



**T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BALIK UNUNDAN PROTEİN HİDROLİZATI ELDESİ, BİYOAKTİF ve
FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

SARA BETÜL ÖZGEN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**HATAY
ŞUBAT - 2024**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BALIK UNUNDAN PROTEİN HİDROLİZATI ELDESİ, BİYOAKTİF ve
FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

SARA BETÜL ÖZGEN
ORCID:0000-0003-0218-7625

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi EMİR AYŞE ÖZER
ORCID: 0000-0001-7776-9625

HATAY
ŞUBAT- 2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BALIK UNUNDAN PROTEİN HİDROLİZATI ELDESİ, BİYOAKTİF ve
FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

SARA BETÜL ÖZGEN

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Emir Ayşe ÖZER danışmanlığında hazırlanan bu tez 02/02/2024 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Emir Ayşe ÖZER
Başkan

Prof. Dr. Şenol İBANOĞLU
Üye

Prof. Dr. Mutlu Buket AKIN
Üye

Doç. Dr. Salih AKSAY
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa DİDİN
Üye

Kod No: 160

Doç. Dr. Cengiz KARACA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 21.D.005

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

02/02/2024

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

İmzası

SARA BETÜL ÖZGEN

ÖZET

BALIK UNUNDAN PROTEİN HİDROLİZATI ELDESİ, BİYOAKTİF ve FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Bu tez çalışmasında, balık işleme endüstrisinin yan ürünü olan balık unundan protein hidrolizatlarının elde edilerek fonksiyonel (emülsifikasyon aktivite ve kapasitesi, köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi, yağ bağlama kapasitesi ve su tutma kapasitesi) ve biyoaktivite (antioksidan kapasite, ACE inhibisyon, α -amilaz inhibisyon ve pankreatik lipaz inhibisyon) özelliklerinin belirlenmesi ve hidrolize proteinin biyoaktif ve fonksiyonel özelliklerinin optimizasyonu amaçlanmıştır. Protein hidrolizatı elde etmek için tepki yüzey yöntemi kullanılarak 13 deneme kurulmuştur. Deneme planındaki bağımsız değişkenler E/S oranı (%1-3) ve hidroliz süresi (60-180 dk) olarak seçilmiştir. Hidrolizatların hidroliz derecesi, çözünür protein miktarı, protein miktarı sırasıyla 11.7 ± 0.2 - 16.8 ± 0.5 , 24.7 ± 1.6 - 28.5 ± 0.6 , 80.5 ± 0.4 - 86.7 ± 0.6 aralıklarında bulunmuştur. E/S oranı ve hidroliz süresi arttıkça bu özellikler de artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Hidrolizatların biyoaktif özelliklerinden ACE, α -amilaz ve pankreatik lipaz inhibisyon değerleri sırasıyla 23.7 ± 1.2 - 66.7 ± 1.2 , 23.5 ± 1.6 - 36.3 ± 0.4 , 13.2 ± 0.67 - 26.6 ± 0.94 aralıklarında bulunmuştur. İncelenen antioksidan özelliklerinden DPPH radikalı temizleme aktivite ve FRAP kapasite değerleri sırasıyla 22.4 ± 0.78 - 72.8 ± 0.3 ve 0.32 ± 0.01 - 1.06 ± 0.06 $\mu\text{M TE/mg}$ hidrolizat olarak belirlenmiştir. E/S oranı ve hidroliz süresinin artmasıyla biyoaktif özellikler de artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Hidrolizatların fonksiyonel özellikleri incelendiğinde EAI, ESI, köpük oluşturma kapasite ve stabilite değerleri, yağ bağlama ve su tutma kapasiteleri sırası ile 18.2 ± 0.7 - 37.9 ± 0.71 m^2/g , 31 ± 1.0 - 93 ± 1.0 dk, 36.0 ± 3.3 - 104.7 ± 4.1 , 19.3 ± 2.5 - 73.4 ± 2.5 , 4.16 ± 0.06 - 4.79 ± 0.16 g yağ/ g hidrolizat ve 2.17 ± 0.01 - 2.68 ± 0.07 g su/g hidrolizat aralıklarında bulunmuştur. E/S oranı ve hidroliz süresinin artmasıyla fonksiyonel özellikler azalmış ve bu azalışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Biyoaktif özelliklerin optimizasyonu sonucunda %90 değerinde kabul edilen hidrolize proteinin bağımsız değişkenlerinin aralıkları E/S %3 ve süre 180 dk olarak ve biyoaktif özellikleri; hidroliz derecesi %16, suda çözünür protein %28.08, ACE inhibisyon aktivitesi %57.31, DPPH temizleme aktivitesi %76.53, FRAP kapasitesi 0.91 $\mu\text{M TE/mg}$, pankreatik lipaz inhibisyonu %24.48, α -amilaz inhibisyon aktivitesi ise %32 olarak belirlenmiştir. Fonksiyonel özelliklerin optimizasyonunda %78 değerinde kabul edilen hidrolize proteinin bağımsız değişkenlerinin aralıkları E/S %1 ve süre 60 dk olarak ve fonksiyonel özellikleri; hidroliz derecesi %11.67, emülsiyon aktivitesi 36.51 m^2/g , emülsiyon stabilitesi 90.02 dk, köpük oluşturma kapasitesi %102.74, köpük oluşturma stabilitesi %74.75, su tutma kapasitesi 2.38 g su/g hidrolizat, yağ bağlama kapasitesi 4.37 g yağ/g hidrolizat olarak belirlenmiştir.

Elde edilen protein hidrolizatlarının potansiyel bir antioksidatif, ACE inhibitör, antidiyabetik ve antiobezidik peptit kaynağı olarak biyoaktif özelliği arttırılmış fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde ve protein hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri nedeniyle gıda sanayiinde gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceği belirlenmiştir.

2024, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Balık unu, protein hidrolizasyonu, biyoaktif özellikler, fonksiyonel özellik, optimizasyon.

ABSTRACT

PRODUCTION of PROTEIN HYDROLYSATE from FISH FLOUR, DETERMINATION of ITS BIOACTIVE and FUNCTIONAL PROPERTIES

In this thesis study, the aim was to obtain protein hydrolysates from fish flour, a by-product of the fish processing industry, and determine their functional (emulsification activity and capacity, foam formation capacity and stability, fat binding capacity, and water holding capacity) and bioactive (antioxidant capacity, ACE inhibition, α -amylase inhibition, and pancreatic lipase inhibition) properties, as well as to optimize the bioactive and functional properties of the hydrolyzed protein. Thirteen experiments were set up using the RSM to obtain the protein hydrolysate. The independent variables in the experimental design were selected as the E/S ratio (1-3%) and hydrolysis time (60-180 min). The degree of hydrolysis of the hydrolysates, soluble protein content, and protein content ranged from 11.7 ± 0.2 to $16.8\pm0.5\%$, 24.7 ± 1.6 to $28.5\pm0.6\%$, and 80.5 ± 0.40 to $86.7\pm0.6\%$, respectively. The bioactive properties of the hydrolysates, including ACE, α -amylase, and pancreatic lipase inhibition values, ranged from 23.7 ± 1.2 to $66.7\pm1.2\%$, 23.5 ± 1.6 to $36.3\pm0.4\%$, and 13.2 ± 0.67 to $26.6\pm0.94\%$, respectively. The DPPH radical scavenging activity and FRAP capacity values, as examined antioxidant properties, were determined to be in the range of 22.4 ± 0.78 to 72.8 ± 0.3 and 0.32 ± 0.01 to 1.06 ± 0.06 $\mu\text{M TE/mg hydrolysate}$, respectively. When the functional properties of the hydrolysates were examined, the values of EAI, ESI, foam formation capacity and stability, fat binding, and water holding capacities ranged from 18.2 ± 0.7 to 37.9 ± 0.71 m^2/g , 31 ± 1.0 to 93 ± 1.0 min, 36.0 ± 3.3 to $104.7\pm4.1\%$, 19.3 ± 2.5 to $73.4\pm2.5\%$, 4.16 ± 0.06 to 4.79 ± 0.16 g fat/g hydrolysate, and 2.17 ± 0.01 to 2.68 ± 0.07 g water/g hydrolysate, respectively. As the E/S ratio and hydrolysis time increased, the functional properties decreased, and these decreases were statistically significant. Through the optimization of the bioactive properties, the ranges of the independent variables of the hydrolyzed protein, accepted at 90%, were determined as E/S 3% and time 180 min, with bioactive properties; degree of hydrolysis 16%, soluble protein in water 28.08%, ACE inhibition activity 57.31%, DPPH scavenging activity 76.53%, FRAP capacity 0.91 $\mu\text{M TE/mg}$, pancreatic lipase inhibition 24.48%, and α -amylase inhibition activity 32%. For the optimization of the functional properties, the ranges of the independent variables of the hydrolyzed protein, accepted at 78%, were determined as E/S 1% and time 60 min, with functional properties; degree of hydrolysis 11.67%, emulsion activity 36.51 m^2/g , emulsion stability 90.02 min, foam formation capacity 102.74%, foam formation stability 74.75%, water holding capacity 2.38 g water/g hydrolysate, and fat binding capacity 4.37 g fat/g hydrolysate.

It was determined that the obtained protein hydrolysates could be used as potential sources of antioxidative, ACE inhibitory, antidiabetic, and antiobesity peptides to develop functional foods with enhanced bioactive properties, and due to their functional properties, they could be used in the food industry as food additives.

2024, 102 pages

Key Words: Fish flour, protein hydrolysis, bioactive properties, functional features, optimization.

TEŞEKKÜR

Çalışmamda bana yol gösteren, destek ve emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübeleri ile çalışmalarına ışık tutan danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Emir Ayşe ÖZER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitemde olan, değerli bilgi ve önerileri ile yol gösteren hocalarım Prof. Dr. Şenol İBANOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi Mustafa DİDİN'e, tezimin değerlendirilmesine katkı sağlayan sayın hocalarım Prof. Dr. Mutlu Buket AKIN ve Doç. Dr. Salih AKSAY'a çok teşekkür ederim.

Bu teze maddi olarak destek veren Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı'na (Proje No: 21.D.005) teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan sevgili dostlarım Öğr. Gör. Dr. Merve OLUKMAN ŞAHİN'e, Dr. Öğr. Üyesi Cenk Burak ŞAHİN'e ve Öğr. Gör. Dr. Muhammet DEMİREL'e sonsuz teşekkür ederim.

Depremde kaybettiğim ve hayatımda çok önemli yerleri olan kıymetli dostlarım Öğr. Gör. Dr. Celile DEMİRBİLEK BUCAK ve Öğr. Gör. Serbay BUCAK'a destek ve motivasyonları için teşekkür ederim. Sızsiz her zaman eksik olacağız.

Tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne, Teknoloji ve Ar-Ge UAM (MARGEM)'ne, Bitki Sağlığı Kliniği UAM'ne, Öğr. Gör. Dr. Aysun UYSAL'a ve HMKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olan sevgili aileme, dostlarıma, tüm sıkıntılarımdan yükünü çeken, beni her koşulda destekleyen, motive eden ve hoşgörüsünü esirgemeyen sevgili eşim Teoman ÖZGEN'e, varlığı ile her günümü aydınlatan canım oğlum Emin Aras ÖZGEN'e sonsuz teşekkür ederim.

Depremde kaybettiğim bütün sevdiklerime...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Deney Tasarımı.....	20
3.2.2. Balık Ununun Fizikokimyasal Analizleri	20
3.2.2.1. Nem Tayini.....	20
3.2.2.2. Kül Tayini	21
3.2.2.3. Protein Tayini.....	22
3.2.2.4. Yağ Tayini.....	22
3.2.2.5. Karbonhidrat Değeri Hesaplaması	23
3.2.2.6. Enerji Değeri Hesaplaması.....	23
3.2.2.7. Element Analizi.....	23
3.2.2.8. Mikotoksin Analizleri	24
3.2.3. Balık Unundan Enzimatik Hidroliz ile Protein Hidrolizatı Eldesi	27
3.2.4. Hidroliz Derecesi Tayini	29
3.2.5. Çözünür Protein Tayin	30
3.2.6. Balık Unu Proteini ve Hidrolizatlarının Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi .	32
3.2.6.1. ACE İnhibisyon Aktivitesi (Antihipertansif Etki) Tayini.....	32
3.2.6.2. Antioksidan Aktivitesi Tayini	32
3.2.6.2.1. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Radikalı Temizleme	
Aktivitesi Tayini	33
3.2.6.2.2. Ferrik İyon İndirgeme (FRAP) Yöntemi ile Antioksidan	
Aktivite Tayini.....	33
3.2.6.3. α -Amilaz İnhibisyon Aktivitesi (Antidiyabetik Etki) Tayini	35
3.2.6.4. Pankreatik Lipaz İnhibisyon Aktivitesi (Antiobezidik Etki) Tayini	36
3.2.7. Balık Unu Proteini ve Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özelliklerinin	
Belirlenmesi	36
3.2.7.1. Emülsifikasyon Aktivitesi ve Emülsiyon Stabilitesi Tayini	36
3.2.7.2. Köpük Oluşturma Kapasitesi ve Stabilitesi Tayini	37
3.2.7.3. Yağ Bağlama Kapasitesi Tayini.....	38
3.2.7.4. Su Tutma Kapasitesi Tayini	38
3.2.8. Balık Unu Hidrolizatlarının Biyoaktif ve Fonksiyonel Özelliklerinin	
Optimizasyonu	39
3.2.9. İstatistiksel Analiz	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	40
4.1. Balık Ununun Besin Bileşimi	40

4.1.1. Balık Ununun Besin Öğeleri ve Enerji Değeri	40
4.1.2. Balık Ununun Element İçeriği	41
4.2. Balık Ununun Toksin İçeriği	42
4.3. Balık Unu Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Derecesi	43
4.4. Balık Unu Protein Hidrolizatlarının Çözünür Protein Miktarı	45
4.5. Balık Unu Protein Hidrolizatının Protein Miktarı	48
4.6. Balık Unu Proteinini ve Hidrolizatlarının Biyoaktif Özellikleri	51
4.6.1. ACE İnhibisyon Aktivitesi (Antihipertansif Özellik).....	51
4.6.2. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Radikali Temizleme Aktivitesi.....	53
4.6.3. Ferrik İyon İndirgeme (FRAP) Kapasitesi	57
4.6.4. α -Amilaz İnhibisyonu Aktivitesi (Antidiyabetik Özellik).....	59
4.6.5. Pankreatik Lipaz İnhibisyon Aktivitesi (Antiobezidik Özellik).....	62
4.7. Balık Unu Protein Hidrolizatlarının Biyoaktif Özelliklerinin Optimizasyonu	64
4.8. Fonksiyonel Özellikler.....	66
4.8.1. Emülsifikasyon Aktivitesi ve Emülsiyon Stabilitesi	66
4.8.2. Köpük Oluşturma Kapasitesi ve Stabilitesi	69
4.8.3. Yağ Bağlama Kapasitesi.....	72
4.8.4. Su Tutma Kapasitesi	73
4.9. Balık Unu Protein Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özelliklerinin Optimizasyonu	75
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Balık ununun elzem amino asit bileşimi.....	9
Çizelge 3.1. Balık Unundan Enzimatik Hidrolizin Deneysel Tasarımı	21
Çizelge 3.2. Balık Ununda Aranılan Elementler ve Cihaz Şartları	24
Çizelge 4.1. Balık ununun besin bileşimi.....	41
Çizelge 4.2. Balık ununun element içeriği (ppm)	42
Çizelge 4.3 Balık ununun toksin içeriği	43
Çizelge 4.4. Balık unu protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi (%) değerleri	44
Çizelge 4.5. Hidroliz derecesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu.....	44
Çizelge 4.6. Balık unu protein hidrolizatlarının çözünür protein değerleri	46
Çizelge 4.7. Çözünür protein miktarı üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu	47
Çizelge 4.8. Balık unu protein hidrolizatlarının protein miktarları.....	49
Çizelge 4.9. Protein miktarı üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu.....	50
Çizelge 4.10. Balık unu protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon aktivite değerleri.....	52
Çizelge 4.11. ACE inhibisyonunun üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu	52
Çizelge 4.12. Balık unu protein hidrolizatlarının DPPH radikali temizleme aktivite değerleri.....	55
Çizelge 4.13. DPPH radikali temizleme aktivitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu	56
Çizelge 4.14. Balık unu protein hidrolizatlarının FRAP değerleri.....	58
Çizelge 4.15. FRAP kapasitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu.....	59
Çizelge 4.16. Balık unu protein hidrolizatlarının α -amilaz inhibisyonu aktivitesi değerleri.....	60
Çizelge 4.17. α -amilaz inhibisyonu üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu	61
Çizelge 4.18. Balık unu protein hidrolizatlarının pankreatik lipaz inhibisyon aktivitesi	63
Çizelge 4.19. Pankreatik lipaz inhibisyonu üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu	64
Çizelge 4.20. Balık unu hidrolizatlarının biyoaktif özelliklerinin optimizasyonunda kullanılan değerler ve optimizasyon sonucunda elde edilen değerler.....	65
Çizelge 4.21. Balık unu protein hidrolizatlarının EAI ve ESI değerleri	67
Çizelge 4.22. EAI üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu	68
Çizelge 4.23. ESI üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu	68
Çizelge 4.24. Balık unu protein hidrolizatlarının köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi değerleri	70
Çizelge 4.25. Köpük oluşturma kapasitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu	71
Çizelge 4.26. Köpük stabilitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu.....	71
Çizelge 4.27. Balık unu protein hidrolizatlarının yağ bağlama kapasitesi değerleri	73

Çizelge 4.28. Balık unu protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesi değerleri	74
Çizelge 4.29. Balık unu protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin optimizasyonunda kullanılan değerler ve optimizasyon sonucunda elde edilen değerler	76



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Amino asitler ile o-fitalaldehit (OPA) arasındaki reaksiyon	5
Şekil 2.2. ACE inhibitörlerinin etki mekanizması	13
Şekil 2.3. Balık protein hidrolizatı üretim şeması.....	15
Şekil 3.1. Mikrodalga Fırın ve ICP-MS	24
Şekil 3.2. Aflatoksin Analizinde kullanılan PBS tampon ve IAK	25
Şekil 3.3. Toplam aflatoksin kalibrasyon grafiği	25
Şekil 3.4. Toksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC sistemi.....	26
Şekil 3.5. Okratoksin A kalibrasyon grafiği.....	27
Şekil 3.6. Enzimatik hidrolizin akış şeması	28
Şekil 3.7. Enzimatik hidroliz.....	29
Şekil 3.8. Hidroliz derecesinin ölçümü için kullanılan UV-Vis Spektrofotometre ve kimyasal malzemeler	30
Şekil 3.9. BSA'nın kalibrasyon grafiği	31
Şekil 3.10. DPPH radikalının indirgenmesi	33
Şekil 3.11. Fe ⁺³ iyonunun Fe ⁺² 'ye indirgenmesi.....	34
Şekil 3.12. Trolox kalibrasyon eğrisi	35
Şekil 4.1. Hidroliz derecesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik	45
Şekil 4.2. Çözünür protein miktarı üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik.....	48
Şekil 4.3. Protein miktarı üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik	50
Şekil 4.4. ACE inhibisyonunun üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik	53
Şekil 4.5. DPPH radikalı temizleme aktivite üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik.....	57
Şekil 4.6. FRAP aktivite üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik	59
Şekil 4.7. α-amilaz inhibisyon aktivitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik.....	62
Şekil 4.8. Pankreatik lipaz inhibisyonu üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik.....	64
Şekil 4.9. Balık unu protein hidrolizatlarının biyoaktif özelliklerinin optimizasyonunun kabul edilebilirlik grafiği.....	66
Şekil 4.10. EAI ve ESI üzerine E/S oranının ve hidroliz süresinin etkisini gösteren 3 boyutlu grafik	69
Şekil 4.11. Köpük oluşturma kapasitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik.....	72
Şekil 4.12. Balık unu protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin optimizasyonunun kabul edilebilirlik grafiği	76

