (1999): Protein quality of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 67: 269–274.
- Clemente A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 11:254–262.
- Conand C. 1981. Sexual Cycle of Three Commercially Important Holothurian Species (Echinodermata) From The Lagoon of New Caledonia, *Bulletin of Marine Science*, 31:523-543.
- Conand C. 1990. The Fishery Resources of Pacific Island Countries. Part 2: Holothurians, *FAO Fisheries Technical Paper*.
- Conand C. 2004. Present status of world sea cucumber resources and utilisation: an international overview. p. 13–23 In: Lovatelli A., Conand C, Purcell S., Uthicke S., Hamel J.-F. ve Mercier A. (eds.) *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. *FAO Fisheries Technical Paper No.* p.463. 425
- Çaklı S., Cadun A., Kışla D. ve Dinçer T. 2004. Determination of quality characteristics of *Holothuria tubulosa*, (Gmelin, 1788) in Turkish Sea (Aegean Region) depending on sun drying process step used in Turkey. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 13: 69-78
- Damodaran S. 1996. Amino acids, peptides, and proteins, in *Food Chemistry*, 3rd ed., Ed. Fennema, O. R.. Marcel Dekker Inc., New York
- Demetriades K., Coupland J. N., ve McClements D. J. 1997. Physical properties of whey protein stabilized emulsions as related to pH and NaCl, *J. Food Sci.*, 62: 342, 1997.
- De Holanda H.D. ve Netto, F.M. 2006. Recovery of components from shrimp (*Xiphopenaeus kroyeri*) processing waste by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Science*, 71, 298–303.
- Dong S., Zeng M., Wang D., Liu Z., Zhao Y. ve Yang H. 2008. Huicheng Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) *Food Chemistry*, 107, pp. 1485–1493
- Duan Z.H., Wang J.L., Yi M.H. ve Yin A.Q. 2010. Recovery Of Proteins From Silver



- Carp By-Products With Enzymatic Hydrolysis And Reduction Of Bitterness In Hydrolysate. *Journal of Food Process Engineering*.33: 962-978.
- Du Z.P., Montoya M.P.B., Binks B.P., Dickinson E., Ettelaie R. ve Brent S. 2003. Outstanding stability of particle-stabilized bubbles. *Langmuir* 19: 3106–3108.
- Dubrow D.L., Kramer A. ve Mcphee A.D. 1973. Effect of temperature on lipid extraction and functional properties of fish protein concentrate (Fpc). *Journal of Food Science*. 38: 1012-5.
- Edward N.J., Arroll T.A. ve Fan Z. 1996. Specificity and some physicochemical characteristics of the antibacterial activity from blue crab *Callinectes sapidus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 6: 403–413.
- EPA 1998. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Method 3051A. <http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3051a.pdf> (visit date Dec. 2015)
- EPA 2000. Inductively coupled plasma - mass spectrometry. Method 6020A. <http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-6020a.pdf> (visit date Dec. 2015)
- Eisler R. 1988. Arsenic hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep. 85(1.12).
- Esmat A.Y., Said M.M., Soliman A.A., El-Masry K.S.H. ve Badiea E.A. 2013. Bioactive compounds, antioxidant potential, and hepatoprotective activity of sea cucumber (*Holothuria atra*) against thioacetamide intoxication in rats. *Basic nutritional investigation*. 29: 258-267.
- FAO, 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries Global Information System, Online Query, Erişim: 16 Ekim 2016.
- Fankboner P.V. 1978. Suspension-feeding mechanisms of armored sea cucumber *Psolus chitinoides* Clark. *J Exp. Mar. Biol Ecol*. 31: 11-25
- Forghani B., Ebrahimpour A., Bakar J., Hamid A.A., Hassan Z. ve Saari N. 2012. Enzyme Hydrolysates from *Stichopus horrens* as a New Source for Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Peptides. *Evidence-Based Complementary and Alternative*

- Medicine. 2012:9.
- Fountoulakis M. ve Lahm H.W. 1998. Hydrolysis and amino acid composition of proteins. *Journal of Chromograph A*. 826: 109-134.
- Fox P. F., Morrissey P. A., Mulvihill, D.M. 1982. Chemical and enzymatic modification of food proteins. In *Developments in food proteins 1*; Hudson, B. J. F., Ed.; Applied Science Publishers: London.
- Fredalina B.D., Ridzwan B.H., Abidin A.A.Z., Kaswandi, M.A., Zaiton, H., Zali, I., Kittakooop, P. ve Jais, A.M.M. 1999. Fatty acid compositions in local sea cucumber, *Stichopus chloronotus*, for wound healing. *General Pharmacology*. 33: 337-340.
- Galla N.R., Pamidighantam P.R., Akula S. ve Karakala B. 2012. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. *Food Chemistry*. 135:1479-1484
- Gbogouri G.A., Linder M., Fanni J. ve Parmentier M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Chemistry and Toxicology* 69: 615-622.
- Ghanbari R., Zarei M., Ebrahimpour A., Abdul-Hamid A., Ismail A. ve Saari N. 2015. Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory and Anti-Oxidant Activities of Sea Cucumber (*Actinopyga lecanora*) Hydrolysates *International Journal of Molecular Sciences*.16: 28870-28885
- Gimenez B., Aleman A., Montero P. ve Guillen M.C.G. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*. 114:976-983
- Ginger M.L., Santos V. ve Wolf G.A. 2000. A preliminary investigation of the lipids of abyssal holothurians from the northeast Atlantic Ocean. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 80:139–146
- Gözükara E.M. 1994. *Biyokimya 1*. Evin Matbaası, Malatya.p.571.
- Guerard F. Dufosse L., Broise D.D.L. ve Binet A. 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11:1051-1059.