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

%	: Yüzde Değer
°C	: Derece Celsius
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: mikrometre
a	: Ağırlık
AU	: Anson ünitesi
dk	: Dakika
g	: Gram
kcal	: Kilokalori
kg	: Kilogram
L	: Litre
M	: Molarite
m ²	: Metrekare
meq	: Miliekivalent ağırlık
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
ppb	: Part per billion (milyar birimde bir birim)
ppm	: Part per million (milyon birimde bir birim)
rpm	: Rotation per minute (dakikadaki dönme sayısı)
sa	: Saat
sn	: Saniye
TE	: Trolox eşdeğeri
v	: Hacim

KISALTMALAR

AAS	: Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AF	: Alev Spektrometresi
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists
BSA	: Bovine Serum Albumin
C ₂ H ₂	: Asetilen
Ca	: Kalsiyum
Cd	: Kadmiyum
Cu	: Bakır
DH	: Hidroliz Derecesi
DNS	: Di-nitrosalisilik asit
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
DTT	: Dithiothreitol
EAI	: Emülsiyon Aktivite İndeksi

ESI	: Emülsiyon Stabilite İndeksi
Fe	: Demir
FRAP	: Demir İyonu İndirgeme Gücü
HCl	: Hidroklorik Asit
HHL	: Hippuryl-histidyl-leucine
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IAK	: İmmünoaffinite kolon
IC ₅₀	: Yarı Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ICP-MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi
KBr	: Potasyum Bromür
Mg	: Magnezyum
Mn	: Mangan
Na	: Sodyum
NaOH	: Sodyum Hidroksit
OPA	: Orto-phthalaldehide
P	: Fosfor
PBS	: Fosfat Buffer Saline
RSM	: Tepki Yüzey Yöntemi
SDS	: Sodyum Dodesil Fosfat
TBTZ	: 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin
TCA	: Trikloroasetik Asit
TGK	: Türk Gıda Kodeksi
TNBS	: Trinitrobenzen Sülfonik Asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Zn	: Çinko

1. GİRİŞ

Protein hidrolizatları, hidroliz yoluyla serbest amino asitlerin ve küçük peptitlerin üretilmesinden kaynaklanan gelişmiş işlevsellikleri ve yüksek besin değerleri nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmektedir (Benjakul ve ark., 2014). Dengeli amino asit bileşimi ve gastrointestinal sistemde yüksek emilimleri nedeniyle insan beslenmesi için üstün bir protein kaynağıdır (Cunha ve Pintado, 2022). Protein hidrolizatlarının; gıda sanayinde; fonksiyonel özelliği arttırılmış içeceklerde, özellikle protein miktar ve kalitesi arttırılmış ürünlerde, özel durumlarda kullanılan beslenme ürünlerinde (gebe ve emzikli, işçi, sporcu ve yaşlı) ve diyetetik amaçlı gıdalarda (kilo kontrolü ve diyabet) gıda katkı maddesi olarak kullanımı mümkündür. Ayrıca proteinlerin hidroliziyle biyoaktif peptitler oluşmakta ve antioksidatif, antidiyabetik, antiobezitik, aktivite gibi özellikler gösterebilmektedir. Protein hidrolizatlarının özellikleri, gıda katkı maddesi olarak kullanımını ve fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir (Erol ve ark., 2017).

Deniz kaynaklı protein hidrolizatları ve peptitleri, biyolojik aktiviteleri ve sağlığın korunmasındaki olumlu özellikleri nedeniyle her geçen gün artan bir popülerliğe sahiptir. Sentetik ilaçların olumsuz yan etkilerine dair tüketicilerin artan bilinç düzeyi, doğal maddelerin fonksiyonel gıda olarak tercih edilme isteğini artırmıştır. Deniz kaynaklı protein hidrolizatları, gıdalardaki besin değerlerini artırmak, sosların yapımında lezzeti iyileştirmek ve hayvanların beslenmesinde kullanılmak üzere çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Harnedy ve FitzGerald, 2012).

Hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve demans gibi yaşam tarzıyla ilişkili bozuklukların gelişimini tetiklemektedir. Hipertansiyon dünya çapında 30 ila 79 yaşları arasındaki tahminen 1,28 milyar insanı etkilemektedir ve 2025 yılına kadar 20 yaş üstü 1,06 milyar kişinin hipertansiyona sahip olacağı tahmin edilmektedir (Zhou ve ark., 2021). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2022'de yayınladığı raporda, 17,9 milyon insanın ölüm sebebinin kardiyovasküler hastalıklar olduğunu bildirmiştir (WHO, 2022). Hipertansiyon en sık görülen kronik hastalıktır ve başlıca kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere, kalp krizi, damar sertliği, konjestif kalp yetmezliği, felç, böbrek yetmezliği, körlük gibi çok ciddi hastalıklara sebep olmaktadır (Ahmad ve ark., 2023). Akciğerlerde, kan damarı duvarlarında, beyinde ve böbreklerde bulunan anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE), C terminalindeki peptitleri bir dipeptit birimine parçalayan bir enzim olan dipeptidil-karboksiptidazdır. ACE, anjiyotensin I'i, kan basıncını artıran aktif bir

vazokonstriktör olan anjiyotensin II'ye dönüştürür. Ayrıca ACE, arteriyel gevşeme ve kan basıncını düşürücü etkileri olan bradikinin parçalayıp etkisiz hale getirir, böylece kan basıncını artırır (Zhou ve ark., 2021). Bu sistemde, ACE inhibitörleri bu tepkileri bastırarak vazodilatasyon yoluyla kan basıncını düşürürler. Dolayısıyla, ACE inhibitörlerinin hipertansiyonu engelleyerek kardiyovasküler hastalıkları önlediği bilinmektedir (Kannan ve ark., 2012).

Deniz ürünlerinden elde edilen protein hidrolizatları ve peptitler hiperglisemi tedavi etmek için kullanılabilmektedir (Xia ve ark., 2017). Glikoz alımını uyaran peptitler pankreatik β -hücre homeostazını ve glikozla uyarılan insülin salgısını iyileştirebilmekte, α -amilaz ve α -glukozidaz aktivitelerini inhibe edebilmektedir (Fernando ve ark., 2020). Zhu ve ark. (2010), yaptıkları bir çalışmada, Tip II diyabet teşhisi konan Çinli hastalara üç ay boyunca günlük 13 gram balık kolajen peptit takviyesinin, açlık kan glikozu ve insülin değerlerini, toplam kolesterolü, toplam trigliseritleri, düşük yoğunluklu lipoproteini, serbest yağ asitlerini ve hemoglobin A1c'yi önemli ölçüde düşürdüğünü; Ancak insülin duyarlılığını ve HDL içeriğini arttırdığını belirlemişlerdir.

Kolesistokinin iştah ve açlığı modüle eden önemli bir hormondur. Kolesistokinin içeriği, *in vivo* tokluğu değerlendirmek için biyobelirteç olarak kullanılabilir. Çok sayıda çalışma, deniz peptitlerinin kolesistokinin üretimini modüle edebileceğini göstermiştir (Macedo ve ark., 2021).

Antioksidanlar, doymamış lipitlerden oluşan radikallerin bir hidrojen atomu veya bir elektron bağışlayarak oksidasyonla etkileşmesini engelleyebilir. Antioksidanlar, bu oksidatif reaksiyonların zincir reaksiyonlarını veya başlatıcılarını kontrol edebilir ve radikal ara ürünleri ortamdaki uzaklaştırarak bu reaksiyonları sonlandırabilirler. Ayrıca, tekli oksijen türlerini temizleyerek veya metal katalizatörlerinin etkisiz hale getirilmesi yoluyla zincir kırıcılarını uzaklaştırarak bu reaksiyonları sonlandırabilirler (Najafian ve Babji, 2012). Balık protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteye sahip oldukları yapılmış çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Batista ve ark., 2010; Bougatef ve ark., 2010; Agustin ve ark., 2021; Sarteshnizi ve ark., 2021).

Biyoaktif peptitlerin yapısal özellikleri, amino asit bileşim ve dizilimleri peptidin ACE inhibisyon, antioksidan, antidiyabetik gibi sağlık ile ilişkilendirilen özelliklerini belirlerken aynı zamanda birçok fonksiyonel özelliğini de etkilemektedir. Bu fonksiyonel özelliklere sahip peptitler gıdaya ilave edildiğinde, bu peptitler gıdanın su tutma ve köpük

oluşturma kapasitesini, dokusunu ve emülsifikasyon gibi özelliklerini geliştirmeye yardımcı olabilir (Li ve ark., 2008). Protein kaynağı, protein hidrolizatı üretiminde seçilen ön işlem, enzimatik hidrolizde kullanılan enzim, hidroliz koşulları gibi birçok faktör üretilen protein hidrolizatların ve peptitlerin yapısını değiştirebilmektedir (Karami ve Akbari-Adergani, 2019). Protein hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri su tutma kapasitesi, köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi, emülsiyon oluşturma kapasitesi ve stabilitesi, yağ bağlama kapasitesi gibi kavramlarla ilişkilendirilmektedir (Lin ve ark., 2022).

Balık unu, ölkemizde insan tüketiminde kullanılmayan, balıklardan ya da deniz ürünü işleyen fabrikaların yan ürünü olarak elde edilen besleyici değerı oldukça yüksek bir üründür. Balık unu daha çok su ürünleri yetiştiriciliği olmak üzere, tavukçuluk ve domuz yetiştiriciliğinde yem olarak kullanılmaktadır. Balık unu özellikle amino asit bakımından oldukça zengin bir kaynaktır (Yeşilayer ve ark., 2013). Deniz ürünlerinin protein hidrolizatları ve peptitleri, biyolojik aktiviteleri ve sağlam özellikleri nedeniyle popülerlik kazanmıştır. Fonksiyonel gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde giderek daha fazla araştırılmaktadır.

Literatürde balık atıklarından protein hidrolizatı eldesi ile ilgili birçok çalışma olmakla birlikte balık unuyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, katma değerı oldukça düşük olan balık ununun daha önce çalışılmamış biyoaktif ve fonksiyonel özelliklerinin incelendiği ve optimizasyon çalışmasının yapıldığı özgün bir çalışmadır.

Bu çalışmada, alternatif gıda katkı maddesi olabilecek balık unundan protein hidrolizatının elde edilmesi, fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda;

1. Ticari olarak hayvan yemi üretiminde kullanılan balık ununun insan beslenmesinde kullanılabilmesi için besin içeriği ve toksin bileşimi belirlenmiş,
2. Protein hidrolizasyonu gerçekteştirilmiş ve seçilen bağımsız değişkenlerin, hidrolize proteinlerin biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri üzerine etkisi belirlenmiş,
3. Hidrolize proteinin biyoaktif ve fonksiyonel özelliklerinin optimizasyonu yapılmıştır.

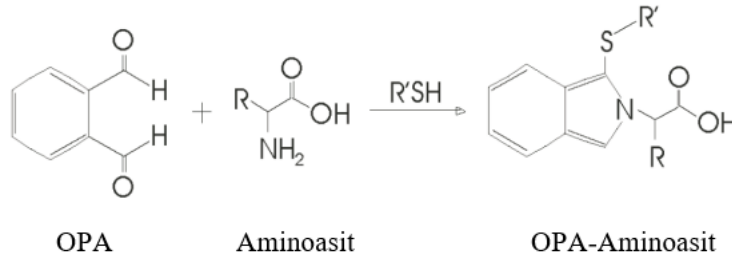
Arařtırma sonucunda katma deęeri dūřuk, besin ięerięi yūksek olan balık unundan katma deęeri yūksek gıda katkı maddesi űretilmiř olacaktır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Adler-Nissen (1986), protein hidrolizatlarının proteinlerin genel olarak enzimlerle ve/veya asitlerle parçalanması sonucunda ortaya çıkan serbest amino asitler ve farklı zincir uzunluklarında peptitlerden oluştuğunu ve protein kaynağının hidroliz derecesi, parçalanma sonucu oluşan peptit bağlarının ve dolayısıyla oluşan peptitlerin boyutunun bir göstergesi olduğunu bildirmiştir.

Nielsen ve ark. (2001), OPA metodunu geliştirerek hidroliz derecesinin ölçümünü gerçekleştirmişlerdir. Bu metotta ortamda bir tiyol grubu varlığında (N-asetil-L-sistein, etilen glikol, dithiothreitol vb) OPA reaktifi amino asitleri türevlendirir (Şekil 2.1). OPA reaktifi tek başına floresans özellik göstermezken, reaksiyon sonucu oluşan OPA-amino asit bileşiği 340 nm’de floresans özellik göstermekte ve bu dalga boyunda OPA-amino asit miktarı tayin edilerek hidroliz derecesi hesaplanabilmektedir.



Şekil 2.1. Amino asitler ile o-fitalaldehit (OPA) arasındaki reaksiyon

Sumaya-Martínez ve ark. (2005), tarafından yürütülen bir çalışmada sazan balığı atıklarından flavourzyme kullanılarak tepki yüzey yöntemi ile optimizasyon çalışması yapılmıştır. Deneme planında sıcaklık, pH, enzim miktarı ve substrat/tampon oranı olarak dört değişken seçilmiştir. Hidroliz sonunda hidrolizatların hidroliz derecesi ölçülmüştür. Sonuçta hidroliz derecesi üzerine tüm değişkenlerin etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Nilsang ve ark. (2005), ton balığı üretiminden arta kalan iç organları farklı proteazlar kullanarak hidroliz etmişlerdir. Elde ettikleri hidrolizatların hidroliz derecesi üzerine E/S oranı ve hidroliz süresinin pozitif yönde lineer etkisinin var olduğunu raporlamışlardır.

Souissi ve ark. (2007), sardalya balığı (*Sardinella aurita*) atıklarından alkalaz enzimi kullanarak farklı hidroliz derecelerinde elde ettikleri hidrolizatların yağ bağlama

kapasitelerini belirlemişlerdir. Araştırmalarının sonucunda hidroliz derecesi ile yağ bağlama kapasitesi arasında istatistiksel olarak bir korelasyon bulunamamıştır. Ayrıca hidroliz edilmemiş balık unu proteinin en düşük yağ bağlama kapasitesi değerine sahip olduğu bildirilmiştir.

Limam ve ark. (2008), tarafından yapılan bir çalışmada karides kafasından tripsin enzimi kullanarak protein hidrolizatları elde edilmiştir. Kontrol örneği olarak enzimatik hidrolize tabi tutulmamış karides kafası proteini kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda hidroliz edilmemiş kontrol örneğinin yağ bağlama kapasitesi, protein hidrolizatlarına göre daha düşük bulunmuştur. Ayrıca karides kafası protein hidrolizatının yağ bağlama kapasitesi 3 g yağ/g hidrolizat olarak bulunmuştur.

Bougatef ve ark. (2008), tarafından yapılan bir çalışmada, sardalya balığı iç organları ve kafasından farklı proteazlar kullanılarak protein hidrolizatları elde edilmiştir. Tüm hidrolizatlar ACE'ye karşı inhibisyon aktivitesi göstermiş olup, iç organlardan elde edilen alkali proteaz ekstresi, ACE üzerinde en yüksek inhibisyon aktivitesine (63.2 ± 1.5) sahip hidrolizatı üretmiştir. Ayrıca, hidroliz dereceleri ve ACE inhibisyon aktiviteleri hidroliz süresinin artmasıyla birlikte artmıştır.

Ovissipour ve ark. (2010), tarafından yürütülen bir çalışmada sarı yüzgeçli ton balığı kafası alkalaz ve protamex enzimleri (% 1.5 a/a) ile 4 sa ve 24 sa hidroliz edilmiştir. Elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri ölçüldüğünde 4 sa sonunda %17 olarak bulunmuştur. Hidroliz derecesinin hidroliz süresi arttıkça arttığı bildirilmiştir.

Cho ve Kim (2011), balık ununun içeriğinde protein, temel amino asitler, mineraller, fosfolipidler ve yağ asitleri bulunduğunu ve elzem amino asitler bakımından da oldukça zengin olduğunu bildirmişlerdir.

Centenaro ve ark. (2011), balık kılçıkları (%15.1 protein) ve tavuk kemiklerini (%18.1 protein) flavourzyme, α -kimotripsin ve tripsin enzimleri ile ayrı ayrı hidroliz etmişlerdir. Elde ettikleri protein hidrolizatlarının hidroliz derecelerini ve antioksidan aktivite özelliklerini incelemişlerdir. Sonuçta hidroliz derecesi kılçık protein hidrolizatı için %6.5-9.7 aralığında, tavuk kemik proteini için ise %5.6-13.1 aralığında bulunmuştur. En düşük hidroliz derecesine sahip hidrolizatların tripsin enziminin kullanıldığı hidrolizatlar olduğu belirtilmişken, en yüksek antioksidan kapasiteye sahip hidrolizatların flavourzyme ile elde edilenler olduğu tespit edilmiştir.

Yang ve ark. (2011), orkinos balığı kafasından protein hidrolizatı elde etmek için alkalaz enzimini kullanmışlardır. Enzimatik hidroliz koşulları, pH 6.5, sıcaklık 54 °C, karıştırma hızı 340 rpm, enzim/substrat oranı ise 1:3 olarak belirlenmiştir. Elde edilen protein hidrolizatının antioksidan ve soya yağında peroksit inhibisyon özellikleri incelenmiş ve hidrolizatın bu özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.

Li ve ark. (2013), farklı balık türlerinin derilerinden elde ettikleri kolajenleri tripsin enzimi ile 3 sa hidroliz etmişlerdir. Daha sonra elde ettikleri kolajen hidrolizatlarını molekül ağırlıklarına göre ayrıştırıp emülsiyon stabiliteelerini araştırmışlardır. Sonuçta peptit uzunluğu ile emülsiyon stabilitesi arasında pozitif bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Liu ve ark. (2013), tarafından yürütülen bir çalışmada sazan balığı eti nötral proteaz, alkali proteaz, papain ve protamex enzimleri ile 14 sa hidroliz edilmiştir. Hidroliz boyunca örnekler alınarak hidrolizatların pankreatik lipaz ve α -amilaz inhibisyon özelliklerini incelemişlerdir. Tepki yüzey yöntemi kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Optimizasyonda bağımsız değişkenler olarak pH, sıcaklık, enzim dozajı, süre seçilmiştir. Araştırmanın sonucunda optimum koşullar alkali proteaz kullanımı, pH 11, sıcaklık 39 °C, enzim dozajı 122 U/ml ve hidroliz süresi 10 sa olarak bulunmuştur. Pankreatik lipaz ve α -amilaz inhibisyon değerleri üzerine değişkenlerin etkisi önemli bulunmuştur.