- Hale M.B. 1972. Making fish protein concentrate by enzymatic hydrolysis, NOAA Technical Report NMFS SSRF-675, US Department of Commerce, Seattle, WA, pp. 1–31
- Hancock R.E. 1997. Peptide antibiotics. *Lancet* 349:418–422
- Sicuro, B. Piccinno, M., Gai, F., Abete, M.C., Danieli, A., Dapra, F., Mioletti, S. ve Vilella, S. 2012. Food Quality and Safety of Mediterranean Sea Cucumbers *Holothuria tubulosa* and *Holothuria polii* in Southern Adriatic Sea. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 7: 851-859.
- Hawa I., Zulaikah, M., Jamaludin, M., Zainal Abidin, A.A., Kaswandi, M.A. ve Ridzwan, BH. 1999. The potential of the coelomic fluid in sea cucumber as an antioxidant. *Malesian Journal of Nutrition*.5:55-59.
- Harnedy P. ve FitzGerald R.J. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*.4:6-24.
- Haug T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsun, O.M. ve Stensvag, K. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*. 81:94-102.
- He X., Cao W., Zhao Z. ve Zhang C. 2013. Analysis of protein composition and antioxidant activity of hydrolysates from *Paphia undulate*. *Journal of Food and Nutrition Research*, 3: 30-36.
- Hettiarachchy N.S. Glenn, K.C. Gnanasambandan, R. ve Johnson, M.G. 1996. Natural antioxidant extract from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties *Journal of Food Science*. 61: 516–519.
- Hedstorm L. 2010. Enzyme Specificity and Selectivity. eLS.
- Himaya S.W.A., Ngo, D.H., Ryu, B. ve Kim, S.K. 2012. An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. *Food Chemistry*. 132:1872–1882.
- Higgins M. 2000. Sea cucumbers in a deep pickle. *Environmental News Network*.
- Hirs C.H.W., Stein, W.H. ve Moore, S. 1954. *Journal of Biological Chemistry*. 211, 941.

- Hoyle N. ve Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*), *J. Food Sci.*, 59, 76.
- Hou H., Li, B., Zhang, Z., Xue, C., Yu, G., Wang, J., Bao, Y., Bu, L., Sun, J., Peng, Z. Ve Su, S. 2012. Moisture absorption and retention properties, and activity in alleviating skin photodamage of collagen polypeptide from marine fish skin. *Food Chemistry*. 135: 1432-1439
- Ilias Z. 2010. Gamat perairan Malaysia: Kepelbagaian spesies dan kegunaannya. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa dan Pustaka.
- IUPAC, 1987. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 7th Ed. IUPAC. Blackwell Scientific Publishing. Ltd, Oxford.
- Jimenez G.M.S., Sanches, R.M.R., Plascencia, G.Y. Hernandez, A.B. ve Brauer, J.M.E. 2015. In vitro antioksidant, antimutagenic and antiproliferative activities of collagen hydrolysates of Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) by products. *Food science and technology (campinas)*. 35.
- Je J.Y., Qian, Z., Byun, H. ve Kim, S. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 42: 840-846.
- Je J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H. ve Ahn, C.M. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 42: 1266-1272.
- Je J.Y., Park, S.Y., Hwang J.Y ve Ahn C.B. 2015. Amino acid composition and in vitro antioxidant and cytoprotective activity of abalone viscera hydrolysate. *Journal of Functional Foods*. 16: 94-103
- Jridi M., Souissi, N., Mbarek, A., Chadeyron, G., Kammoun, M. ve Nasri, M. 2013. Comparative study of physico-mechanical and antioxidant properties of edible gelatin films from the skin of cuttlefish. *International Journal of Biological Macromolecules*. 61: 17-25
- Jongjareonrak A., Rawdkuen S., Chaijan, M., Benjakul, S., Osako, K. ve Tanaka, M. 2010. Chemical compositions and characterisation of skin gelatin from farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*) *LWT- Food Science and Technology*. 43: 161-165.