Nasri ve ark. (2013a), beş farklı bakteriyel proteaz kullanarak kaya balığından protein hidrolizatı elde etmişlerdir. Kullanılan proteazlar arasında olan alkalazın optimum çalışma koşulları pH 8, sıcaklık ise 50°C olarak seçilmiştir. Enzimatik hidroliz boyunca hidroliz derecesi ölçülmüştür. Enzimatik hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatların ACE inhibisyon özellikleri belirlenmiştir. Daha sonra en yüksek inhibisyon özelliğine sahip hidrolizat fraksiyonlarına ayrıştırılıp sırasıyla ESI-MS (Elektrosprey iyonizasyon) ve MS-MS ile tanımlama yapılmıştır. Çalışma sonucunda yüksek oranda ACE inhibisyon özelliğine sahip peptit fraksiyonları tanımlanmıştır.

Elavarasan ve Shamasundar (2014), üç farklı tatlı su sazanından flavourzyme enzimi kullanarak protein hidrolizatları elde etmişlerdir. Enzimatik hidroliz koşulları 50°C, pH 6.5 ve hidroliz süresi 60 dk olarak uygulanmıştır. Hidroliz sonrası elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri ve ACE inhibisyon özellikleri belirlenmiştir. Sonuçta hidroliz derecesinin ACE inhibisyon özelliği üzerine etkisi olduğu bulunmuştur. ACE

inhibisyon özelliği %43-%71 arasında değişirken en yüksek inhibisyon özelliği hidroliz derecesi %15 olan hidrolizattan elde edilmiştir

Liu ve ark. (2014), surimi üretiminden arta kalan balık atıklarını protamex ve alkalaz enzimleri ile ayrı ayrı hidroliz etmişler ve elde ettikleri protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda elde edilen hidrolizatların çözünürlükleri en az %65 (pH 2-10) olarak raporlanmışken, hidroliz derecesi ile EAI'nin ters bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir.

Gunasekaran ve ark. (2015), karides kafası atıklarından alkalaz enzimi kullanarak optimizasyon çalışması yapmışlardır. Enzimatik hidrolizin optimizasyonu sonucu elde edilen değerler % 40.3 hidroliz derecesi, %38.93 DPPH temizleme aktivitesi, 8.21 μM Fe (II)/g hidrolizat olarak bulunmuştur.

Oseguera-Toledo ve ark. (2015), tarafından yapılan bir çalışmada fasulyeden elde edilen protein hidrolizatı farklı enzim dozajlarında ayrı ayrı alkalaz ve bromelain ile hidroliz edilmiştir. Çalışmada pH-stat metodu kullanılarak hidroliz derecesi ölçülmüştür. Daha sonra elde edilen peptit hidrolizatından ultrafiltrasyon ile farklı molekül ağırlıklarına sahip peptit fraksiyonları elde edilmiş ve bu fraksiyonlar LC-ESI-MS/MS ile tanımlanmıştır. Ayrıca bu fraksiyonların biyoaktif özelliklerini belirlemek için antidiyabetik (α -amilaz, α -glukozidaz ve DPP-IV inhibisyon) aktivite ve antioksidan kapasite deneyleri yapılmıştır. Çalışma sonucunda araştırmacılar fasulyeden elde edilen peptitlerin antidiyabetik özelliğe sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Valle ve ark. (2015), yaptıkları bir çalışmada balık ununun elzem amino asit içeriğini belirlenmiştir. Çalışmalarında elde ettikleri sonuçlar Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Baharuddin ve ark. (2016), yılan balığından enzimatik hidroliz ile protein hidrolizatı elde etmişlerdir. Enzimatik hidroliz koşulları 40°C, 60°C, süre 120, 180, 300 dk, enzim konsantrasyonu %1.5, %2, %20, pH 8.5, 9.5, 10.5 olarak belirlenmiş ve hidroliz derecesi bu koşullarda sırasıyla 36, 48 ve 69 olarak elde edilmiştir. Hidroliz derecesi ölçümü TCA metoduna göre yapılmıştır. Çalışmaya göre hidroliz süresi arttıkça hidroliz derecesinin arttığı bildirilmiştir. Elde edilen hidrolizatların biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri incelendiğinde, farklı hidroliz derecesine sahip hidrolizatların su tutma kapasitelerinin, köpürme özelliklerinin ve ACE inhibisyon aktivitelerinin farklı olduğu bulunmuştur. DH 36 olan hidrolizatın en yüksek ACE inhibisyonu ve köpürme özelliği olduğu bildirilirken, DH 69'da en yüksek emülsiyon stabilitesi ve çözünürlük elde

edilmiştir. Su tutma kapasitesinde ise DH 48 en yüksek değere sahip hidrolizat olarak raporlanmıştır.

Çizelge 2.1. Balık ununun elzem amino asit bileşimi

Amino asit	g/kg protein
Valin	32
Treonin	4.37
İzolösin	27.8
Lösin	48
Lizin	51
Metiyonin	27.5
Fenilalanin	27.6
Triptofan	1.18

Bkhairia ve ark. (2016), tarafından yürütülen bir çalışmada, kefal balık etinden farklı proteazlar kullanılarak balık protein hidrolizatları elde edilmiştir. Hidroliz süresince örnekler alınarak hidroliz derecesi ölçülmüştür. Elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri %8.5-%13.05 aralığında bulunmuştur.

Arise ve ark. (2016), tarafından yürütülen bir çalışmada karpuz çekirdeği protein izolatu pepsin, tripsin ve alkalaz enzimi ile hidroliz edilmiştir. Elde edilen hidrolizatların *in vitro* antioksidan ve α -amilaz inhibitör özellikleri incelenmiştir. Alkalaz ve tripsin ile elde edilen hidrolizatlarda α -amilaz inhibitör değerleri sırasıyla %86 ve %83 (IC₅₀: 0.149 ve 0.234 mg/ml) olarak bulunmuştur. Ayrıca tripsin hidrolizatında en yüksek antioksidan aktivite elde edilmiştir.

García-Moreno ve ark. (2017), mavi mezgit balığının atıklarını iki farklı serin endopeptidaz ile (alkalaz ve pankreatik tripsin) ayrı ayrı ve birlikte hidroliz edip farklı hidroliz derecelerinde hidrolizatlar elde etmişlerdir. Hidrolizatların yağ bağlama kapasiteleri incelendiğinde kullanılan enzimlerin ve hidroliz derecesinin yağ bağlama kapasitesini değiştirdiği bulunmuştur. Alkalaz kullanıldığında yağ bağlama kapasite değeri 3.74 g yağ/g hidrolizat olarak elde edilmiştir. Tripsin enziminin kullanıldığı hidrolizatlarda ise hidroliz derecesi ile yağ bağlama kapasiteleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Ancak tripsin-alkalaz kombinasyonu ile elde edilen hidrolizatın yağ bağlama kapasitesi (DH %4) 5.39 g yağ/g hidrolizat elde edilmiştir.

Senapati ve ark. (2017), hint somonundan elde ettikleri balık ununun besin ve element içeriklerini araştırmışlardır. Nem, protein, yağ ve kül içeriklerini sırasıyla

$\%6.10 \pm 0.17$, $\%73.03 \pm 0.28$, $\%2.8 \pm 0.11$ ve $\%17.21 \pm 0.33$ olarak bulmuşlardır. Enerji değerini ise 317.32 ± 1.98 kcal/100g olarak hesaplamışlardır. Elementel içeriklerine bakıldığında ise sırası ile kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, demir ve magnezyum değerleri 32,670, 41,410, 12,180, 6,170, 360, 7,110 $\mu\text{g/g}$ olarak bulunmuştur.

Oliveira ve ark. (2017), orkinos balığı atıklarından alkalaz enzimi kullanarak ($\%0.5$ enzim:substrat, 60°C , pH 6.5, 120 dk) balık protein hidrolizatı elde etmişlerdir. Elde edilen hidrolizatın hidroliz derecesi OPA metodu kullanılarak ölçülmüş ve $\%9.24$ olarak bulunmuştur. Ayrıca hidrolizatın antioksidan kapasitesini belirlemek için Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP), Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC) ve Oksijen Radikal Absorbans Kapasite (ORAC) analizleri yapılmıştır. Sonuçta elde edilen hidrolizatın antioksidan kapasite sonuçları sırasıyla 54.3, 52.4 ve 576.15 $\mu\text{M TE/g}$ protein olarak raporlanmıştır.

Nongonierma ve ark. (2017), tarafından yapılan bir araştırmada deve sütünün tripsin enzimi ile hidrolizi amacıyla tepki yüzey yöntemi kullanılarak bir deneme planı oluşturulmuştur. Bu plana göre değişkenler enzim:substrat oranı ($\%0.5$, 1.25, 2.0), sıcaklık (40, 50, 60°C) ve hidroliz süresi (60, 150, 240 dk) olarak belirlenmiştir. Enzimatik hidroliz sonucunda elde edilen 18 hidrolizattan 15 tanesinin DPP-IV inhibitör etkisi gösterdiği, böylelikle deve sütünün antidiyabetik özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir.

Awosika ve Aluko (2019), bezelye proteinini alkalaz, kimotripsin, pepsin ve tripsin enzimleri ile hidroliz etmişlerdir. Hidrolizden sonra elde ettikleri hidrolizatları ultrafiltrasyon ile molekül ağırlıklarına göre dört farklı (<1, 1-3, 3-5, 5-10 kDa) fraksiyona ayırmışlardır. Fraksiyonların α -amilaz ve β -glukozidaz inhibitör aktiviteleri incelendiğinde, fraksiyonların ve hidrolizatın inhibitör aktiviteleri benzer bulunmuştur. Ancak hidrolizatların lipaz inhibisyon aktiviteleri fraksiyonlarınkinden daha yüksek bulunmuştur.

Yuan ve ark. (2018), karides kabuğundan nötraz kullanılarak enzimatik hidroliz optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Denemede, enzim konsantrasyonu ($\%4-6$), sıvı-katı oranı (10-20 ml/g), hidroliz süresi (3-5 sa) bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Elde edilen hidrolizatların α -amilaz inhibisyon oranları belirlenmiştir. Optimum koşullar; enzim oranı $\%5.4$ (a/a), 4.1 sa, 50°C , pH 7.0, sıvı-katı oran 13 ml/g olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında α -amilaz inhibisyon oranı $\%43.4$ olarak bulunmuştur.

Samsudin ve ark. (2018), tarafından yapılan bir çalışmada, yılan balığı alkalaz enzimi ile hidroliz edilmiş ve hidrolizat ultrafiltrasyon ile 3, 5 ve 10 kDa olmak üzere farklı molekül ağırlıklarına sahip fraksiyonlara ayrılmıştır. Alkalaz enzimi için enzimatik hidroliz koşulları 2 sa, 56 °C, pH 9 olarak seçilmiştir. Sonuçta elde edilen fraksiyonların molekül ağırlıklarının ve pH'nın fonksiyonel özellikleri etkilediği belirlenmiştir. 5 kDa fraksiyonun en yüksek köpürme kapasitesine, emülsiyon aktivite indeksine ve yağ tutma kapasitesine sahip olduğu bildirilirken, 10 kDa fraksiyonu en yüksek emülsiyon stabilitesine ve su tutma kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur.

Qara ve ark. (2018), kılka balığından dört farklı ticari enzim kullanarak protein hidrolizatı elde etmişlerdir. Nötraz, alkalaz, protamex için enzimatik hidroliz sıcaklığı 50°C, pepsin için 37°C olarak belirlenmiş, hidroliz süresi ise 30, 60, 90 dk olarak seçilmiştir. Enzimatik hidroliz sonucunda hidroliz derecesi ölçümü, ACE inhibisyon aktivitesi ve antimikrobiyal özellik analizleri yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda hidroliz derecesi değerinin kullanılan enzime göre %2.63-3.36 aralığında değiştiğini bildirmişlerdir. Elektroforez ile hidrolizatın molekül ağırlıkları incelendiğinde 30 kDa'da yoğunluk görüldüğü, alkalaz ve nötraz kullanıldığında ise 10 kDa'ya kadar düşük molekül ağırlıklarına sahip peptit fraksiyonları elde edilmiştir. Elde edilen fraksiyonların biyoaktivite testleri incelendiğinde, düşük molekül ağırlığına sahip fraksiyonların antimikrobiyal özellik gösterdiği ve en yüksek ACE inhibisyon özelliğe sahip fraksiyonların nötraz enzimi ile elde edildiği bulunmuştur.

Noman ve ark. (2019), yılan balığı etinin enzimatik hidrolizi ile elde edilmiş hidrolizatlarının hidroliz derecelerinin fonksiyonel özelliklere etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacıların sonuçlarına göre bulunan su tutma kapasitesi değerleri 1.47-1.58 g su/g hidrolizat aralığında bulunmuş ve hidroliz derecesi ile su tutma kapasitesi arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir ($p < 0.05$).

Bayraklı (2019), balık ununu mevsiminde fazla avlanan veya insan tüketiminde kullanılmayan balıklardan veya deniz ürünleri işleyen fabrikaların atıklarından üretilen ekonomik değeri düşük bir ürün olarak tanımlamışlardır.

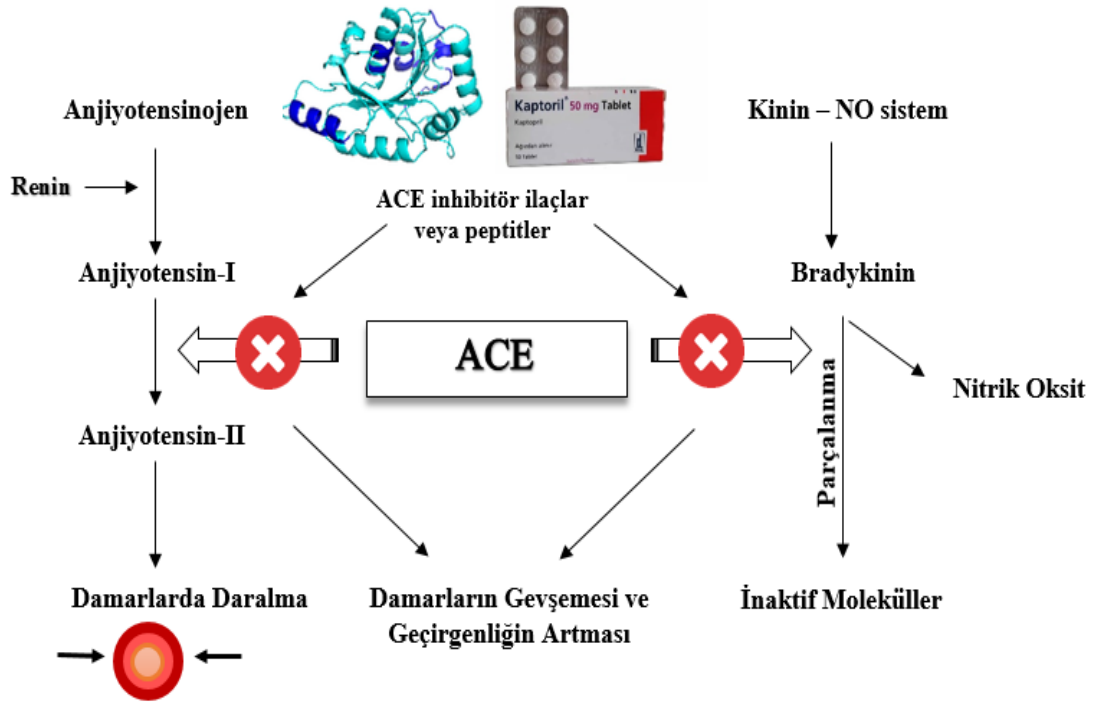
Vázquez ve ark. (2019), çeşitli balık türleri atıklarını alkalaz enzimi kullanarak hidroliz etmişlerdir. Hidroliz koşulları ise pH 8.6, sıcaklık 60.6°C, E/S ise %1 olarak seçilmiştir. Hidroliz süresi sonunda (4 s) hidroliz derecesi %13, çözünür protein miktarı ise %27 olarak bulunmuştur.

Azizi ve ark. (2020), kütüm balığı atıklarından enzimatik hidroliz ile protein hidrolizatı elde etmişlerdir. Çalışmada enzimatik hidroliz optimizasyonu için tepki yüzey yöntemi kullanılarak bir deneme dizaynı oluşturulmuştur. Bağımsız değişkenler olarak pH (7.5-8.5), sıcaklık (45-55°C), süre (1-3 sa) ve enzim konsantrasyonu (%0.5-1.5) seçilmiş, yanıt olarak da hidroliz derecesi belirlenmiştir. Çalışma sonucunda optimum enzimatik hidroliz koşulları pH 8.5, sıcaklık 55 °C, enzim konsantrasyonu %1.5 (a/a), süre ise 3 sa olarak bulunmuştur. En yüksek hidroliz derecesi ise %19.08 olarak raporlanmıştır. Antioksidan aktivite ise hidrolizat konsantrasyonu ile doğru orantılı bir şekilde artmıştır. Sonuçta, kütüm balığı atıklarından elde edilen protein hidrolizatının fonksiyonel gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Mudgil ve ark. (2020), bromelain, kimotripsin ve pronaz E enzimlerini kullanarak kinoa proteini hidrolizatları elde etmişlerdir. Enzimatik hidroliz süresi 2-6 sa aralığında belirlenmiş ve E/S oranı 1:100 (a/a) kullanılmıştır. Hidrolizin pH değeri ise enzimlerin optimum çalışma koşullarına göre seçilmiştir. Enzimatik hidroliz sonucu elde edilen hidrolizatların hidroliz derecesi, moleküler ağırlık dağılımları, antidiyabetik ve antihipertansif özellikleri belirlenmiştir. Sonuçta kinoa proteininden elde edilen peptitlerin, antihipertansif ve tip II diyabette kilit enzimler üzerine etkili olduğu bulunmuştur.

Kocak ve ark. (2020), keçi sütünden *Lactococcus lactis* subps. *lactis* ve *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* kültürlerini kullanarak keçi peyniri üretmişlerdir. Peynirlerin üretim aşamasında 3 ayrı bakteri suşu da ekleyerek elde ettikleri peynirlerde olgunlaşma periyotları boyunca oluşan biyoaktif peptitleri incelemişlerdir. Sonuçta peynir üretiminde farklı suşlar kullanmanın farklı biyoaktif peptitler oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bhandari ve ark. (2020), Dipeptidil-karboksipeptidaz olarak da bilinen ACE, renin-anjiyotensin sistemi içinde anjiyotensin I'den (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), damar daralmasına ve ardından kan basıncında artışa neden olan bir hormon olan anjiyotensin II'ye (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe) dönüşümü katalize ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca ACE'nin, vazodilatör özelliklere sahip olan Bradykinini de parçaladığını belirtmişlerdir. Dolayısıyla, ACE inhibitörlerinin hipertansiyonu engelleyerek kardiyovasküler hastalıkları önlediği bilinmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. ACE inhibitörlerinin etki mekanizması

Mohanty ve ark. (2021), tarafından yürütülen bir çalışmada Rohu balığı atıklarından alkalaz enzimi kullanılarak enzimatik hidrolizin optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bağımsız değişkenler olarak E/S oranı, hidroliz süresi ve sıcaklık seçilmiştir. Hidroliz derecesi üzerine en fazla etkiyi E/S oranı gösterirken, diğer bağımsız değişkenlerin de pozitif yönde lineer etkisi gözlemlenmiştir. Ayrıca protein hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri de incelendiğinde hidroliz derecesi arttıkça EAI değerinin azaldığı bildirilmiştir.