- Joo S. T., Kauffman, R.G., Kim B.C. ve Park. G.B. 1999. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine longissimus muscle. *Meat Science*. 52:291-297.
- Jun S.Y. Park P.J. Jung W.K. ve Kim Sk.K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research Technology*. 219: 20-26.
- Jung W.K., Rajapakse, N. ve Kim S.K. 2005. Antioksidative activity of a low molecular weight peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. *European Food Research and Technology*. 220:535-539.
- Kale A., Kale E., Akdeniz N. ve Canoruc N., 2006. Elevated Amniotic Fluid Amino Acid Levels in Fetuses with Gastroschisis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39: 1021-1025.
- Kazanidis G., Antoniadou C., Lolas A.P., Neofitou N., Vafidis D., Chintiroglou C. ve Neofitou C. 2010. Population Dynamics and reproduction of *Holothuria tubulosa* (Holothuroidea: Echinodermata) in the Aegean Sea. *J Mar Biol Assoc UK* 90: 895–901.
- Kim S.K., Byun H.G. ve Lee E.H. 1994. Optimum extraction conditions of gelatin from fish skins and its physical properties. *Journal of Korean Industrial and Engineering Chemistry*, 5, 547–559
- Kim Y.M. ve Lidstorm, M.E. 1989. Plasmid analysis in pink facultative methylotrophic bacteria using a modified acetone-alkaline hydrolysis method. *FEMS Microbiology Letters*.51: 125-130.
- Kim S.K. ve Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*. 2: 1-9
- Kinsella J.E. 1979. Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 56: 242-258.
- Klompong V., Benjakul S., Kantachote D. ve 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.

- Kolodziejska I., Sikorski Z.M. ve Sadowaka M. 1987. Texture of cooked mantle of squid *Illex argentinus* as influenced by specimen characteristics and treatments *Journal of Food Science*, 52: 932-935.
- Koukouras A., Sinis A.I., Bobori D., Kazantzidis S., Kitsos M.S. 2007. The echinoderm (Deuterostomia) fauna of the Aegean Sea and comparison with those of the neighbouring seas. *Journal of Biological Research*. 7: 67-92.
- Koç S. 2016. Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve işleme atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının besleyici, fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin araştırılması. Doktora Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kristinsson H.G. ve Rasco, B.A. 2000. Fish Protein Hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews on Food Science and Nutrition*. 40: 43-81.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lee M.H., Kim Y.K., Moon H.S., Kim K.D., Kim G.G., Cho H.A., Yoon N.Y., Sim K.B., Park H.Y., Lee D.S., Lim C.W., Yoon H.D. ve Han S.K. 2012. Comparison on Proximate Composition and Nutritional Profile of Red and Black Sea Cucumbers (*Apostichopus japonicus*) from Ulleungdo(Island) and Dokdo(Island), Korea. *Food Science and Biotechnology*, 5 :1285-1291
- Lee S.J. Kim E.K., Hwang J.W. Oh H.J., Cheong S.H., Moon S.H., Jeon B.T., Lee S.M ve Park P.J. 2010. Purification and characterisation of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products. *Food Chemistry*.123: 216-220.
- Liu X., Sun, Z., Zhang M., Meng X., Xia X., Yuan W., Xue F. ve Liu, C. 2012. Antioxidant and antihyperlipidemic activities of polysaccharides from sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Carbohydrate Polymers*. 90: 1664-1670.
- Liu Z., Yicheng S.U. ve Mingyong Z. 2011. Amino Acid Composition and Functional Properties of Giant Red Sea Cucumber (*Parastichopus californicus*) Collagen Hydrolysates. *Journal of Ocean University of China*, 10: 80-84.
- Lowenstam H.A. ve Rossman G.R. 1975. Amorphous, hydrous, ferric phosphatic dermal

- granules in Molpadia (Holothuroidea): Physical and chemical characterization and ecologic implications of the bioinorganic fraction. *Chemical Geology*. 15: 15-51.
- Liu Z., Dong S., Xu J., Zeng M., Song H. ve Zhao Y. 2008. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control*, 19: 231–235
- Lullo G.A. Sweeney S.M. Korkko J., Ala-Kokko L. ve San Antinio J.D. 2002. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 4223-31.
- Lü J.M., Lin P.H., Ya, Q. ve Chen C., 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* 14: 840-860.
- Mamelona J., Louis R.S. ve Pelletier E. 2010. Proximate composition and nutritional profile of by-products from green urchin and Atlantic sea cucumber processing plants. *International Journal of Food Science and Technology*. 45, 2119-2126.
- Mamelona J., Louis R.S. ve Pelletier E. 2010. Nutritional composition and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from echinoderm by products. *International Journal of Food Science and Technology*, 45: 147-154
- Mamelona J., Pelletier E., Girard-Lalancette K., Legault J., Karboune S. ve Kermasha S. 2007. Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry*, 104: 1040-1047.
- Mahmoud M.I. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products, *Food Technology*. 58: 89
- Mannheim A. ve Cheryan M. 1990. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *Journal of Food Science*. 55: 381-385.
- Mateo C., Palomo J.M., Lorente G.F., Guisan J.M. ve Lafuente R.F. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*. 40:1451-1463.
- Mendis E., Rajapakse N., Byun H.G. ve Kim S.K. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects *Life*

- Sciences. 77: 2166–2178.
- McIntyre P. ve Stark G.R. 1988. A quantitative method for analyzing specific DNA sequences directly from whole cells. *Analytic Biochemistry*. 174:209-214.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radikal diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioksidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*.26: 211-219.
- Moorjani M.N., Nair R.B. ve Lahiry N.L. 1968. Quality of fish protein concentrate prepared by direct extraction of fish with various solvents. *Food Technology*. 22: 1557.
- Mourão P.A., Pereira M.S., Pavão M.S., Mulloy B., Tollefsen D.M., Mowinckel M.C. ve Abildgaard U. 1996. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 23973-23984
- Muyonga J.H., Cole C.G.B. ve Duodu K.G. 2004. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) *Food Chemistry*. 85: 81–89
- Nagai T. ve Suzuki N. 2002. Preparation and partial characterization of collagen from paper nautilus (*Argonauta argo*, Linnaeus) outer skin. *Food Chemistry*.76:149-153.
- Nagarajan M., Benjakul S., Prodpran T., Songtipya P. ve Kishimura H. 2012. haracteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures. *Food Hydrocolloids*. 29:389-397.
- Nobsathian S., Tuchinda P., Sobhon P, Tinikul Y., Poljaroen,J. Tinikul R., Sroyraya M., Poomton, T. ve Chaichotranunt S. 2016. *Journal of Traditional Medicine & Clinical Naturopathy*.5:3.
- Omran N.S.E.S. 2013. Nutritional value of some Egyptian sea cucumbers. *African Journal of Biotechnology*.12:5466-5472.
- Ovissipour M., Abedian A., Motamedzadegan A., Rasco B., Safari R. ve Shahiri H. 2009. 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.

- Ozols J. 1990. Amino acid analysis. *Methods in Enzymology*. 182: 587-601.
- Özer N.P., Mol, S., Varlık, C. (2004): Effect of the Handling Procedures on the Chemical Composition of Sea Cucumber. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic sciences*, 4: 71-74.
- Park P.J., Jung W.K., Nam K.D., Shahidi F. Ve Kim S.K. 2001. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk *Journal of American Oil Chemists Society*. 78: 651–656
- Pearce K.N. ve Kinsella J.E. 1978. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 26:716-723.
- Rajapakse N., Mendis E., Jung W.K., Je J.Y. ve Kim S.K. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties *Food Research International*. 38: 175–182.
- Ranathunga S., Rajapakse N. ve Kim S.K. 2006. Purification and caharacterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *European Food Research Technology*. 222:310-315.
- Reddy K.V. Yedery R.D. ve Aranha C. 2004. Antimicrobial peptides: Premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24: 536–547
- Pangestuti R., Murniasih T., Putra M.Y. ve Untari F. 2016. Free radical scavenging activity of selected sea cucumber species from Mataram-Lombok, Indonesia. 78: 179-185
- Papon P., Leblon J. ve Meijer P.H.E. 2007. Gelation and transitions in biopolymers *The physics of phase transitions*, Springer, Berlin, Heidelberg pp. 189–213 Schrieber, R. ve Gareis, H. 2007. *Gelatine handbook*. Wiley-VCH GmbH & Co., Weinhem.
- Peng X., Xiong Y.L. ve Kong B. 2009. Antioksidant activity of peptide fractions from whey protein hyrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*.113: 196-201.
- Peraza M.A., Fierro F.A., Barber D.S. Casarez E. ve Rael T. 1998. Effects of Micronutrients on Metal Toxicity. Ed. Hook, G.E.R. ve Lucier, G.W. In: *Reviews in Environmental Health: Toxicological defense mechanics..* pp 210.

- Provansal M.M.P., Cuq J.L.A and Cheftel J.C. 1975. Chemical and nutritional modification of sunflower proteins due to alkaline processing. Formation of amino acid cross links and isomerization of lysine residues. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 23:938-943.
- Purcell S.W., Samyn Y. ve Conand C. 2012. *Commercially important seacucumbers of the world*, Roma, FAO Species Catalogue for Fishery Purposes Nb. 6, p.233
- Qi H., Li N., Zhao X., Xu Z. ve Qi L. 2016. Physicochemical Properties and Radical Scavenging Capacities of Pepsin-Solubilized Collagen from the Body Wall of Starfish (*Asterina pectinifera*). *Journal of Aquatic food product technology*.
- Qian Z.J., Jung W.K., Byun H.G. ve Kim S.K. 2008. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digest of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology*.99: 3365-3371.
- Quaglia G.B. ve Orban E. 1987. Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commercial proteases, *J. Sci. Food Agric.*, 38, 263,
- Quaglia G.B. ve Orban E. 1990. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysate. *Journal of Food Science*, 55, 1571–1573.
- Rajamohan T. ve Kurup P. 1997. Lysine:arginine ratio of a protein influences cholesterol metabolism. Part 1 – Studies on sesame protein having low lysine:arginine ratio. *Indian J Exp Biol*. 35 11: 1218–1223.
- Reich G., Walther S., ve Stather F. 1962. The influence of the age of cattle and pigskin on the yield and the quality of the gelatines obtained after the acid conditioning process. In *Investigation of Collagen and Gelatine IV* (Vol. 18) (pp. 24–30). Freiberg, SA: Deutsche Lederinstitut.
- Ridzuan H. 1993. *Sumber makanan pesisiran laut Sabah*. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa and Pustaka.
- Ridzwan B.H., T.C. Leong ve S.Z. Idid, 2003. The antinociceptive effects of water extracts from sea cucumbers *Holothuria leucospilota brandt*, *Bohadschia marmorata vitiensis jaeger* and coelomic fluid from *Stichopus hermannii*. *Pak. J. Biol. Sci.*, 6: 2068-2072.