Zhang ve ark. (2021), karidese benzeyen bir deniz canlısı olan Antartika krilini pepsin, alkalaz, papain, tripsin ve nötraz enzimleri ile ayrı ayrı hidroliz etmişlerdir. Elde edilen 5 farklı hidrolizat arasından en yüksek DPPH radikali (DPPH·) ve hidroksil radikali (HO·) süpürme aktivitesine sahip hidrolizatın alkalaz enzimi kullanılarak elde edilen olduğu bildirilmiştir.

Gaikwad ve ark. (2021), uskumru balık atıklarından protein eldesi için alkali ekstraksiyon ile alkalaz ile enzimatik hidroliz yöntemlerini kullanmışlardır. Proseslerin optimizasyonu için sıcaklık, karıştırma hızı, pH, süre, enzim oranı, çözücü miktarı gibi değişkenler ile tepki yüzey yöntemi ile bir deneme deseni oluşturulmuştur. En yüksek protein veriminin elde edildiği koşullar ile elde edilen balık protein hidrolizatı

püskürtmeli kurutucuda toz haline getirildikten sonra enzimatik hidroliz optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuçta en yüksek protein verimi (%75) için alkali ekstraksiyon koşulları %64 çözücü miktarı, 490 rpm karıştırma hızı ve 80 dk olarak raporlanmıştır. Hidroliz derecesinin ölçülmesi için TCA yöntemi kullanılmış ve en yüksek hidroliz derecesine (%71.72), E/S oranı 40 U/ml, 50°C’de, pH 7.7, 40 dk ile ulaşılmıştır.

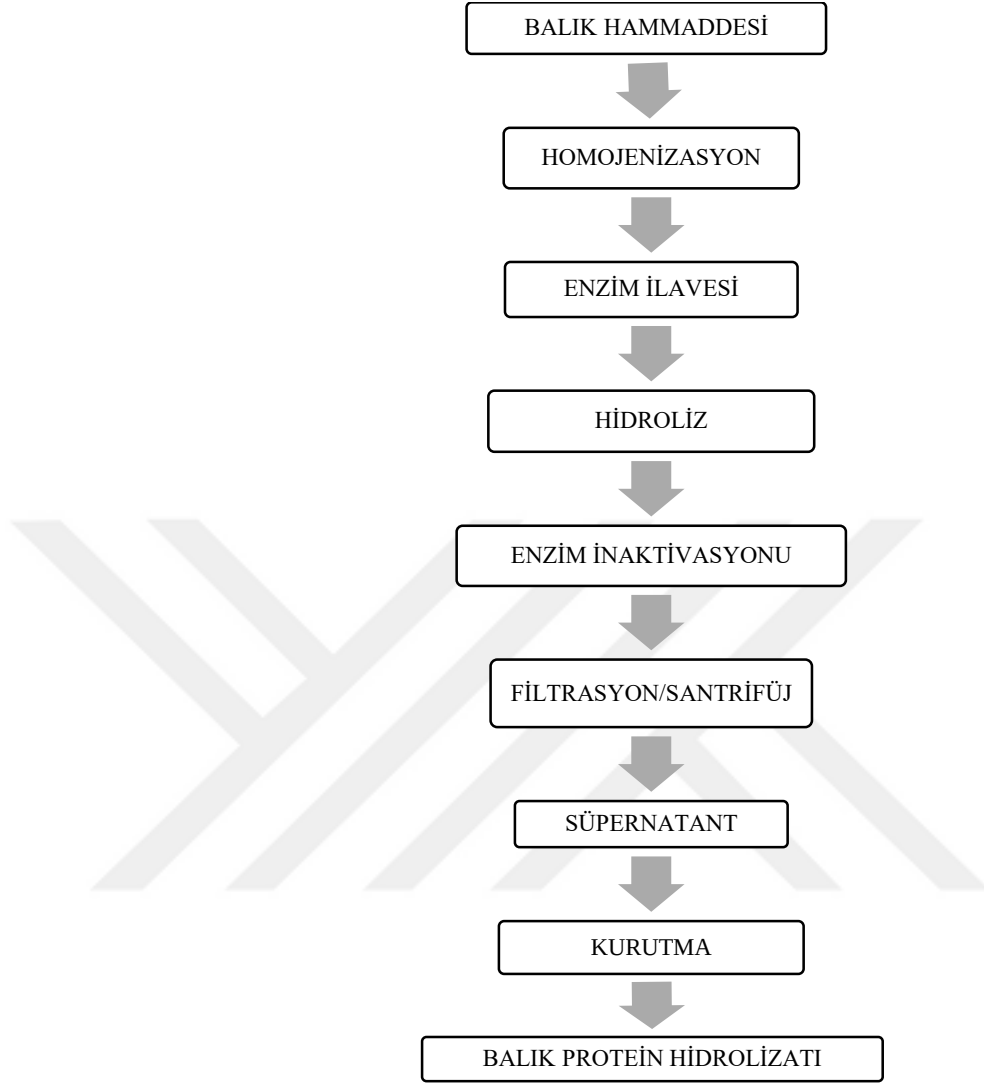
Da Silva ve ark. (2021), yaptıkları bir çalışmada, araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir mikroalg türü olan *Spirulina*’dan enzimatik hidroliz ile biyoaktif peptitler elde edilmiştir. Elde edilen bu biyoaktif peptitler ekstrüzyon yöntemi ile üretilen atıştırmalıkların içerisine ilave edilmiştir. Çalışma sonucunda *Spirulina*’dan ekstra edilmiş peptit ilaveli atıştırmalıkların daha yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğu bulunmuştur.

Elavarasan ve Shamasundar (2021), *Catla catla*, *Labeo rohita* ve *Cirrhinus mrigala* olmak üzere üç farklı tatlı su sazan balığı etlerinden papain enzimi kullanarak protein hidrolizatları elde etmişlerdir. Enzimatik hidrolizde E/S oranı, hidroliz süresi, sıcaklık ve pH optimizasyonu yapılmıştır. Elde edilen hidrolizatların hidroliz derecesi ve antioksidan aktivite ölçümleri yapılmıştır. Sonuçta elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri arttıkça antioksidan aktivite değerlerinin de arttığı bildirilmiştir.

Agustin ve ark. (2021), balık protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitelerinin peptitlerin boyutu ve serbest amino asitlerin bileşimiyle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada yılanbaş balığının derisinden elde ettikleri protein hidrolizatlarında hidroliz derecesi arttıkça DPPH aktivite değeri artmıştır.

Fathi ve ark. (2021), tarafından yapılan bir çalışmada pirinç kepeğinden ultrason ve alkalaz enzimi kullanılarak protein hidrolizatları elde edilmiştir. Elde edilen hidrolizatların hidroliz derecesi, antioksidan kapasiteleri, lipaz inhibisyon aktiviteleri ölçülmüştür. Sonuçlara bakıldığında hidrolizatın hidroliz derecesi 27.35 ± 0.45 , DPPH radikali temizleme aktivitesi 86.55 ± 1.17 , lipaz inhibisyon değeri ise 57.57 ± 0.91 olarak bulunmuştur.

Idowu ve ark. (2021), balık protein hidrolizatı üretimi ile ilgili hazırladıkları bir araştırma raporunda balık protein hidrolizatlarının amino asitler ve peptitler bakımında oldukça zengin olduklarını ve birçok sağlık faydalarına sahip olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca Şekil 2.3’de görüldüğü gibi balık deri ve atıklarından enzimatik hidroliz ile protein hidrolizatı üretim şemasını vermişlerdir.



Şekil 2.3. Balık protein hidrolizatı üretim şeması

Kiettiolarn ve ark. (2022), tarafından yürütülen bir çalışmada ton balığı pişirme suyu konsantrisinin tepki yüzey yöntemi ile alkalaz enzimi kullanılarak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Elde edilen hidrolizatların DPPH temizleme aktiviteleri ölçülmüştür. Enzimatik hidroliz için optimum koşullar E/S oranı % 2.2 (a/h), hidroliz süresi ise 281 dk olarak belirlenmiştir. Farklı kurutma yöntemlerinin (dondurarak, sıcak havayla ve vakum ile kurutma), hidrolizatların DPPH radikal temizleme aktivitesi ve amino asit (AA) profilleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Vakumla kurutulmuş hidrolizatın (VD), DPPH radikal temizleme aktivitesi %81.3 olarak belirlenmiş ve bu hidrolizatlar daha sonra ultrafiltrasyon ile fraksiyonlara ayrılmıştır. En yüksek DPPH

radikal temizleme aktivitesi VD-1 fraksiyonunda (<5 kDa) bulunmuştur. VD-3 fraksiyonu (> 10 kDa), en yüksek ABTS radikal temizleme aktivitesi göstermiştir.

Alahmad ve ark. (2022), tarafından yapılan bir çalışmada sazan balığının (*Hypophthalmichthys nobilis*) ficin enzimi ile hidrolizi gerçekleştirilmiştir. Optimum hidroliz koşulları 40°C, %3 E/S oranı, pH 6 olarak seçilmiştir. Hidroliz süresi ise 1, 3 ve 6 sa olarak belirlenmiştir. Elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri hidroliz süresi ile doğru orantılı olarak sırası ile %3.36, 17.09 ve 20.15 olarak bulunmuştur. Hidrolizatların protein miktarları hidroliz derecesi ile artmış iken EAI değerleri düşmüştür.

Kari ve ark. (2022), balık ununun amino asit kompozisyonunu inceledikleri çalışmalarında, balık ununun lizin ve sülfür içeren metiyonin bakımından oldukça zengin olduğunu bildirmişlerdir.

Bilir ve ark. (2022), tarafından yürütülen bir araştırmada, deniz salyangozu etinden (*Patella vulgata*) elde edilen protein izolatının alkalaz, flavourzyme enzimleri ile enzimatik hidrolizi ve ayrıca *in vitro* gastrointestinal sindirimi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hidrolizatların hidroliz dereceleri, antioksidan kapasiteleri ve ACE inhibisyon aktiviteleri ölçülmüştür. Ayrıca hidrolizatların peptit tanımlaması LC-MS/MS'de yapılmıştır. Hidroliz derecesinin proteolitik enzim kullanılarak elde edilen hidrolizatlarında hidroliz süresi arttıkça arttığı bildirilmiştir. Tüm hidrolizatlarda yüksek oranda ACE inhibisyon ve antioksidan özellik belirlenmiştir. Gastrointestinal sindirim sonucu elde edilmiş hidrolizatta 38 adet peptit tanımlanmıştır. Bu peptitlerin çoğunda, biyoaktivite özelliklerini olumlu etkileyen hidrofobik amino asitlerin bulunduğu belirtilmiştir.

Dinakarkumar ve ark. (2022), çalışmalarında *Secutor insidiator* adlı bir balıktan papain ve proteinaz K enzimleri kullanarak balık protein hidrolizatı elde etmişlerdir. Enzimatik hidroliz koşulları proteinaz K ve papain için sırasıyla 37°C, pH 7, 120 dk ve 50°C, pH 7, 90 dk olarak seçilmiştir. Elde edilen protein hidrolizatlarının besinsel bileşimi ve fonksiyonel özellikleri incelenmiştir. Çalışmada hidroliz derecesi %0.8 ve %0.9 olarak bulunmuştur. Papain hidrolizatında en yüksek çözünürlük indeksi (%78) pH 2, 6, 7, 8, 9 ve 10 da, en yüksek köpük oluşturma kapasitesi ve emülsiyon aktivitesi pH 2 de elde edilmiştir. Yağ ve su tutma kapasitesi ise en yüksek %0.2 konsantrasyonda kaydedilmiştir.

Karami ve ark. (2022), iki farklı fasulye türünden elde ettikleri protein hidrolizatlarını alkalaz ve flavourzyme enzimleri ile hidroliz etmişler ve elde ettikleri fraksiyonların fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerini incelemiştir. Alkalaz enziminin kullanıldığı hidroliz koşulları 55°C, pH 8, süre 7 sa, %7 E/S oranı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz sonucu hidroliz derecesi ölçülmüştür. Çalışma sonucunda farklı enzim ve substrat kullanılmasının elde edilen peptitlerin fonksiyonel ve biyoaktif özellikleri üzerine önemli etkisi olduğu bildirilmiştir. Alkalaz hidrolizatlarının diğer enzime göre daha küçük peptitler içerdiği belirlenmiştir. En yüksek antioksidan ve ACE inhibitör aktiviteye sahip peptitlerin ise flavourzyme ile elde edilen fraksiyonlar olduğu belirtilmiştir.

Bravo ve ark. (2022), farklı sindirim enzimleri kullanarak güvercin bezelyesini (*Cajanus cajan*) farklı sindirim enzimleri ve enzim kombinasyonları ile hidroliz ederek peptit fraksiyonları elde etmişlerdir. Daha sonra bu fraksiyonların bazı biyoaktif özelliklerini incelemişlerdir. Sonuçta elde edilen peptit fraksiyonlarının %87.5 civarında ACE inhibisyon özelliği bulunurken, antibakteriyel özellik gözlemlenmemiştir.

Cao ve ark. (2022), tarafından yapılan bir araştırmada, Azuki fasulyesi unu ve azuki fasulyesi hamuru alkalaz ve nötraz enzim karışımları kullanılarak hidroliz edilmiştir. Enzimatik hidroliz optimizasyonu için 4 farklı E/S oranı (%1.25, %2.50, %3.75, %5.00), 7 farklı hidroliz süresi (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 sa) seçilmiş olup sıcaklık 50 °C, pH 8.0 olarak belirlenmiştir. Enzimatik hidroliz sonucunda hidroliz derecesi belirlenmiş, ardından molekül ağırlığını belirlemek için jel kromatografi yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen fraksiyonların ACE inhibisyon özellikleri ve antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. Sonuçta Azuki fasulyesinden elde edilen peptitlerin antioksidan ve antihipertansif etkileri bulunmuş olup fonksiyonel gıdalarda kullanılmak üzere geliştirilebileceği bildirilmiştir.

Wen ve ark. (2022), tarafından yürütülen bir çalışmada soya fasulyesi proteinlerinden önce alkalaz ardından nötraz enzimleri kullanılarak peptitler elde edilmiştir. Elde edilen bu peptitlerin tanımlaması UHPLC-MS/MS cihazında yapılmış ve 85 tane peptit fraksiyonu tanımlanmıştır. Araştırmanın sonucunda tanımlanan peptitlerin büyük çoğunluğunun bağışıklık sistemini düzenleyici etkisi olduğu bildirilmiştir.

Kaprasob ve ark. (2022), yaptıkları bir araştırmada çörek mantarı olarak bilinen *Boletus edulis*, bromelanin ile hidroliz edilmiş ve protein hidrolizatı elde edilmiştir. Elde

edilen protein hidrolizatında hidroliz derecesi % 66.6 olarak tespit edilmiştir. Daha sonra molekül ağırlıklarına göre ayrıştırılan peptit fraksiyonlarında biyoaktivite testleri yapılmıştır. Sonuçta molekül ağırlığı 1 kDa'dan düşük fraksiyonların en yüksek antioksidan ve antihipertansif özelliğe sahip olduğu bulunmuştur.

Xiao ve ark. (2022), tarafından yürütülen bir çalışmada, tavuk göğüs eti %0.5 alkalaz enzimi kullanılarak 55°C'de 8 sa hidroliz edilmiştir. Araştırma sonucunda protein hidrolizatının antioksidan özelliğe sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca araştırmada UHPLC-Q-Orbitrap HRMS ile 22 peptit tanımlanmıştır. RWGG, YYCQ ve KAPKL olmak üzere 3 adet yeni biyoaktif peptit bulunmuş ve literatüre eklenmiştir. Bu peptitlerin arasında en yüksek antioksidan kapasiteye sahip peptidin YYCQ olduğu bildirilmiştir.

Vásquez ve ark. (2022), gökkuşağı alabalığının iç organlarını alkalaz enzimi kullanarak hidroliz etmişlerdir. Elde edilen hidrolizatta daha sonra *in vitro* gastrointestinal sindirim gerçekleştirilmiştir. Sindirim sonucunda elde edilen peptitlerin biyoaktif özellikleri araştırıldığında antioksidan özelliğe sahip oldukları bildirilmiştir.

Abbasi ve ark. (2022), tarafından yapılmış bir çalışmada kinoa proteini alkalaz ve tripsin enzimleri ile hidroliz edilmiştir. Elde edilen hidrolizatlar ultrafiltrasyon ile molekül ağırlıklarına göre fraksiyonlarına ayrılmıştır. Oluşan peptit fraksiyonlarının antioksidan kapasiteleri ve β -glukozidaz inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. Sonuçta en yüksek antioksidan kapasiteye sahip fraksiyonların alkalaz için <10kDa fraksiyonu, tripsin için ise 3 kDa> fraksiyonu olarak bulunmuştur. β -glukozidaz inhibisyon aktivitesi için en yüksek değer 3 kDa> tripsin fraksiyonunda elde edilmiştir.

De Matos ve ark. (2022), tarafından yürütülen bir çalışmada siyah cırcır böceği flavourzyme, alkalaz ve nötraz enzimleri ile 2 sa hidroliz edilmiştir. Hidroliz edildikten sonra elde edilen protein hidrolizatların antidiyabetik (α -amilaz ve β -glukozidaz inhibisyon) ve antihipertansif (ACE inhibisyon) özellikleri incelenmiştir. Çalışmanın sonunda en yüksek α -amilaz, β -glukozidaz ve ACE inhibisyon değerleri sırasıyla %55.5, %17.07 ve %50.84 olarak bulunmuştur.

Zhou ve ark. (2023), japon kaplan karidesi (*Marsupenaeus japonicus*) kafasından elde edilen protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon ve antibakteriyel özelliklerini araştırmışlardır. Bu amaçla, karides kafaları homojenize edildikten sonra papain enzimi (enzim/substrat, 10,000 U/g) ile uygun koşullarda (pH 7; 50°C) 4 sa hidroliz edilmiştir. Elde edilen hidrolizat boyut dışlama kromatografisi (SEC) ile molekül ağırlığı tayininin

ardından HPLC sistemi ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Elde edilen fraksiyonların moleköl ağırlıklarının 40,000 Da'dan daha düşük olduğu bulunmuştur. Elde edilen 11 farklı fraksiyonda en yüksek ACE inhibisyonu (%87.42; IC₅₀ 0.97 mg/ml) ve antibakteriyel özellik F₉'da izlenmiştir. Ayrıca F₉ fraksiyonu kolon kromatografisi ile 5 farklı alt fraksiyona ayrıştırılmıştır. En yüksek antibakteriyel özelliği F_{9-I} göstermişken, en yüksek ACE inhibisyonunu F_{9-III} fraksiyonu göstermiştir. Son olarak bu iki fraksiyonun LC-MS/MS ile amino asit dizilimi belirlenmiştir. F_{9-I} fraksiyonun amino asit dizilimi ve m/z oranı Val-Thr-Val-Pro (VTVP) ve 414.47 Da, F_{9-III} fraksiyonun amino asit dizilimi ve m/z oranı Ala-Arg-Leu/Ile (ARL/I) olarak tespit edilmiştir.