- Ridzwan B.H., Hanita M.H., Nurzafirah M., Norshuhadaa M.P.S. ve Hanis Z.F. 2014. Free Fatty Acids Composition in Lipid Extracts of Several Sea Cucumbers Species from Malaysia. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*.4: 204-207.
- Robinson H.W. ve Hodgen C.G. 1940. The biuret reaction in the determination of serum protein I. A study of the condition necessary for the production of the stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. *The Journal of Biological Chemistry*, 135, 707–725.
- Rutherford S.M. 2010. Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC International*. 93: 1515-1522
- Sathe S.K. ve Salunke D.K. 1981. Functional Properties of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Proteins: Emulsion, Foaming, Viscosity, and Gelation Properties. *Journal of Food Science*. 46:71-81.
- Sathivel S., Bechtel P.J. Babbitt J., Smiley S. Crapo C., Reppond, K.D. ve Prinyawiwatkul W. 2003. Biochemical and Functional Properties of Herring (*Clupea harengus*) Byproduct Hydrolysates. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology*. 68:2196-2200.
- Saito M., Kunisaki, N., Urano, N. ve Kimura, S. 2002. Collagen as the Major Edible Component of Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*). *Journal of Food Science* 67: 1319-1322.
- Schauber J. ve Gallo, R.L. 2008. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *Journal of Allergy and Clinical Microbiology*.122:261-6.
- Schrieber R. ve Gareis, H. 2007. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA. Weinheim.p 331.
- Seifert J., Harmon, J. ve DeClercq, P. 2006. Protein Added to a sports drink improves fluid retention. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 16:420-429.
- Shahidi F., 1994. Seafood Proteins and Preparation of Protein Concentrate. In: Shahidi F., Botta J.R. *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*. Springer-Science+Business Media, USA. 3-9.

- Shahidi F., Han, X.Q. ve Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin. *Food Chemistry*. 53: 285-293.
- Sheriff S.A., Sundaram, B., Ramamoorthy, B. ve Ponnusamy, P. 2014. Synthesis and in vitro antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of *Rastrelliger kanagurta* by proteolytic enzymes. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 21:19-26
- Sicuro B., Piccinno, M., Gai, F., Abete, M.C., Danieli, A., Dapra, F., Mioletti, S. ve Vilella, S. 2012. Food Quality and Safety of Mediterranean Sea Cucumbers *Holothuria tubulosa* and *Holothuria polii* in Southern Adriatic Sea. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7: 851-859.
- Sikorski Z. E. ve Naczek, M. 1981. Modification of technological properties of fish protein concentrates, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 4, 201,
- Sims J. T., Avery, N. C. ve Bailey, A. J. 2000. Quantitative determination of collagen crosslinks. In C. Streuli, & M. Grant (Eds.), *Methods in molecular biology*. Vol 139: extracellular matrix protocols (pp. 11–26). Totowa, NJ: Humana Press.
- Stensvåg K., Haug, T., Sperstad, S.V., Rekdal, O., Indrevoll, B. ve Styrvold, O.B. 2008. Arasin 1, a proline arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Development and Comparative Immunology*. 32: 275-285, 2008.
- Soltani M. ve Baharara, J. 2014. Antioxidant and antiproliferative capacity of dichloromethane extract of *Holothuria leucospilota* sea cucumber. *IJCMB*. 2014:1–9.
- Suarez-Jimenez G.M., Sanches, R.M.R., Plascencia, G.Y., Hernandez, A.B. ve Brauer, J.M.E. 2015. In vitro antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities of collagen hydrolysates of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) byproducts. *Food Science and Technology (Campinas)*. 35:3.
- Sugano M., Ishiwaki, N. ve Nakashima, K. 1984. Dietary protein-dependent modification of serum cholesterol level in rats: Significance of the arginine/lysine ratio. *Ann Nutr Metab*. 28 3: 192–199.
- Sun L.P., Du, Y.M., Shi, X.W., Chen, X., Yang, J.H. ve Xu, Y.M. 2006. A new approach to chemically modified carboxymethyl chitosan and study of its moisture-absorption and moisture-retention abilities. *Journal of Applied Polymer Science*. 102:1303-1309.

- Sun H.H., Mao, W.J., Chen, Y. Guo, S.D., Li, H.Y., Qi, X.H., Chen, Y.L ve Xu. J. 2009. Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. *Carbohydrate Polymers*. 78:117-124
- Sze P.C. 2004. Fisheries, trade and utilization of sea cucumbers in Malaysia in: Lovetelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.F. ve Mercier A. Eds, *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. FAO Fisheries Technical Paper 463. Rome.
- Tavano O.L. 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 90: 1-11.
- Te Nijenhuis K. 1997. Thermoreversible networks: viscoelastic properties and structure of gels *Advances Polymer Science*. 130: pp. 1–267.
- Thanonkaew A., Benjakul S. ve Visesanguan W. 2006. Chemical composition and thermal property of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 127-133.
- Thiansilakul Y., Benjakul, S. ve Shahidi, F. 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*. 103:1385–1394.
- Türk Gıda Kodeksi, 2002. Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkında Tebliğ. Tebliğ no: 2002/63. Resmi gazete no: 24885.
- Torano J.S., Verbon, A. ve Guchelaar H.J. 1999. Quantitative determination of thalidomide in human serum with high-performance liquid chromatography using protein precipitation with trichloroacetic acid and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 734: 203-210.
- Tortonese E. ve Vadon, C., 1987. Oursins et Holothuries. In: *Fisches FAO D'identification des especes pour les besoins de la peche-Mediterranee et Mer Noire*. W. Fischer, M.L Bouchon, Scneider, M. (Eds). FAO Publ., Rome. P.743-760.
- Trotter J. A., Thurmond, F. A. ve Koob, T. J. 1994. Molecular structure and functional morphology of echinoderm collagen fibrils. *Cell Tissue Res*. 275, 451–458.

- Turgeon S.L., Gauthier, S. F., ve Paquin, P. 1991. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two step ultrafiltration process, *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 39: 637.
- Vajragupta O., Boonchoong, P. ve Berliner, L.J. 2004. Manganese complexes of curcumin analogues: evaluation of hydroxyl radical scavenging ability, superoxide dismutase activity and stability towards hydrolysis. *Free Radic Res*. 38:303–14.
- van Laack R.L.J M., Kauffman R.G., Sybesma W., Smulders F. J. M., Eikelenboom G. ve Pinheiro J C. 1994. Is colour brightness (L-value) a reliable indicator of water-holding capacity in porcine muscle? *Meat Science*. 38, 193201.
- Vega J.A.P., Castillo L.O., Ruiz J.A.G. ve Ledesma B.H. 2013. Release of multifunctional peptides by gastrointestinal digestion of sea cucumber (*Isostichopus badionotus*). *Journal of Functional Foods*.5: 869-877.
- Venugopal V., Chawla, S. P., ve Nair P.M. 1996. Spray dried protein powder from threadfin beam: preparation, properties and comparison with FPC typeB, *J. Muscle Foods*, 7, 55.
- Wen J., Hu C. ve Fan S. 2010. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90: 2469-74.
- Wen J., Hu, C. ve Fan S. 2010. Chemical composition and nutritional quality of seacucumbers. *J. Sci. Food Agric*. 90: 2469–2474.
- Wen J. ve Hu C. 2010. Elemental composition of commercial sea cucumbers (holothurians). *Food Additives and Contaminants Part B. Surveillance*. 3:246-252.
- Villasin J. ve Pomory C.M. 2000. Antibacterial activity of extracts from the body wall of *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea). *Fish & Shellfish Immunology*.10: 465-467.
- Wilde P.J. ve Clark D.C. 1996. Foam formation and stability. In: *Methods of testing protein functionality* (pp. 110–152). London: Blackie Academic.
- Wu G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*.37:1-17.
- Wu H.T., Jin W.G., Sun S.G., Li X.S., Duan X.H., Li, Y., Yang Y.T., Han J.R. ve Zhu B.W. 2016. Identification of antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop

(*Patinopecten yessoensis*) female gonads

- Wu H.T., Li D.M., Zhu B.W., Sun J.J., Zheng J., Wang F.L., Konno K. ve Jiang X. 2013. Proteolysis of noncollagenous proteins in sea cucumber, *Stichopus japonicus*, body wall: Characterisation and the effects of cysteine protease inhibitors. *Food Chemistry*, 141:1287-1294.
- 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.
- Xiong Y.L. 2005. Role of myofibrillar proteins in water-binding in brine-enhanced meats. *Food Research International*. 38: 281-287.
- Xing J., Leung M.F. ve Chia F.S. 1998. Quantitative analysis of phagocytosis by amebocytes of a sea cucumber, *H. leucospilota*. *Invertebrate biology*. 117:67-74.
- Xing K., Yang H.S. ve Chen M.Y. 2008. Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicas*. *Inter-Research Aquatic Biology*.2:85-92.
- Yahyavi M., Afkhami M., Javadi A., Ehsanpour M., Khazaali, A., Khoshnood, R. ve Mokhlesi, A. 2012. Fatty acid composition in two sea cucumber species, *Holothuria scabra* and *Holothuria leucospilata* from Qeshm Island (Persian Gulf). *African Journal of Biotechnology*. 11: 2862-2868
- Yan M. Tao, H. ve Qin S. 2016. Effect of Enzyme Type on the Antioxidant Activities and Functional Properties of Enzymatic Hydrolysates from Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*) Viscera. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 25:940-952.
- Yaging C., Changqing Y. ve Songxin Y. 2004. Pond culture of sea cucumbers, *Apostichopus japonicus* in Dalian. Section III – Aquaculture Advantages in Lovatelli, A. (comp./ed.); Conand, C.; Purcell, S.; Uthicke, S.; Hamel, J.-F.; Mercier, A. (eds.) *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 463. Rome, FAO. 2004. 425p.
- You H.J., Oh D.H., Choi C.Y., Lee D.G., Hahm K.S., Moon A.R. ve Jeong H.G. 2002. Protective effect of metallothionein-III on DNA damage in response to reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1573: 33–38. Yang, C.S. Landau, J.M. Huang, M.T. ve Newmark H.L. 2001. Inhibition of carcinogenesis by dietary