Wahyuningtyas ve ark. (2023), hint gergedanı böceği lavrasını papain enzimi ile hidroliz etmişler ve elde ettikleri hidrolizatların su tutma kapasitesini belirlemişlerdir. Araştırmada hidrolizatların su tutma kapasitelerinin 1.66-4.24 g su/g hidrolizat aralıklarında olduğu raporlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan balık unu, Gümüşdoğa (Milas/MUĞLA) firmasından temin edilmiştir. Alkalaz enzimi (2.4 AU/g) Novozyme (Danimarka) firmasından alınmıştır. Analizlerde kullanılan tüm kimyasal maddeler analitik saflıkta ve spesifikasyonlara uygun olarak Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ve Sigma (Sigma Chemical Company, MO, ABD) firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney Tasarımı

Bu tez çalışmasında, balık unundan enzimatik hidroliz ile protein hidrolizatları eldesinin deney tasarımı, deneysel tasarım yöntemlerinden birisi olan tepki yüzey yöntemine (RSM) göre tasarlanmıştır. Bu yöntemde ilk aşama, bağımlı (tepki) değişkenler üzerine etkili olduğu düşünülen bağımsız değişkenleri ve bu değişkenlerin seviyeleri belirlemektir. Bağımlı değişkenler literatüre dayanarak enzim/substrat (E/S) oranı (%1-3) ve hidroliz süresi (60-180 dk) olarak belirlenmiştir. Çizelge 3.1’de gösterilen deneysel tasarıma göre enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Balık Ununun Fizikokimyasal Analizleri

3.2.2.1. Nem Tayini

Balık unu örneklerinin kuru madde miktarı AOAC standart metot No: 925.23’e göre yapılmıştır. Elekten geçirilmiş balık unu, önceden darası alınmış numune kabına yaklaşık olarak 5 g tartılmış ve 105°C sıcaklıkta sabit tartıma gelene kadar etüvde tutulmuştur. Daha sonra desikatörde oda sıcaklığına gelince kadar bekletilmiş ve tartım alınmıştır. Balık ununun % nem miktarı denklem 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır (AOAC, 2005).

$$\%Nem\ miktarı = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{W_2} \quad (3.1)$$

W₁: Örneğin ilk ağırlığı (g)

W₂: Örneğin son ağırlığı (g)

Çizelge 3.1. Balık Unundan Enzimatik Hidrolizin Deneysel Tasarımı

DEĞİŞKEN	KOD	-α	-1	0	+1	+α
Enzim/Substrat (%)	X ₁	0.59	1	2	3	3.41
Hidroliz Süresi (dk)	X ₂	35.15	60	120	180	204.85
-α : -1.412						
		+α : +1.412				
Deneme	Faktör 1		Faktör 2			
	E/S (%)		Süre (dk)			
1	2.00		120.00			
2	2.00		120.00			
3	2.00		204.85			
4	3.41		120.00			
5	2.00		120.00			
6	3.00		60.00			
7	1.00		180.00			
8	2.00		120.00			
9	1.00		60.00			
10	0.59		120.00			
11	3.00		180.00			
12	2.00		35.15			
13	2.00		120.00			

3.2.2.2. Kül Tayini

Balık unu örneklerinin kül tayini AOAC standart metot No: 945.46'ya göre yapılmıştır. Elekten geçirilmiş balık unu yaklaşık olarak 3 g tartılmış ve darası alınmış krozelere konulmuştur. Daha sonra örnekler 550°C'de kül fırınında 5 sa kadar yakılmıştır. Kül fırınından alınan örnekler desikatöre alınarak oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletilmiştir. Son tartım alınarak denklem 3.2 kullanılarak % kül miktarı hesaplanmıştır (AOAC, 2005).

$$\% \text{ Kül miktarı} = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{W_1} \quad (3.2)$$

W₁: Örneğin ilk ağırlığı (g)

W₂: Örneğin son ağırlığı (g)

3.2.2.3. Protein Tayini

Balık ununun ve protein hidrolizatların % protein tayini AOAC standart metod No: 945.18'e göre kjeldahl metodu kullanılarak yapılmıştır. Distilasyon sonucu oluşan amonyak, standart bir mineral asit ile titre edilerek denklem 3.3 kullanılarak toplam azot miktarı hesaplanmıştır. Daha sonra toplam azot miktarının 6.25 ile çarpılması sonucu denklem 3.4'de görüldüğü gibi % protein miktarı bulunmuştur (AOAC, 2005).

$$\%Azot = (V - V_{k\ddot{o}r}) \times N \times 0.014/m(g) \times 100 \quad \dots(3.3)$$

$$\%Protein = \%Azot \times 6.25 \quad \dots(3.4)$$

V: Örnek için harcanan asit sarfiyatı

V_{kör}: Kör için harcanan asit sarfiyatı

3.2.2.4. Yağ Tayini

Balık unu örneklerinin yağ tayini AOAC standart metod No: 920.39'a göre yapılmıştır. Yaklaşık olarak 5 g elenmiş balık unu örneği soxhlet kartuşuna alınmış ve soxhlet düzeneğine yerleştirilmiştir. Üzerine 200 ml dietil eter ilave edildikten sonra 6 sa boyunca yıkanmıştır. Daha sonra darası alınmış balon içerisinde toplanan yağ 40°C'ye ayarlı rotary evaporatörde kalıntı dietil eter uzaklaşmaya kadar bekletilmiştir. Elde edilen yağ, etüvde bekletilmiş ve desikatörde soğutulduktan sonra tartım yapılmıştır. % Yağ miktarını hesaplamak için denklem 3.5 kullanılmıştır (AOAC, 2005).

$$\%Yağ = \frac{M_2 - M_1}{\text{Örnek Miktarı (g)}} \times 100 \quad \dots(3.5)$$

M₁: Kabın başlangıç ağırlığı (g)

M₂: Kabın son ağırlığı (g)

3.2.2.5. Karbonhidrat Değeri Hesaplaması

Karbonhidrat değerleri % bileşimden gidilerek analizle bulunan nem, kül, protein ve yağ miktarları toplanıp denklem 3.6'da görüldüğü gibi 100'den çıkarılarak hesaplanmıştır (Capuano, 2018).

$$\%Karbonhidrat = 100 - (\%nem + \%protein + \%yağ + \%kül) \quad \dots(3.6)$$

3.2.2.6. Enerji Değeri Hesaplaması

Enerji değerleri, besin öğelerinin sağladığı enerji değerleri toplanarak denklem 3.7 kullanılarak hesaplanmıştır (Capuano, 2018).

$$Enerji(kcal) = 4 (\%karbonhidrat + \%protein) + 9(\%yağ) \quad \dots(3.7)$$

3.2.2.7. Element Analizi

Balık ununda element analizi NMKL 161: 1998 metodundan modifiye edilmiştir. Ön hazırlık işlemi için, balık unu örneği mikrodalga fırında nitrik asit ile yakılmıştır. Analizde MARS XPress (CEM, ABD) mikrodalga yakma sistemi kullanılmıştır. Bu amaçla 0.5 g elenmiş balık unu örneği teflon yakma tüpleri içerisine alınmış, üzerine 8 ml nitrik asit (HNO₃) ve 2 ml hidrojen peroksit (H₂O₂) eklenmiştir. 30 dk bekletildikten sonra kapakları kapatılıp mikrodalga cihazına yerleştirilmiştir. Mikrodalga yakma programı 1200 W, 170°C ve 10 dk olarak ayarlanmıştır. Sıcaklık 50°C'nin altına düştükten sonra teflon tüpler açılmış ve gaz çıkışının bitmesi beklenmiştir. Soğutma tamamlandıktan sonra her tüpe 5 ml ultra saf su eklenerek 50 ml'lik falkon tüplere külsüz (ashless) süzgeç kâğıdı kullanarak süzme işlemi yapılmıştır. Ultra saf su ile son hacim 25 ml'ye tamamlanmıştır. Yakılan numune elemente göre AF (Alev Spektrometresi, PG Instruments), AAS (Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi, Analytik Jena) ve ICP-MS (İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi, Analytik Jena) cihazında okunmuştur (Şekil 3.1). Cihaz şartları ise Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Mikrodalga Fırın ve ICP-MS

Çizelge 3.2. Balık Ununda Aranılan Elementler ve Cihaz Şartları

Element	Cihaz	Kullanılan Gaz	Standart Çalışma Aralığı
Potasyum (K)	AF	LPG	0-100 (ppm)
Kalsiyum (Ca)	AF	LPG	0-100 (ppm)
Sodyum	AF	LPG	0-100 (ppm)
Magnezyum (Mg)	AAS	Hava-C ₂ H ₂	0-10 (ppm)
Mangan (Mn)	AAS	Hava-C ₂ H ₂	0-2 (ppm)
Demir (Fe)	AAS	Hava-C ₂ H ₂	0-2 (ppm)
Bakır (Cu)	AAS	Hava-C ₂ H ₂	0-2 (ppm)
Çinko (Zn)	AAS	Hava-C ₂ H ₂	0-1 (ppm)
Silisyum (Si)	AAS	Azot protoksit-C ₂ H ₂	0-2 (ppm)
Kurşun (Pb)	ICP-MS	Argon/Helyum	0-10 (ppb)
Kadmiyum (Cd)	ICP-MS	Argon/Helyum	0-100 (ppb)
Cıva (Hg)	ICP-MS	Argon/Helyum	0-5 (ppb)

3.2.2.8. Mikotoksin Analizleri

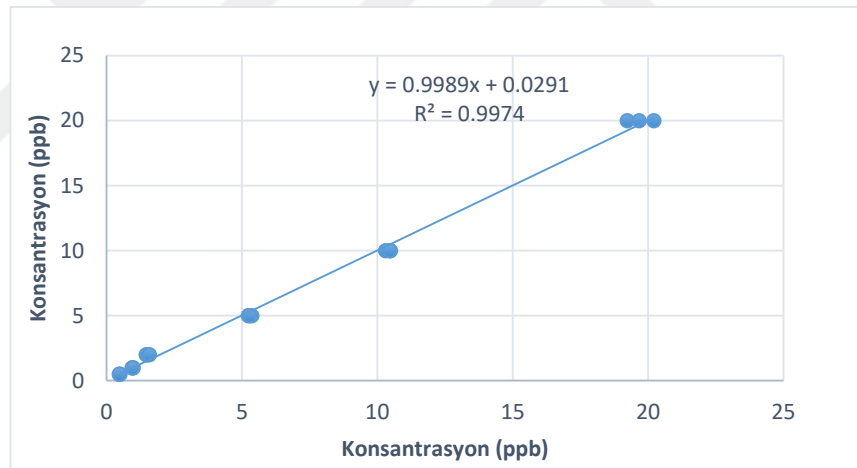
Balık ununda bulunan Aflatoksin B1 ve Toplam Aflatoksin (G1+G2+B1+B2) analizi için AOAC 999.07 yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.2).

Toplam aflatoksin analizi için; 50 g balık unu örneği üzerine 4 g NaCl ilave edildikten sonra üzerine 60 ml ultra saf su ve 240 ml metanol ilave edilmiştir. Çalkalayıcıda 30 dk karıştırıldıktan sonra kaba filtre kâğıdından süzölmüştür. Süzöntüden 10 ml alınıp 60 ml PBS (pH 7.4) çözeltisi ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım daha önce 10 ml PBS ile şartlandırılmış immünoafinite kolondan (IAK) geçirilmiştir. Daha sonra kolondan 15 ml ultra saf su geçirilmiştir. Elüsyon aşamasında 1.375 ml metanol, daha sonra 1.925 ml ultra saf su geçirilmiş ve HPLC'ye (Shimadzu, JAPONYA) enjeksiyon yapılmıştır.



Şekil 3.2. Aflatoksin Analizinde kullanılan PBS tampon ve IAK

HPLC’de kantifikasyon için 6 farklı aflatoksin konsantrasyonlarında standartlar enjekte edilip pik alanına göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. Toplam aflatoksin kalibrasyon grafiği

HPLC şartları:

- ✓ Inert Sustain C18 kolon (4.6mm x 150mm x 5µm)
- ✓ Kobra Cell (R-Biopharm) türevlendirici
- ✓ Floresans Dedektör: Excitation 360 nm, Emission 420 nm
- ✓ Kolon Fırını: 40 °C
- ✓ Enjektör : 100 µl lik loop
- ✓ Akış Hızı: 1.000 ml / dk

- ✓ Mobil faz: Saf Su:Metanol (550 : 450 / v:v) içerisinde 120 mg KBr ve 350 µl Nitrik Asit (4N)

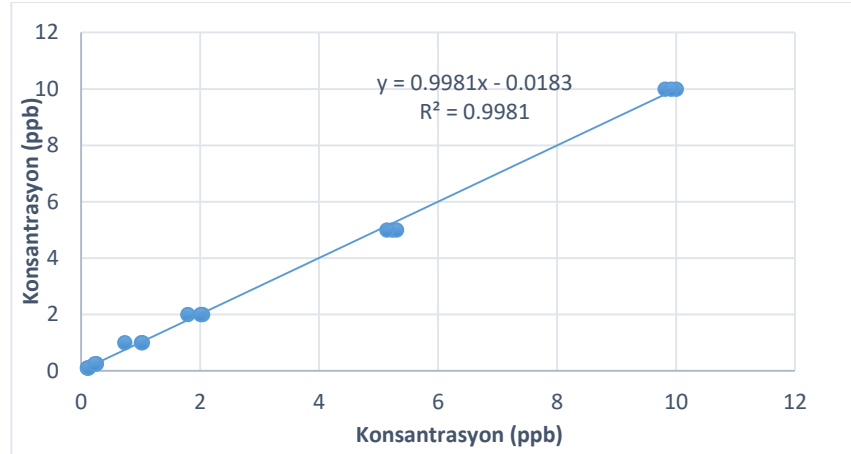
Balık ununda bulunan Okratoksin A analizi için R-Biopharm, A20-P14.V9 yöntemi kullanılmıştır. Yönteme göre 50 g örnek çelik blender haznesine alınıp üzerine 60 ml ultra saf su ve 140 ml metanol ilave edilmiştir. Blender 30 sn yüksek hızda çalıştırılıp homojenizasyon gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karışım kaba filtre kağıdında süzölmüştür. Süzöntüden 10 ml alınıp üzerine 40 ml PBS eklenmiştir. Daha sonra bu karışımın 20 ml'si immünoaffinite kolondan (IAK) geçirilmiştir. Daha sonra kolondan 10 ml PBS ardından 10 ml ultra saf su geçirilmiştir. Elüsyon aşamasında 1.5 ml metanol, ardından 1.5 ml ultra saf su geçirilmiş ve HPLC'ye (Shimadzu, Japonya) enjeksiyon yapılmıştır (Şekil 3.4). HPLC'de kantifikasyon için 6 farklı okratoksin a konsantrasyonlarında standartlar enjekte edilip pik alanına göre kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. Toksin analizlerinin gerçekleştirildiği HPLC sistemi

HPLC şartları:

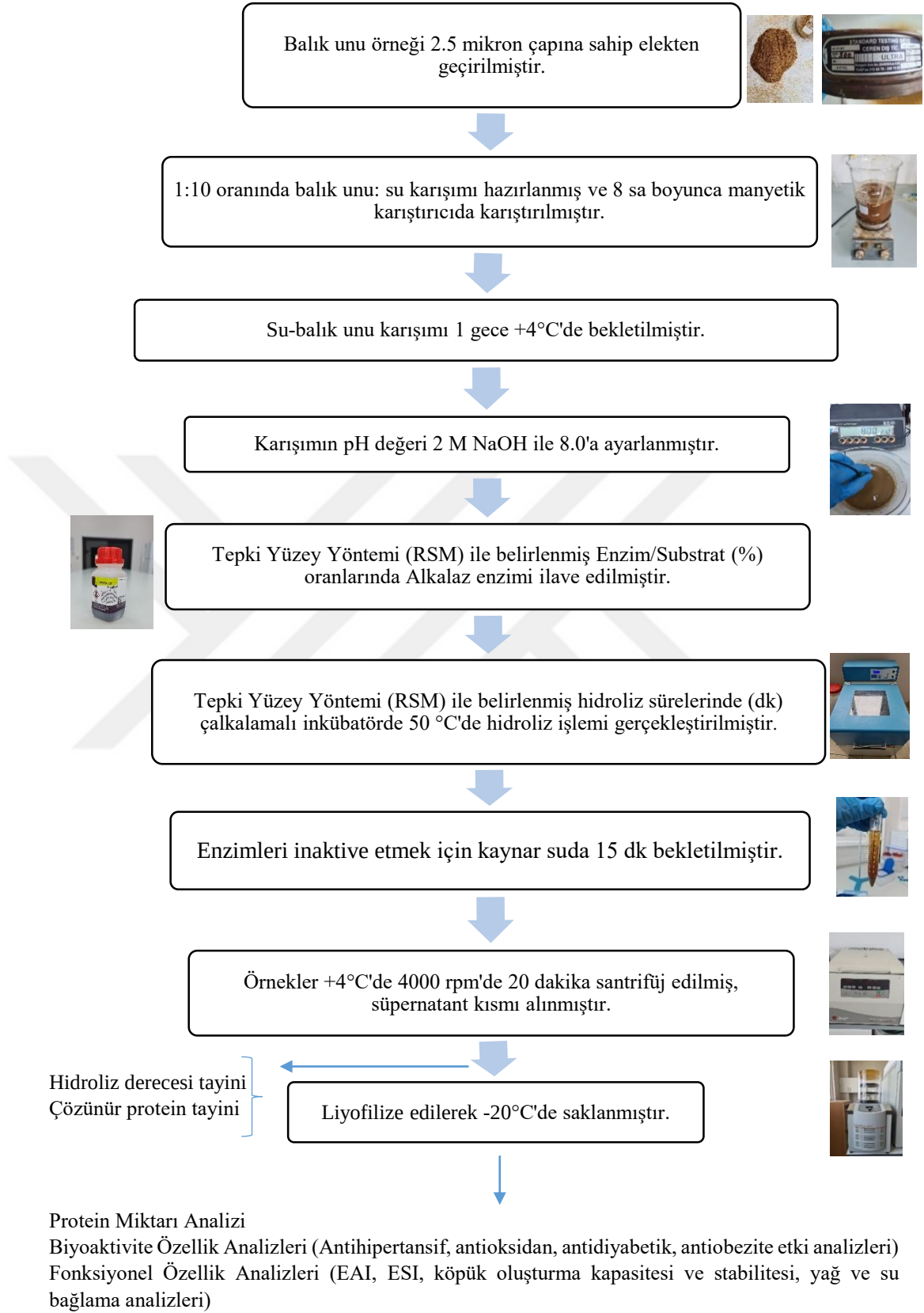
- ✓ Inert Sustain C18 kolon (4.6mm x 150mm x 5µm)
- ✓ Floresans Dedektör: Excitation 350 nm, Emission 450 nm
- ✓ Kolon Fırını: 40 °C
- ✓ Enjektör : 100 µl lik loop
- ✓ Akış Hızı: 1.000 ml / dk
- ✓ Mobil faz: Asetonitril/Saf Su/Asetik Asit (99/99/2 v/v/v)



Şekil 3.5. Okratoksin A kalibrasyon grafiği

3.2.3. Balık Unundan Enzimatik Hidroliz ile Protein Hidrolizatı Eldesi

Balık unundan enzimatik hidroliz ile protein hidrolizatı eldesini gösteren akış şeması Şekil 3.6'da verilmiştir. Firmadan tedarik edilen balık unu öncelikle 2.5 mikron çapına sahip çelik bir elek kullanılarak elenmiştir. Balık unu, su ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. Bu amaçla 1:10 (a/h) oranında balık unu:saf su manyetik karıştırıcıda (Heidolph, Almanya) 8 saat homojenize edilmiştir. Balık unu-su süspansiyonunun pH'sı 2 M NaOH ile 8.0'a ayarlanmıştır. Daha sonra erlenlere alındıktan sonra içerisine X1 değişkenleri oranlarında E/S (%) olacak şekilde alkalaz enzimi ilave edilmiştir. Örnekler çalkalamalı inkübatöre (Daihan Scientific, Thermostable IS20, Kore) yerleştirilmiş, sıcaklık 50°C'de, karıştırma hızı ise 100 rpm'de sabit tutulup hidroliz gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7) X2 değişkeni olan hidroliz sürelerinde örnekler alınmıştır. Alınan örneklerdeki enzim aktivitesini durdurmak için örnek tüpleri 95°C'de 15 dk suda bekletilmiştir. +4 °C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-10, ABD) edilmiş, süpernatant kısmı alınmıştır. Hidroliz derecesi ve çözünür protein analizi için hidrolizatlardan örnekler alınmış ve geri kalan süpernatantlar liyofilize edilmiş (Teknosem, Toros TRS), -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.6. Enzimatik hidrolizin akış şeması



Şekil 3.7. Enzimatik hidroliz

3.2.4. Hidroliz Derecesi Tayini

Nielsen ve ark., (2001), tarafından geliştirilen OPA metodunda küçük modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Balık protein hidrolizatlarında toplam peptit sayısı (htot) 8.6 meq/g olarak kabul edilmiştir (Adler-Nissen, 1986).