- polyphenolic compounds Annual Reviews in Nutrition. 21: 381–406
- Zayas J. 1997. Functionality of Proteins in Food. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.p.373.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature. 415: 389 - 395.
- Zeng M., Cui W., Zhao Y., Liu Z., Dong S. ve Guo Y. 2008. Antiviral active peptide from oyster. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 26: 307–312.
- Zhang X., Liu Y., Li Y. ve Zhao X. 2017. Identification of the geographical origins of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in northern China by using stable isotope ratios and fatty acid profiles. Food Chemistry. 218: 269-276.
- Zhang Y, Song S, Song D, Liang H, Wang W, Ji A. 2010. Proliferative effects on neural stem/progenitor cells of a sulfated polysaccharide purified from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. J. Biosci. Bioeng.109:67–72
- Zheng J., Wu, H.T., Zhu, B.W., Dong, X.P., Zhang, M.M ve Li, Y.L 2012. Identification of antioxidative oligopeptides derived from autolysis hydrolysates of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) guts.234:895-904.
- Zhong Y., Khan, M.A. ve Shahidi, F. 2007. Compositional Characteristics and Antioxidant Properties of Fresh and Processed Sea Cucumber (*Cucumaria frondosa*). Journal of the Agricultural and Food Chemistry, 55(4): 1188-1192
- Zhou X., Wang C. ve Jiang A. 2012. Antioxidant peptides isolates from sea cucumber *Stichopus Japonicus*. European Food Research Technology.234: 441-447
- Zhu B.W., Dong X.P., Zhou D.Y., Gao Y., Yang J.F., Li D.M., Zhao X.K., Ren T.T., Ye W.X., Tan H., Wu H.T. ve Yu C. 2012. Physicochemical properties and radical scavenging capacities of pepsin-solubilized collagen from sea cucumber *Stichopus japonicus*. Food Hydrocolloids. 28:182-188.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: İbrahim Ender KÜNİLİ

Doğum Yeri: BALIKESİR

Doğum Tarihi: 11.04.1984

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi (2007).

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Anabilim Dalı (2010).

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar – SCI - Diğer

- 1- Çolakoğlu F., Çardak M., Çolakoğlu S. , Künili İ.E., "Depuration Times Of Donax Trunculus And Tapes Decussatus. ", Brazilian Journal of Microbiology., vol.45, pp.1017-1022, 2014
- 2- Çolakoğlu F., Ormanci H.B., Berik N., Künili İ.E., Çolakoğlu S. , "Proximate And Elemental Composition Of Chamelea Gallina From The Southern Coast Of The Marmara Sea (Turkey)", Biological Trace Element Research, pp.983-991, 2011
- 3- Çolakoğlu F., Ormanci H.B., Künili İ.E., Çolakoğlu S. , "Chemical And Microbiological Quality Of The Chamelea Gallina From The Southern Coast Of The Marmara Sea In Turkey", Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, pp.0-0, 2010
- 4- Çolakoğlu F., Künili İ.E., "Su Ürünleri Atıkları ve Değerlendirme Olanakları", Dünya Gıda, ss.58-64, 2016
- 5- Künili İ.E., Çolakoğlu F., "Deniz Diplerinin Değerli Kaynağı: Deniz Hıyarı", Dünya Gıda Dergisi, cilt.45, ss.45-49, 2015
- 6- Çolakoğlu F., Künili İ.E., Ormanci H.B., "Balık Sosu", Dünya Gıda Dergisi, ss.82-87, 2012

- 7- Künili İ.E.,  olakoğlu F., "Türkiye Marmara Bölgesi'nde Tüketime Sunulan İşlenmiş Su  r nlerinin Mikrobiyolojik Kaliteleri.", Hasad Gıda, ss.22-25, 2011
- 8-  olakoğlu F., Ormanci H.B.,  akir F., Künili İ.E., "Tuzlanmış Sardalya (Sardina Pilchardus) Balığından Ezme  retimi  zerine Bir Araştırma.", Dünya Gıda Dergisi, ss.46-51, 2010
- 9-  olakoğlu F., Künili İ.E., "İ  Sularımızda  nemli Artış Gösteren Gümüş Balığı (Atherina Boyeri)  retiminin Türkiye Ekonomisi Açısından Değerlendirilmesi", Tarım Türk Dergisi, ss.110-113, 2009