100 ml Orto-phthalaldehyde (OPA) reaktifinin hazırlanması için; 1.905 g disodyum tetraborat dekahidrat, 150 mg sodyum dodesil fosfat (SDS), 80 mg OPA (2ml etanolde çözdürülmüş), 88 mg dithiothreitol (DTT) kullanılmıştır. Hazırlanan OPA reaktifi 10 dk ultrasonik su banyosunda bekletilerek tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Kimyasal karışım bekletilmeden kullanılmış ve analiz esnasında karanlık ortamda, koyu renkli şişede oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. DH analizinde, tüplere 400 µl örnek eklenmiş daha 6 ml OPA reaktifi eklenip vortekslenmiş ve 2 dk inkübasyonun ardından spektrofotometrede (Jasco, JAPONYA) 340 nm’de absorbans ölçülmüştür. Serin standardı için ise 10 mg/100 ml serin amino asit çözeltileri hazırlanmış ve yukarıdaki işlemler standart için tekrar edilmiştir. Kör okuması için ise örnek yerine saf su ilave

edilip okuma yapılmıştır. Tüm okumalar kuartz küvetlerde ve 3 paralelli olarak yapılmıştır (Şekil 3.8). Hidroliz derecesi denklem 3.8 ve 3.9 kullanılarak hesaplanmıştır.

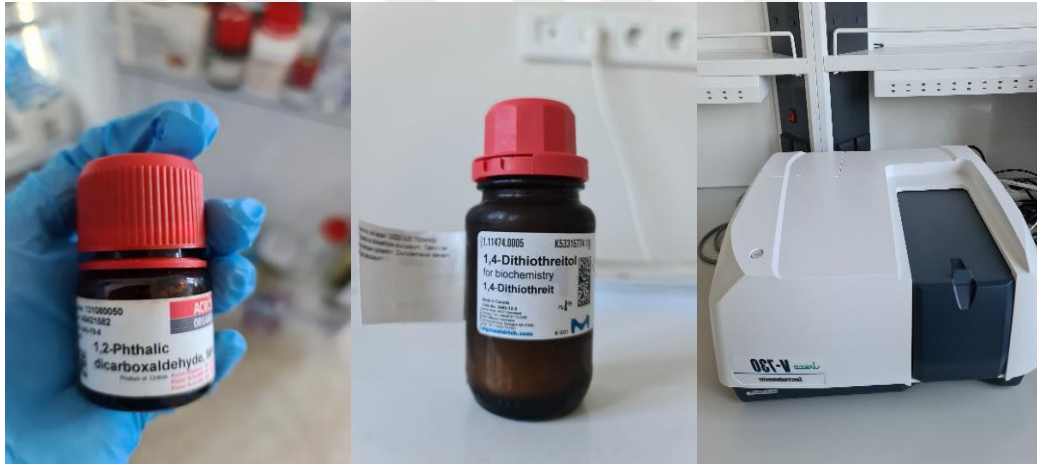
$$\text{Serin} - \text{NH}_2 \text{ meqv/g (h)} = \frac{\frac{A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör}}}{A_{\text{standart}} - A_{\text{kör}}} \times C_{\text{standart}} \times sf}{P} \quad \dots(3.8)$$

($A_{\text{örnek}}$: Örneğin absorbans değeri; $A_{\text{kör}}$: Kör denemenin absorbans değeri; A_{standart} : Standart çözeltinin absorbans değeri; sf: seyreltme faktörü; P: Çözeltideki protein miktarı (g/L), C_{standart} : Standart olarak kullanılan serin konsantrasyonu (meqv/L))

$$\%DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad \dots(3.9)$$

h: hidroliz edilmiş peptit bağı sayısı

h_{tot} : toplam peptit bağı sayısı (8.6)



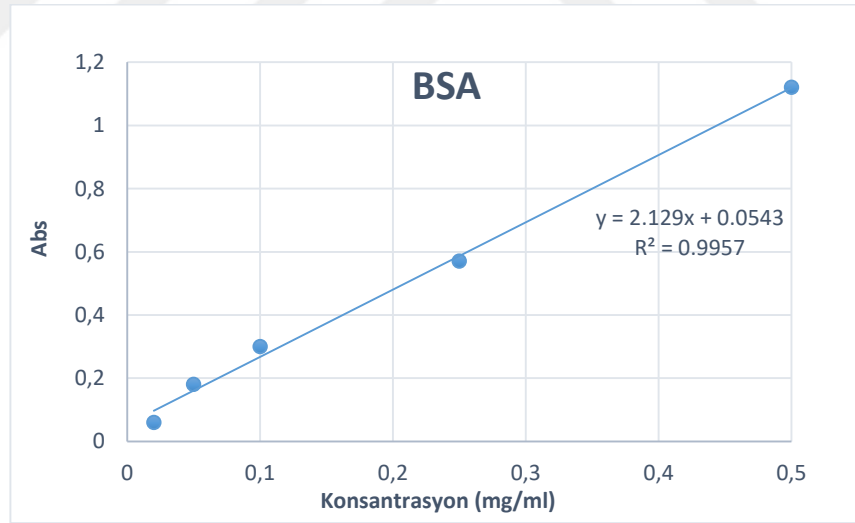
Şekil 3.8. Hidroliz derecesinin ölçümü için kullanılan UV-Vis Spektrofotometre ve kimyasal malzemeler

3.2.5. Çözünür Protein Tayin

Çözünür protein tayini Lowry yöntemine göre yapılmıştır (Lowry, 1951). Bu yöntemin esası şöyledir. Bazık ortamda Cu^{+2} , proteinlerin peptit bağları ile kompleks oluşturarak Cu^{+} 'e indirgenmesi, indirgenen bakırın protein zincirindeki triptofan, sistein

ve tirozin aminoasitlerinin Folin-fenol reaktifini indirgemesiyle mavi renk oluşturmasıdır.

0.1 N NaOH içerisinde %2 Na₂CO₃ hazırlanarak A özeltisi hazırlanmıştır. B özeltisi için saf suda %1 CuSO₄.5H₂O hazırlanmıştır. C özeltisi için ise %2'lik sodyum-potasyum tartarat hazırlanmıştır. D özeltisi için 0.25 ml B özeltisi + 0.25 ml C özeltisi karıştırılmıştır. E özeltisi için ise 0.25 ml D özeltisi + 12.5 ml A özeltisi karıştırılmıştır Standart BSA özeltisi saf su ile hazırlandıktan sonra 5 farklı noktada kalibrasyon grafiği çizilmiştir (şekil 3.9). Analiz edilecek protein içeren örnekten 10 µl alınıp, 190 µl 0.1 N NaOH-%0.1 SDS özeltisi ile 200 µl ye seyreltilerek bazikleştirilmiştir. 1 ml E özeltisi ilave edildikten sonra karışım hemen vortekslenmiş ve 5-10 dk kadar bekletilmiştir. 1:1 oranında saf suyla seyreltilmiş Folin reaktifinden bu standartlara ve örneğe 100 µl ilave edilmiş ve hemen vortekslenmiştir. Standart ve örnek karışımları 30 dk inkübe edildikten sonra 650 nm'deki absorbands değerleri okunmuştur. Kalibrasyon grafiğinden örnek için elde edilen konsantrasyon değerleri, bu işlemdeki seyreltme faktörü olan 20 ile çarpılarak protein içeriği bulunmuştur.



şekil 3.9. BSA'nın kalibrasyon grafiği

3.2.6. Balık Unu Proteini ve Hidrolizatlarının Biyoaktif Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.6.1. ACE İnhibisyon Aktivitesi (Antihipertansif Etki) Tayini

Protein hidrolizatlarının ve peptit fraksiyonlarının ACE inhibisyon aktivitesi Jamdar ve ark., (2010)'nın kullandıkları metotta modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Bu metodun temeli Hippuryl-histidyl-leucine'nin (HHL) ACE ile hidrolizi sonucu oluşan hippürik asit miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. Bu amaçla HHL (5mM) 0.3 M NaCl içeren 0.1 M sodyum borat tamponu (pH 8.3) içerisinde çözündürülmüştür. Daha sonra bu çözeltiden 100 µl alınıp üzerine 25 µl protein hidrolizatı çözeltisi (1 mg örnek/1 ml sodyum fosfat tamponu) eklenmiştir. Bu karışım 37°C'de 10 dk inkübe edildikten sonra üzerine 10 µl ACE (100 mU/ml) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonu durdurmak için tüplere 100 µl 1M HCl eklenmiştir. Oluşan hippürik asitin ekstrakte edilmesi için tüplere 1 ml etil asetat eklenmiştir. Tüpler 15 sn vorteks (Lab312, TÜRKİYE) ile karıştırılmış ve 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra üst kısımda oluşan organik fazdan tüpe 800 µl alınmış ve 95°C'de 20 dk kurutma yapılmıştır. Kalıntı 1 ml saf su ile çözündürülmüş ve spektrofotometrede (Jasco, JAPONYA) 228 nm'de absorbanslar ölçülmüştür. ACE inhibisyon aktivitesi (%) denklem 3.10 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ ACE inhibisyon aktivitesi} = \left(1 - \frac{A_0}{A_k}\right) \times 100 \quad \text{..(3.10)}$$

A_k : ACE+HHL absorbansı

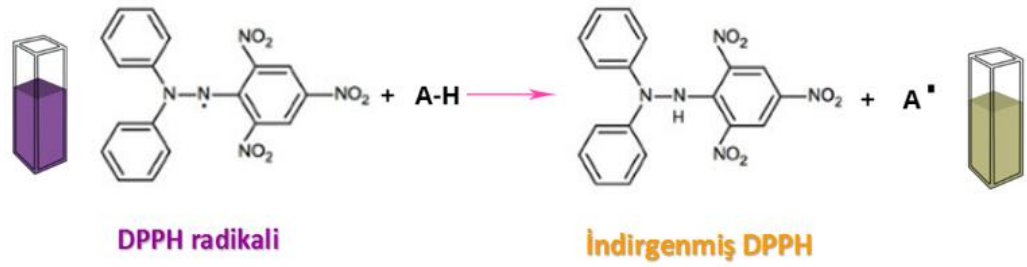
A_0 : ACE+HHL+Örnek absorbansı

3.2.6.2. Antioksidan Aktivitesi Tayini

Peptitlerin *in vitro* antioksidan aktivitelerini ölçmek için birçok metot kullanılmaktadır. Bu çalışmada, en sık kullanılan yöntemlerden DPPH radikalı temizleme aktivitesi ve ferrik iyonu indirgeme kapasitesi (FRAP) yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.6.2.1. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Radikalı Temizleme Aktivitesi Tayini

DPPH radikalı temizleme aktivitesi Godinho ve ark., (2016)'ın yönteminde bazı değişiklikler yapılarak ölçülmüştür. Spektrofotometrik olarak gerçekleştirilen analiz; koyu menekşe renkli radikalın, proton veya elektron verebilme yeteneğinde bir antioksidanla reaksiyona girmesi sonucu renginin açılması esasına dayanmaktadır (Şekil 3.10). Protein hidrolizatlarından 2 mg/ml hazırlanmış karışımlardan 1 ml alınmış ve üzerine taze hazırlanmış 0.1 mM %95 metanolde hazırlanmış 1 ml DPPH çözeltisi eklenmiştir. Karışım vorteks ile iyice karıştırılmış ve oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra örneklerin spektrofotometrede (Jasco, JAPONYA) 517 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Kontrol örnekleri için tüplere protein hidrolizatı karışımı yerine metanol eklenmiştir.



Şekil 3.10. DPPH radikalının indirgenmesi

Örneklerin DPPH radikalı temizleme aktivitesi denklem 3.11 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% inhibisyon = \left(1 - \frac{A_0}{A_k}\right) \times 100 \quad ..(3.11)$$

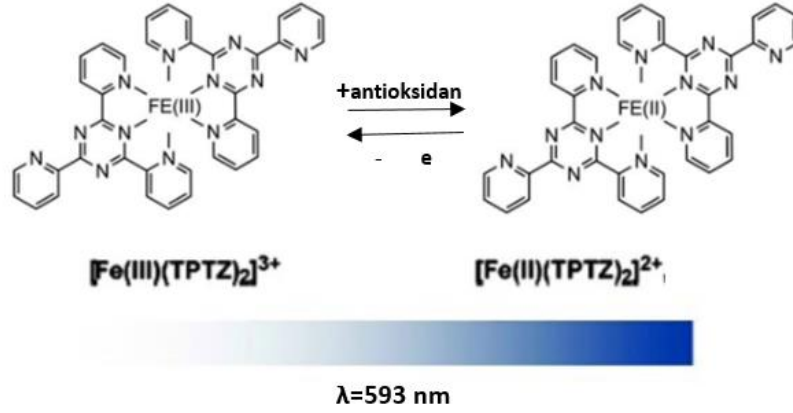
A_0 : Protein karışımı eklenmiş örneğin absorbansı

A_k : Kontrol örneğinin absorbansı

3.2.6.2.2. Ferrik İyon İndirgeme (FRAP) Yöntemi ile Antioksidan Aktivite Tayini

Fe^{+3} ferrik iyonunun Fe^{+2} iyonuna indirgenmesi renkli bir bileşik olan ferrous-tripirydyltriazine kompleksinin oluşmasına neden olmaktadır (Şekil 3.11). Protein

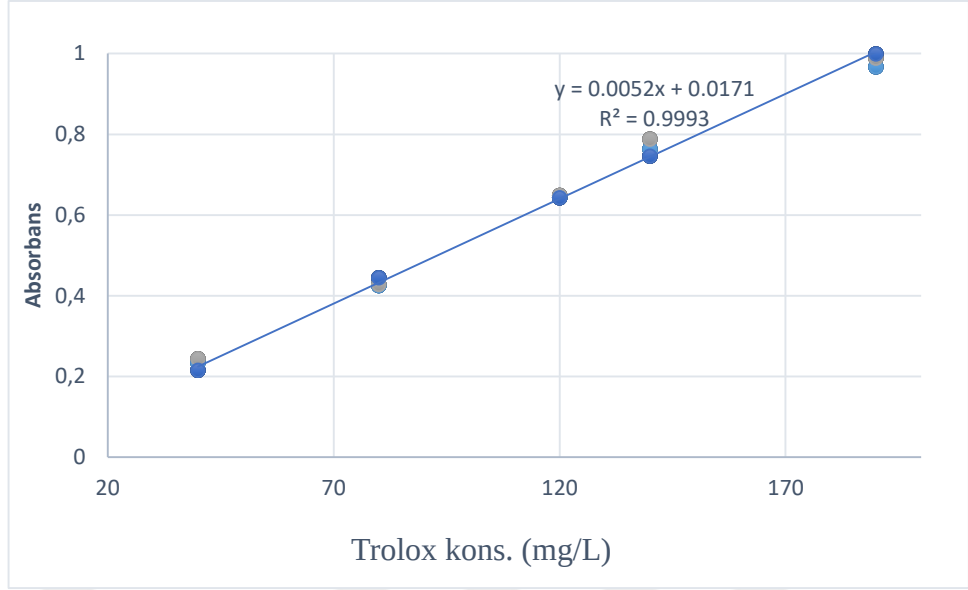
hidrolizatlarının Fe^{+3} Fe^{+2} dönüşümüne olan etkisine göre indirgeme gücü tayini (FRAP) Ketnawa ve ark., (2017)'nin metodunda bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.11. Fe^{+3} iyonunun Fe^{+2} 'ye indirgenmesi

Sodyum asetat çözeltisi hazırlamak için 2.46 g sodyum asetat tartılarak 100 ml saf su ile balon hacmine tamamlanmıştır. 300 mM asetik asit çözeltisi hazırlamak için 1.8 g asetik asit alınarak 100 ml saf su ile balon hacmine tamamlanmıştır. 300 mM asetik asit çözeltisi hazırlamak için 1.8 g asetik asit alınarak 100 ml saf su ile balon hacmine tamamlanmıştır. 300 mM asetat tamponu (40 ml sodyum asetat çözeltisi üzerine 300 mM asetik asit çözeltisi) pH 3.6'ya ayarlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir. Stok çözeltiler için 10 mM TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazin) çözeltisi (40 mM HCl'de hazırlanmış) ve 20 mM ferrik klorür çözeltisi ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) hazırlanmıştır. Çözeltiler hazırlandıktan sonra analizin yapılacağı gün taze olarak asetat tamponu: TPTZ çözeltisi: Ferrik klorür çözeltisi 10:1:1 (v/v/v) oranlarında karıştırılmıştır.

Protein hidrolizatlarının çözeltileri (2 mg/ml) 37°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından bu çözeltilerden 1 ml alınıp üzerine 2 ml FRAP çözeltisi eklenip vorteks ile iyice karıştırılmış ve tüpler karanlıkta 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra örneklerin absorbansı spektrofotometrede 593 nm'de ölçülmüştür. Kör numune için protein hidrolizat çözeltisi yerine saf su kullanılmıştır. Örneklerin FRAP indirgeme güçleri Trolox ile çizilen kalibrasyon eğrisinden (40-190 mg/L), mM Trolox'a eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Trolox kalibrasyon eğrisi

3.2.6.3. α -Amilaz İnhibisyon Aktivitesi (Antidiyabetik Etki) Tayini

Protein hidrolizatlarının α -amilaz inhibisyon aktivite ölçümü Arise ve ark., (2016)'nın kullandıkları metotta bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre, toz haline getirilmiş hidrolizatlardan 2 mg/ml çözeltiler hazırlanmıştır. Amilaz çözeltisi (0.5U/ml) 6 mM NaCl içeren 20 mM sodyum fosfat tamponuyla (pH 6.9) hazırlanmıştır. 125 μ l protein hidrolizatı içeren karışımdan alınıp üzerine 125 μ l amilaz çözeltisi eklenmiş ve iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından sodyum fosfat tamponu ile hazırlanmış nişasta çözeltisinden (1 g/100 ml) 125 μ l eklenmiş ve 37°C'de 20 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda tüplere 250 μ l di-nitrosalisilik asit (DNS) çözeltisi (40 mM DNS, 1.0 M sodyum fosfat tartarat tetrahidrat, 0.4 M NaOH) eklenmiş ve kaynar suda 5 dk bekletilmiştir. Tüpler soğuduktan sonra üzerlerine 2.5 ml saf su eklenip 540 nm'de spektrofotometrede (Jasco, JAPONYA) köre karşı absorbanslar ölçülmüştür. Kör olarak aynı tüplerde enzim yerine tampon çözelti eklenmiş tüpler kullanılmıştır. % α -amilaz inhibisyon aktivitesi denklem 3.12 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \alpha - \text{amilaz inhibisyon aktivitesi} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100 \quad ..(3.12)$$

A_0 : inhibitörsüz enzim aktivitesi

A_i: inhibitörlü enzim aktivitesi

3.2.6.4. Pankreatik Lipaz İnhibisyon Aktivitesi (Antiobezidik Etki) Tayini

Protein hidrolizatlarının pankreatik lipaz inhibisyon aktivitelerinin tayini González-Noriega ve ark., (2022)'nin belirledikleri yönteme göre yapılmıştır. Buna göre pankreatik lipaz çözeltisi (10 mg/ml) 75 mM Tris-HCl tampon çözelti (pH 8.5) ile hazırlanmıştır. Bu çözelti analizin yapılacağı gün taze olarak hazırlanmıştır. 1620 µl tampon çözelti, 120 µl enzim çözeltisi ve 160 µl protein çözeltisi (3 mg/ml) karıştırılmış ve 37°C'de 25 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra etanolde hazırlanmış 3,3 mM *p*-nitrofenilpalmitat çözeltisinden 10 µl eklenmiş ve 37°C'de 15 dk daha inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol örneği için protein hidrolizatı çözeltisi yerine 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.5) ilave edilip analiz yapılmıştır. Enzim kullanılmadan hazırlanan örnek ise kör örnek olarak kullanılmıştır. Örneklerin absorbansı 405 nm'de spektrofotometrede (Jasco, JAPONYA) ölçülmüştür. % inhibisyon denklem 3.13 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ lipaz inhibisyon aktivitesi} = \left(1 - \frac{A_0 - A_{bs}}{A_k - A_{bk}}\right) \times 100 \quad \text{..(3.13)}$$

A₀: örnek+enzim absorbansı

A_{bs}: kör örnek absorbansı

A_{bk}: enzimsiz ve örneksiz absorbans

A_k: kontrol örneğinin absorbansı

3.2.7. Balık Unu Proteini ve Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.7.1. Emülsifikasyon Aktivitesi ve Emülsiyon Stabilitesi Tayini

Hidrolizatların emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) Liu ve ark., (2018)'nin çalışmasında bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Dondurularak kurutulmuş hidrolizatlardan 10 mg/ml (%1) protein olacak şekilde PBS ile (0.01 M, pH 7.4) çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltilerden 30 ml alınıp üzerine 10 ml mısır yağı eklenmiştir. Karışımlar Ultra-Turrax homojenizasyon cihazı ile (Daihan HG-15A, KORE) 20.000 rpm'de 1 dk süre ile karıştırılmıştır. Karışımların alt kısmından 0. ve 15.

dakikalarda 50 µl alınıp 5 ml'ye %0.1'lik SDS çözeltisi ile seyreltilerek tüp karıştırıcı (Lab312, TÜRKİYE) ile iyice karıştırılmıştır. Daha sonra 500 nm dalga boyunda UV-Vis Spektrofotometre (Jasco, JAPONYA) ile absorbanları ölçülmüştür. EAI ve ESI sırasıyla denklem 3.14 ve 3.15 ile hesaplanmıştır.

$$EAI (m^2/g) = (2 \times 2,303 \times A_0 \times D) / C \times \Phi \quad ..(3.14)$$

$$ESI (dk) = A_{10} \times \Delta t / \Delta A_0 \quad ..(3.15)$$

A_0 : 500 nm dalga boyunda 0. dakikadaki absorban

A_{10} : 500 nm dalga boyunda 10. dakikadaki absorban

Φ : Emülsiyondaki yağ hacmi (0.25)

D: Seyreltme faktörü (100)

C: Proteinin başlangıç konsantrasyonu (g/ml)

Δt : 10 dk

ΔA : $A_0 - A_{10}$

3.2.7.2. Köpük Oluşturma Kapasitesi ve Stabilitesi Tayini

Köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi tayini Tekle ve ark., (2022)'nin çalışmasında bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Dondurularak kurutulmuş hidrolizatlardan % 0.5 a/h oranında saf su ile hazırlanan karışımlardan ölçülü bir behere 50 ml alınıp Ultra-Turrax cihazı ile (Daihan HG-15A, KORE) 16.000 rpm'de 1 dk süre ile homojenize edilmiştir. Köpük hacimleri 0. ve 10. dakikalarda ölçülmüştür. Köpük oluşturma kapasitesi 0. dakikada meydana gelen köpük genişlemesini belirtirken, köpük stabilitesi ise 10. dakikada oluşan köpük genişlemesini ifade eder. Köpük genişmesi denklem 3.16 ile hesaplanmıştır.

$$Köpük Genleşmesi(\%) = ((A - B)/B) \times 100 \quad ..(3.16)$$

A: Farklı zamanlarda ölçülen hacim (ml)

B: Homojenizasyondan önce ölçülen hacim (ml)

3.2.7.3. Yağ Bağlama Kapasitesi Tayini

Yağ bağlama kapasitesi tayini Noman ve ark. (2018)'nın çalışmasında kullanılan metotta bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. Buna göre, 0.5 g hidrolizat santrifüj tüpüne alınıp üzerine 10 g mısır yağı eklenmiştir. Daha sonra tüpler 60 sn vorteksde (Lab312, TÜRKİYE) karıştırılmış ardından 4000 rpm'de 30 dk santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-10, ABD) edilmiştir. Süpernatant alınıp kalıntı tartılmış ve yağ bağlama kapasitesi denklem 3.17'ye göre hesaplanmıştır.

$$\text{Yağ Bağlama Kapasitesi (g yağ/g hidrolizat)} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \quad ..(3.17)$$

W_0 : hidrolizatın ağırlığı (g)

W_1 : hidrolizat + santrifüj tüpünün ağırlığı (g)

W_2 : santrifüj sonrası kalıntı + santrifüj tüpünün ağırlığı (g)

3.2.7.4. Su Tutma Kapasitesi Tayini

Protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesi, santrifüj metodu ile Noman ve arkadaşlarının (2018) kullandıkları yöntemde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. 50 ml'lik santrifüj tüpüne 0.5 g hidrolizat ve 10 ml distile su eklenmiş, 60 sn vorteksde karıştırılmıştır. Karışımlar oda sıcaklığında 6 sa bekletildikten sonra 4000 rpm'de 30 dk santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-10, ABD) edilmiştir. Süpernatant alınıp kalıntı tartılmış ve su tutma kapasitesi denklem 3.18 ile hesaplanmıştır.

$$\text{Su Tutma Kapasitesi (g su/g hidrolizat)} = \frac{W_2 - W_1}{W_0} \quad ..(3.18)$$

W_0 : hidrolizatın ağırlığı (g)

W_1 : hidrolizat + santrifüj tüpünün ağırlığı (g)

W_2 : santrifüj sonrası kalıntı + santrifüj tüpünün ağırlığı (g)

3.2.8. Balık Unu Hidrolizatlarının Biyoaktif ve Fonksiyonel Özelliklerinin Optimizasyonu

Balık unu hidrolizatlarının biyoaktif ve fonksiyonel özelliklerinin optimizasyonu Design Expert 7.0 yazılımının nümerik optimizasyon yöntemi ile yapılmıştır (Myers ve ark., 2016). Yöntemin temelini arzu edilebilirlik fonksiyonu oluşturmaktadır. Arzu edilebilirlik fonksiyonu 0 ile 1 arasındaki değerlerden oluşan amaç fonksiyonudur.

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmada tüm analizler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak rapor edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin, bağımlı değişkenler üzerine etkisini belirlemede ve varyans analizi için Design Expert 7.0 yazılım programı kullanılmıştır (Myers ve ark., 2016). Varyans analizi sonucunda önemli bulunan farklılıklar SPSS 24.0 paket programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. p-değerinin $<0,05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Balık Ununun Besin Bileşimi

4.1.1. Balık Ununun Besin Öğeleri ve Enerji Değeri

Balık ununun besin bileşim tablosu Çizelge 4.1’de verilmiştir. Balık unu örneğinin % nem, yağ, kül, protein ve karbonhidrat içerikleri sırasıyla 8.81 ± 0.08 , 7.21 ± 0.09 , 24.58 ± 0.65 , 53.85 ± 1.24 ve 5.55 ± 1.04 olarak bulunmuştur. Enerji değeri ise 302.53 ± 1.86 kcal/100 g olarak hesaplanmıştır.

Dört farklı balık ununun besin bileşim içeriklerinin belirlendiği bir çalışmada % nem 4.10-8.10, % protein 70.37-73.4, % yağ 10.6-11.3 ve % kül 10.7-17.2 aralıklarında bulunmuştur (Aldemir ve ark., 2022). Ween ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada Norveç’te balık unlarının sırasıyla ortalama nem, protein, yağ ve kül değerlerini %5, %61.9, %8.9 ve %22.4 olarak bildirmişlerdir. Rahim ve ark. (2017), yaptıkları araştırmada balık unlarının protein içeriğini %50.51-61.26 aralığında, nem miktarını %6.87-12.57 aralığında, yağ ve kül içeriklerini ise %15.29-29.23 ve %12.32-18.32 olarak bulmuşlardır. Fernandes ve ark. (2019), iki farklı limpet eti homojenatlarında protein, yağ, karbonhidrat ve kül içeriklerini sırası ile % 48.22–64.09, %7.71-12.6, % 4.5-10.9 ve %11.12–23.12 aralıklarında belirlemişlerdir. Bayraklı (2019), hamsi ve çaça balık ununun besin bileşimlerini incelediğinde nem, protein, yağ ve kül değerlerini sırasıyla %7.78 ve 6.41, %72.56 ve 66.68, %8.12 ve 10.73, %10.75 ve 15.23 bulmuştur. Enerji değerleri ise 366.47 ve 367.11 kcal/100g olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda, balık unundaki besin bileşimlerindeki farklılıkların üretiminde kullanılan balık çeşidi, kullanılan balığın kısmı ve işleme tekniğinin farklı olmasından kaynaklanabilmektedir. Özellikle kül miktarındaki farklılıklar kemik içeren balık yan ürünlerinden kafa, kuyruk, yüzgeç ve iskelet kısımlarından kaynaklanmaktadır (Batista ve ark., 2010; De La Fuente ve ark., 2023). Uzzaman ve ark., (2018), tilapia balığının etinden elde ettikleri balık unlarının kül miktarını %3.06 olarak belirlemişlerdir. Düşük kül miktarının nedeni balık unu eldesinde kemiklerin kullanılmaması olarak düşünülmektedir. Kurutma sıcaklığı, kurutma işleme yöntemi ve hammadde tazeliği balık ununda nem oranını etkilemektedir. Balık ununun yağ oranı dünya balık unu pazarında %5-10 aralığında olarak bildirilmiştir. Bu oran balığın türüne, hammadde tazeliğine ve pres işlemine göre değişim gösterebilmektedir (Moghaddam ve ark., 2007).

Çizelge 4.1. Balık ununun besin bileşimi

Nem (%)	Yağ (%)	Kül (%)	Protein (%)	Karbonhidrat (%)	Enerji değeri (kcal/100g)
8.81±0.08	7.21±0.09	24.58±0.65	53.85±1.24	5.55±1.04	302.53±1.86

4.1.2. Balık Ununun Element İçeriği

Tez çalışmasında kullanılan balık ununun belirlenen element bileşimlerinden kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, magnezyum, çinko, demir, silisyum, bakır, mangan değerleri, 65,600, 52,330, 11,092, 3,365, 871.5, 210.6, 117, 63.85, 59.95, 20 ppm olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Kalsiyum ve fosforun yüksek olmasının sebebi balık unu üretiminde kemik, pul gibi atıkların kullanıldığının bir göstergesidir.

Balıklarda toplam kalsiyumun %99'u kemiklerde, fosforun ise %80'i kemik ve pullarda bulunmaktadır. Magnezyum balıklarda kemiklerde, tüm organlarda, kas dokusunda ve hücre dışı sıvıda dağılmış olarak bulunmaktadır. Potasyum ise balıklarda dokularda bulunmaktadır (Koç, 2016). Görüldüğü gibi balık ununun mineral yoğunluğu oldukça yüksektir. Özellikle kalsiyum, fosfor ve sodyum içeriğinin oldukça yüksek bulunması balık unundan minerallerin saflaştırılması gerekliliğini göstermektedir. Çizelgede görüldüğü gibi kurşun, kadmiyum ve civa gibi ağır metaller tespit edilememiştir. Türk Gıda Kodeksi yemlerde istenmeyen maddeler hakkında tebliğe (2014/11) göre cıva, kadmiyum, kurşun ağır metallerinin balık ununda bulunma limitleri sırası ile 0.5, 10, 2 ppm olarak belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda bulunan ağır metal içerikleri tüketici açısından oldukça riskli bir durumdur. Deniz ürünlerinde bulunan ağır metal içeriklerinin temel kaynağı su kirliliğidir (Zhang ve ark., 2020).

Senapati ve ark., (2017), hint somonundan elde ettikleri balık ununun element içeriklerini incelediklerinde sırası ile kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, demir ve magnezyum değerlerini 32,670, 41,410, 12,180, 6,170, 360, 7,110 ppm olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar ile tez çalışmasının sonuçlarını kıyasladığımızda kalsiyum ve fosfor değerlerinin tezde kullanılan balık ununda daha yüksek olduğu görülmektedir. Ancak diğer element miktarları daha düşük bulunmuştur. Bunun sebebinin kullanılan balık türü ve/veya kullanılan balığın kısımlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.2. Balık ununun element içeriği (ppm)

Element	Miktarı (ppm)
Potasyum (K)	3,365
Magnezyum (Mg)	871.5
Mangan (Mn)	20
Demir (Fe)	117
Bakır (Cu)	59.95
Çinko (Zn)	210.6
Silisyum (Si)	63.85
Kurşun (Pb)	t.e.
Kadmiyum (Cd)	t.e.
Civa (Hg)	t.e.
Fosfor (P)	52,330
Kalsiyum (Ca)	65,600
Sodyum (Na)	11,092

t.e.:Tespit edilememiştir.

4.2. Balık Ununun Toksin İçeriği

Balık ununun toplam aflatoksin (B1+B2+G1+G2), B1 ve okratoksin A miktarları sırasıyla 10.74 ± 0.08 , 3.76 ± 0.23 ve 1.12 ± 0.10 ppb olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3). Literatürde yüksek oranda toksin içeren yemler ile beslenen balıkların büyüme performanslarında dikkat çekici seviyede düşüş görüldüğü bildirilmiştir. Yemlerde istenmeyen maddeler hakkında tebliğe göre yemlerde aflatoksin B1 miktarı 2 ppm'i geçmemelidir (TGK, 2014/11). Yaroğlu ve Gül (2007), alabalık yemlerinde aflatoksin B1 varlığının araştırması ile ilgili yaptıkları çalışmada, toksin miktarının 7.2 ile 15.75 ppb aralığında olduğu bildirilmiş ve bu değerin sıcaklık ve nemin etkisi ile doğru orantılı şekilde arttığı raporlanmıştır.

Okratoksin A balık yemlerinde bulunan en önemli toksinlerden biridir. *Aspergillus ochraceus* ve *Penicillium viridicatum* olmak üzere çeşitli *Aspergillus* ve *Penicillium* türleri tarafından üretilmektedirler (Fadl ve ark., 2020). Türk Gıda Kodeksi'ne göre yemlerde okratoksin A için belirlenen maksimum 50 ppb'dir. Tezimizde kullanılan balık ununun bu limitin altında olduğu söylenebilir. Balıklarda yüksek oranda ölüm oranının okratoksin a içeren yemlerle beslenmeleri olduğu literatürde bildirilmiştir (Ekici, 2017). 1.6 ve 2.4 ppm okratoksin A içeren yemlerle beslenen balıkların büyüme hızlarında ve vücut ağırlıklarında kontrol grubuna göre fark olduğu bildirilmiştir (Baldissera ve ark., 2020).

Çizelge 4.3 Balık ununun toksin içeriği

Toksin Adı	Miktarı (ppb)
Toplam Aflatoksin ve Aflatoksin B1	10.74±0.08-3.76±0.23
Okratoksin A	1.12±0.10

4.3. Balık Unu Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Derecesi

Balık unu protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi değerleri %11.7±0.20 ile 16.8±0.5 aralıklarında bulunmuştur (Çizelge 4.4). % E/S ve hidroliz süresi arttıkça hidroliz derecesi artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininin hidroliz derecesi protein hidrolizatlarının hepsinden düşük bulunmuştur. Bu da protein hidrolizatlarının, hidroliz edilmemiş protein konsantresinden daha yüksek serbest amino grubu içerdiğini göstermektedir (Nielsen ve ark., 2001; Bilir ve ark., 2022). Protein hidrolizatı içerisinde bulunan serbest amino gruplarının yapıları, hidrolizatın biyoaktif özellikleri ve fonksiyonel özelliklerini doğrudan etkilemektedir (Li ve Yu, 2015). Çalışmamızın sonuçlarıyla benzer şekilde, somon balığı kafasından enzimatik hidroliz ile elde edilen protein hidrolizatlarının hidroliz dereceleri %11.5-17.3 aralığında bulunmuş ve E/S oranı arttıkça arttığı bildirilmiştir (Gbogouri ve ark., 2004). Sonuçlarımızla uyumlu olarak, sarı yüzgeçli ton balığı kafasından (Ovissipour ve ark., 2010), şerit balığı (Yathisha ve ark., 2022) ve deniz salyangozu etinden (Bilir ve ark., 2022) elde edilen hidrolizatların hidroliz derecelerinin hidroliz süresi arttıkça arttığı bildirilmiştir. Ayrıca hidroliz derecesi değerlerinin de çalışmamızla uyumlu olduğu görülmüştür. Roslan ve ark., (2015), tilapia balığı atıklarından elde ettikleri hidrolizatların hidroliz derecesini %9-20.75 aralığında bulmuş ve E/S arttıkça hidroliz derecesi de artmıştır. Arise ve ark., (2016), karpuz çekirdeğinden farklı proteazlar kullanılarak elde ettikleri hidrolizatların hidroliz derecelerini % 13.2-26.3 aralığında bulmuşlardır.