b) Bildiriler – Uluslararası - Ulusal

- 1- K nili İ.E.,  olakoğlu F., "Nutritional Properties of *Holothuria tubulosa* from Çanakkale (Turkey)", Scientific Conference With International Participation "Food Science, Engineering And Technology' 2016", Plovdiv, Bulgaristan, 20-21 Ekim 2016, pp.24-24
- 2- K nili İ.E.,  olakoğlu F., Ormanci H.B., "Nutritional Changes of Minimally Processed Wedge Clam (*Donax turunculus*)", Scientific Conference With International Participation "Food Science, Engineering And Technology' 2016", Plovdiv, Bulgaristan, 20-21 Ekim 2016, pp.23-23
- 3- Ko  S. ,  olakoğlu F., K nili İ.E., "Mineral Composition of *Engraulis encrasicolus*", 41st CIESM Congress, Kiel, Germany,12-16 September 2016, Kiel, ALMANYA, 12-16 Eyl l 2016, pp.73-73.
- 4- K nili İ.E.,  olakoğlu F., Ormanci H.B., "Elemental Composition of Body Party of Sea Cucumber", 41st CIESM Congress, Kiel, Germany,12-16 September 2016, Kiel, ALMANYA, 12-16 Eyl l 2016, pp.65-65.
- 5- Ormanci H.B.,  olakoğlu F., K nili İ.E., "The effects of garlic extract on the product quality of lakerda", Scientific Conference With International Participation "Food Science, Engineerig And Technology' 2016, Plovdiv, Bulgaristan, 20-21 Ekim 2016, pp.7-7
- 6- Gencer C., Künili İ.E., Ormanci H.B.,  olakoğlu F., "Tuzlanmış sardalya balığından üretilen ezme ürünün besin kalitesi", 18. Su  r nleri Sempozyumu, İZMİR, TÜRKİYE, 1-4 Eylül 2015, ss.463-463.
- 7- Künili İ.E., Ormanci H.B.,   ryan N., G n leri D.,  olakoğlu F., "Sarımsak Ekstraktının Biyojen Amin Oluşturan Bakteriler  zerine Antimiktobiyal Etkisinin Belirlenmesi", 17. Su  r nleri Sempozyumu, İSTANBUL, TÜRKİYE, 3-6 Eylül

2013, ss.196-197.

- 8- Künili İ.E., Ormanci H.B.,  olakoğlu F., "Akivades (Tapes decussatus) ve Kidonya (Venus verrucosa)  ift Kabuklu Yumuşakça Türlerinin Depurasyon S relerinin Belirlenmesi", 17. Su  r nleri Sempozyumu, İSTANBUL, TÜRKİYE, 3-6 Eylül 2013, ss.196-196.
- 9- Künili İ.E.,  olakoğlu F., "Prevalence And Antibiotic Susceptibility Of Listeria Spp. Isolated From Processed Seafood.", Turkey-Japan Marine Forum. Harmonization of Biodiversity and Marine Industries, TÜRKİYE, 7-8 November 2012.
- 10- Ormanci H.B.,  olakoğlu F., K nili İ.E., "Perspective Of Salted Seafoods.", Turkey-Japan Marine Forum. Harmonization of Biodiversity and Marine Industries, TÜRKİYE, 7-8 November 2012.
- 11-  ardak M., K nili İ.E.,  olakoğlu F., Ormanci H.B., "Kekik Ekstraktının Taze Levrek Balığının Raf  mr   zerine Etkilerinin Araştırılması.", 16. Ulusal Su  r nleri Sempozyumu, ANTALYA, TÜRKİYE, 25-27 Ekim 2011.
- 12- Künili İ.E.,  olakoğlu F., "Tüketime Sunulan Dondurulmuş Su  r nlerinin Mikrobiyolojik Kaliteleri.", 16. Ulusal Su  r nleri Sempozyumu, ANTALYA, TÜRKİYE, 25-27 Ekim 2011.
- 13- Künili İ.E.,  akir F., Ormanci H.B.,  olakoğlu F., "Çanakkale’De Taze Olarak Tüketime Sunulan Bazı Balıkların Mikrobiyolojik Kalitelerinin İncelenmesi.", XIV. Ulusal Su  r nleri Sempozyumu, MUĞLA, TÜRKİYE, 4-7 Eylül 2007

c) Katıldığı Projeler

- 1- Bazı tatlı su balıklarının İskandinav usulü balık tuzlama tekniği (Gravad) ile değerlendirilmesi ve kalite özelliklerinin araştırılması", BAP Diğer, FBA-2015-556, Araştırmacı
- 2- "Deniz Hıyarının (*Holothuria tubulosa*) Besinsel ve Fonksiyonel  zelliklerinin Belirlenmesi", BAP Doktora, FDK-2014-430, Araştırmacı
- 3- "Balık Atıklarından Balık Sosu Eldesi ve Karakteristik  zelliklerinin Belirlenmesi", BAP Diğer, FYL-2014-157, Araştırmacı
- 4- "Deniz Bilimleri Avcılığı ve İşlemeciliği Alt Yapısının Geliştirilmesi ve G clendirilmesi ", BAP Alt Yapı, FAY-2014-282, Araştırmacı, 2015
- 5- "İşlenmiş Su  r nlerinde Bazı Patojen Mikroorganizmaların Araştırılması", BAP Y.Lisans, 2009-44, Araştırmacı, 2010

## **İÇ DENEYİMİ**

ÇalıŐtıĐı Kurumlar ve Yıl : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fakóltesi (2009-halen).

## **İLETİŐİM**

E-posta Adresi : [enderkunili@yahoo.com](mailto:enderkunili@yahoo.com), [enderkunili@comu.edu.tr](mailto:enderkunili@comu.edu.tr)