Hidroliz derecesi, hidrolizatların biyoaktif ve fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir. Hidroliz derecesi arttıkça çözelti içinde protein çözünürlüğü de artacaktır ve bir gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirliğini arttıracaktır (Sheriff ve ark., 2014).

Çizelge 4.4. Balık unu protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi (%) değerleri

Deneme	E/S (%)	Hidroliz süresi (dk)	Hidroliz derecesi (%)
1	2.00	120.00	13.7±0.23 ^{d,e}
2	2.00	120.00	14.1±0.06 ^{c,d}
3	2.00	204.85	15.8±0.05 ^b
4	3.41	120.00	16.8±0.48 ^a
5	2.00	120.00	13.8±0.17 ^{c,d,e}
6	3.00	60.00	13.4±0.13 ^e
7	1.00	180.00	12.4±0.14 ^f
8	2.00	120.00	14.3±0.15 ^c
9	1.00	60.00	11.7±0.20 ^c
10	0.59	120.00	12.3±0.32 ^{f,g}
11	3.00	180.00	15.3±0.09 ^b
12	2.00	35.15	12.4±0.63 ^f
13	2.00	120.00	14.1±0.20 ^{c,d}
0*	0	0	4.8±0.44 ^h

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Yapılan ANOVA testine göre hidroliz derecesi üzerine E/S oranının (p<0.001) ve hidroliz süresinin pozitif lineer etkisinin (p<0.01) istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur. Bu lineer doğrunun R² değeri 0.83 olarak hesaplanmıştır.

Bağımsız değişkenlerin hidroliz derecesi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Hidroliz derecesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	19.62	2	9.81	23.90	0.0002**
E/S (%)	13.90	1	13.90	33.88	0.0002**
Süre (dk)	5.72	1	5.72	13.93	0.0039**
Kalıntı	4.10	10	0.41		
Uyum Eksikliği	3.56	6	0.59	4.39	0.0870
Hata	0.54	4	0.14		
Düzeltilmiş Toplam	23.72	12			

** : p<0.01, * : p<0.05

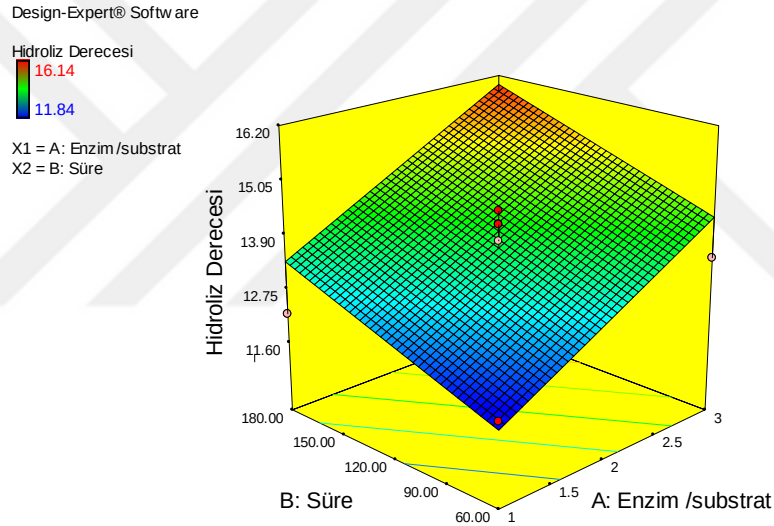
Hidroliz derecesinin pozitif lineer regresyon modelinin kodlanmış faktörler ve gerçek faktörler kullanılarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

$$\text{Hidroliz Derecesi} = +13.83 + 1.32(A) + 0.85(B)$$

$$\text{Hidroliz Derecesi} = +9.51 + 1.32(E/S) + 0.01(\text{Süre})$$

Burada; A:E/S oranı iken B: Hidroliz süresi (dk)

Yukarıdaki denklemlerde; E/S oranının hidroliz derecesi üzerine pozitif lineer etkisinin, hidroliz süresinin etkisinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Çalışmamız ile benzer olarak Mohanty ve ark. (2021) ve Nilsang ve ark. (2005), hidroliz derecesi üzerine E/S oranı ve hidroliz süresinin pozitif yönde lineer etkisinin var olduğunu bildirmişlerdir. Hidroliz derecesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik Şekil 4.1’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi bağımsız değişkenler arttıkça hidroliz derecesi de lineer olarak artmıştır. Benzer şekilde, Sandoval-Gallardo ve ark., (2020), sardalya balığından alkalaz enzimi ile elde ettikleri hidrolizatların hidroliz derecelerinin enzim konsantrasyonun artması ile arttığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.1. Hidroliz derecesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik

4.4. Balık Unu Protein Hidrolizatlarının Çözünür Protein Miktarı

Balık unu protein hidrolizatlarının çözünür protein miktarları 24.7 ± 1.6 ile 28.5 ± 0.6 aralığında bulunmuştur (Çizelge 4.6). % E/S ve hidroliz süresi arttıkça çözünür protein miktarı artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininin çözünür protein miktarı protein hidrolizatlarının hepsinden düşük bulunmuştur. Hidroliz başladığında, enzim hızlı bir şekilde çözünmeyen protein partikülleri ile etkileşime girer, böylece yüzeye gevşek bir şekilde bağlı polipeptit zincirleri hidrolize uğrar. Enzimler, hidrofobik/hidrofilik amino

asitleri içerebilecek proteinler olduğundan, polipeptit zincirleri ile etkileşime girerek enzim-polipeptit kompleksleri oluşturabilirler. Böylelikle proteinlerin çözünürlüğünün arttığı düşünülmektedir (Zhao ve ark., 2012; Idowu ve ark., 2019). Ayrıca hidroliz sonunda proteinin ortalama moleküler ağırlıkları azalır ve iyonlaştırılabilir gruplar serbest kalarak çözünürlük artar (Wouters ve ark., 2016).

Çizelge 4.6. Balık unu protein hidrolizatlarının çözünür protein değerleri

Deneme	E/S (%)	Hidroliz süresi (dk)	Çözünür protein (%)
1	2.00	120.00	26.3±0.8 ^d
2	2.00	120.00	26.5±1.4 ^{d,e}
3	2.00	204.85	27.9±1.1 ^{e,f}
4	3.41	120.00	28.5±0.6 ^{g,h}
5	2.00	120.00	26.6±0.9 ^{d,e}
6	3.00	60.00	25.7±1.3 ^{b,c}
7	1.00	180.00	25.0±0.7 ^{c,d}
8	2.00	120.00	25.5±1.5 ^{b,c}
9	1.00	60.00	24.6±1.3 ^{b,c}
10	0.59	120.00	24.7±1.6 ^b
11	3.00	180.00	28.2±0.4 ^{g,h}
12	2.00	35.15	25.6±1.2 ^{b,c}
13	2.00	120.00	27.0±0.8 ^{f,g}
0*	0	0	20.8±0.7 ^a

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Bağımsız değişkenlerin çözünür protein miktarı üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir. Yapılan ANOVA testine göre çözünür protein miktarı üzerine E/S oranının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuş ve lineer olarak arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Buna ek olarak, hidroliz süresinin artması ile çözünür protein miktarı artmıştır ancak bu artış önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Çalışmamızın sonuçlarıyla benzer şekilde Gbogouri ve ark., (2004) E/S oranı arttıkça protein çözünürlüğünün arttığını bildirmişlerdir. Mune Mune ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada hidroliz derecesinin %0-20 aralığında artması ile çözünebilir protein miktarının arttığını bildirmişlerdir.

Enzimatik hidroliz sonucu protein çözünürlüğü arttıkça protein geri kazanımı da artmaktadır. Çünkü enzimatik hidroliz sonucu yapılan santifüj işlemi ile çözünmeyen kısımlar atılmaktadır (Ovissipour ve ark., 2009). Ayrıca protein hidrolizatlarındaki çözünebilir protein miktarının yüksek olması, biyoaktif özelliklerini de arttırmakta

dolayısıyla gıda katkı maddesi olarak kullanılabilirliğini de arttırmaktadır (Sheriff ve ark., 2014).

Çizelge 4.7. Çözünür protein miktarı üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	10.67	2	5.34	8.16	0.0079**
E/S (%)	9.28	1	9.28	14.18	0.0037**
Süre (dk)	1.40	1	1.40	2.13	0.1747
Kalıntı	6.54	10	0.65		
Uyum Eksikliği	5.87	6	5.82	0.055	0.0870
Hata	0.67	4	0.17		
Düzeltilmiş Toplam	17.22	12			

**,: p<0.01, *: p<0.05

Ayrıca lineer regresyon modelinin kodlanmış faktörler ve gerçek faktörler kullanılarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

$$\text{Çözünür protein miktarı} = +26.58 + 1.08(A) + 0.42(B)$$

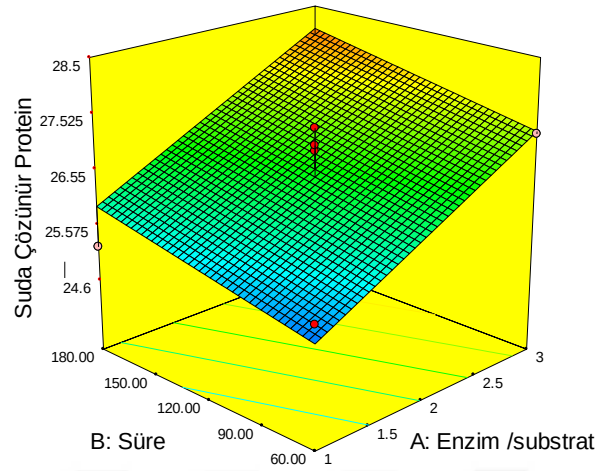
$$\text{Çözünür protein miktarı} = +23.59 + 1.07(E/S) + 6.96E - 003(\text{Süre})$$

Burada; A:E/S oranı iken B: Hidroliz süresi (dk)

Yukarıdaki denklemlerde; E/S oranının çözünür protein miktarı üzerine pozitif lineer etkisi, hidroliz süresinin etkisinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Çözünür protein miktarı üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik Şekil 4.2’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi bağımsız değişkenler arttıkça çözünür protein miktarı da lineer olarak artmıştır.

Design-Expert® Software

Suda Çözünür Protein
28.5
24.6
X1 = A: Enzim /substrat
X2 = B: Süre



Şekil 4.2. Çözünür protein miktarı üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik

4.5. Balık Unu Protein Hidrolizatının Protein Miktarı

Balık unu protein hidrolizatlarının protein miktarları (%) Çizelge 4.8’de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi hidrolizatların protein miktarları 80.5 ± 0.40 ile 86.7 ± 0.6 aralığında bulunmuştur. % E/S ve hidroliz süresi arttıkça protein miktarı artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininin protein miktarı, protein hidrolizatlarının hepsinden düşük bulunmuştur. Protein hidrolizatlarının yüksek protein içerikleri, hidrolizatın saflaştırılmasının bir ölçütü sayılmaktadır (Thuy ve ark., 2015). Hidrolizatların protein içeriği arttığında aminoasit içerikleri de artmakta ve katkı maddesi olarak kullanıldıklarında gıdanın besin içeriğini zenginleştirebilirler (Wisuthiphaet ve ark., 2016). Sonuçlarımız ile benzer şekilde; Slizyte ve ark. (2016), somon omurgasından elde edilen protein hidrolizatların protein miktarlarını $73.8-85.8$ olarak bildirmişlerdir. Meldstad (2015), balık atıklarından elde ettiği protein hidrolizatlarının protein miktarını 88.4 olarak bulmuştur. Idowu ve ark., (2019), somon balığı iskeletinden elde ettikleri protein hidrolizatlarının protein miktarlarının $79-82$ arasında bulmuşlardır. Koç, (2016), balık atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının protein içeriklerini 55.6 ve 81.2 olarak bulmuşlardır. Bu farklılığın sebebi, hidrolizatın üretiminde kullanılan hammaddenin farklı olması ile açıklanmaktadır. Liceaga-Gesualdo ve ark., (1999) balık protein hidrolizatlarının protein

içeriğini %77 olarak bulmuştur. Ham maddeden bulunan yağ oranı arttıkça santrifüj aşamasında yağlarla interaksyona girmiş proteinler de bu kısım ile birlikte ayrılabilir ve protein miktarının düşmesine neden olabilir (Liceaga-Gesualdo ve ark., 1999; Slizyte ve ark, 2005).

Çizelge 4.8. Balık unu protein hidrolizatlarının protein miktarları

Deneme	E/S (%)	Hidroliz Süresi (dk)	Protein miktarı (%)
1	2.00	120.00	81.2 ±0.2 ^{c,d}
2	2.00	120.00	82.0 ±0.97 ^{c,d}
3	2.00	204.85	85.3 ±0.12 ^{a,b}
4	3.41	120.00	86.7±0.62 ^a
5	2.00	120.00	82.1±0.3 ^{c,d}
6	3.00	60.00	80.6 ±0.45 ^{d,e}
7	1.00	180.00	81.5±0.33 ^{c,d}
8	2.00	120.00	81.8±1.06 ^{c,d}
9	1.00	60.00	79.3±0.94 ^e
10	0.59	120.00	80.5 ±0.40 ^{d,e}
11	3.00	180.00	84.6±0.48 ^b
12	2.00	35.15	82.6±0.17 ^c
13	2.00	120.00	84.5±1.32 ^b
0*	0	0	70.4±1.21 ^f

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Yapılan ANOVA testine göre protein miktarı üzerine E/S oranının (p<0.01) ve hidroliz süresinin etkisinin (p<0.01) istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuş ve lineer olarak arttığı belirlenmiştir. Bu lineer doğrunun R² değeri 0.62 olarak hesaplanmıştır.

Bağımsız değişkenlerin protein miktarı üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Lineer regresyon modelinin kodlanmış faktörler ve gerçek faktörler kullanılarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

$$\text{Protein \%} = +82.52 + 1.65 A + 1.25B$$

$$\text{Protein \%} = +76.72 + 1.65 (E/S) + 0.02 (\text{Süre})$$

Burada; A:E/S oranı iken B: Hidroliz süresi (dk)

Çizelge 4.9. Protein miktarı üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	34.22	2	17.11	8.10	0.0081**
E/S (%)	21.67	1	21.67	10.26	0.0094**
Süre (dk)	12.55	1	12.55	5.94	0.035*
Kalıntı	21.12	10	2.11		
Uyum Eksikliği	14.69	6	2.45	1.52	0.3561
Hata	6.43	4	1.61		
Düzeltilmiş Toplam	55.34	12			

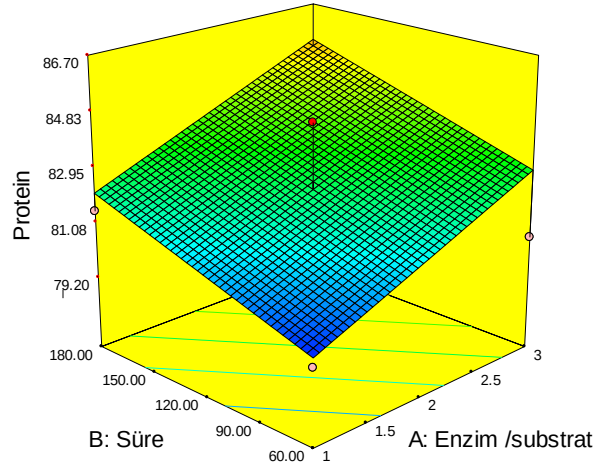
** : p<0.01, * : p<0.05

Yukarıdaki denklemlerde; E/S oranının protein miktarı üzerine pozitif lineer etkisinin, hidroliz süresinin etkisinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Sonuçlarımız ile benzer şekilde, Silva ve ark. (2014), tilapia balığından farklı enzim konsantrasyonları kullanarak elde ettikleri hidrolizatların protein miktarının enzim konsantrasyonu arttıkça arttığını bildirmişlerdir. Protein miktarı üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik Şekil 4.3'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi bağımsız değişkenler arttıkça hidrolizatların protein miktarı da lineer olarak artmıştır.

Design-Expert® Software

Protein
86.7
79.3

X1 = A: Enzim/substrat
X2 = B: Süre



Şekil 4.3. Protein miktarı üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik

4.6. Balık Unu Proteini ve Hidrolizatlarının Biyoaktif Özellikleri

4.6.1. ACE İnhibisyon Aktivitesi (Antihipertansif Özellik)

Balık unu protein hidrolizatlarının ACE (%) inhibisyon aktivitesi değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi hidrolizatların ACE inhibisyon değerleri 23.7 ± 1.2 ile 66.7 ± 1.2 aralığında bulunmuştur. % E/S ve hidroliz süresi arttıkça ACE inhibisyon aktivitesi artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininde ise ACE inhibisyon aktivitesi tespit edilememiştir. Bunun sebebi ACE inhibitör aktiviteye sahip peptitlerin ana protein içerisinde gizli olduğu ancak enzimatik hidroliz ile ortaya çıktığı bilinmektedir (Nasri ve ark., 2013b). Enzimatik hidroliz ile enzimler proteinleri parçalayarak ACE inhibitör özelliğe sahip peptitlerin oluşumuna sebep olmaktadır (Wali ve ark., 2017). Ayrıca hidroliz ile oluşan düşük molekül ağırlığına sahip peptitlerin daha yüksek ACE inhibisyon özelliği gösterdiği bilinmektedir (Gu ve ark., 2011; Li-Chan, 2015; Lee ve Hur, 2017; Auwal ve ark., 2019). Kısa zincirli peptitlerin bağırsaktan daha hızlı emilerek yüksek biyoyararlılık gösterdiği yapılmış çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Koopman ve ark., 2009; Khiari ve ark., 2014). Kısa zincirli peptitler bağırsak duvarından kolayca geçip ACE'nin aktif bölgesine bağlanarak inhibisyonunun gerçekleşmesini sağlarlar (Lee ve Hur, 2017). Bilir ve ark., (2021), yaptıkları çalışmada limpet protein hidrolizatının ACE inhibisyon değerleri 240 dk sonra 41.24 olarak bulmuşlardır.

ACE inhibitörlerinin hipertansiyonu engelleyerek kardiyovasküler hastalıkları önlediği bilinmektedir (Kannan ve ark., 2012). Bu sonuçlara göre balık unu protein hidrolizatları, enzimatik hidroliz sayesinde ACE inhibisyonuna sahip hidrolizat kaynağı olarak bulunmuştur. Fonksiyonel gıdalarda katkı maddesi olarak hipertansiyonun önlenmesinde kullanılabilirler (Dhanabalan ve ark., 2017).

Yapılan ANOVA testine göre ACE inhibisyon aktivitesi üzerine E/S oranının ($p < 0.005$) ve hidroliz süresinin etkisinin ($p < 0.05$) istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuş ve lineer olarak arttığı belirlenmiştir. Bu lineer doğrunun R^2 değeri 0.87 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. Balık unu protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon aktivite değerleri

Deneme	E/S (%)	Hidroliz Süresi (dk)	ACE inhibisyon (%)
1	2.00	120.00	46.7±1.25 ^c
2	2.00	120.00	46.3±1.7 ^c
3	2.00	204.85	57.3±0.94 ^b
4	3.41	120.00	66.7±1.25 ^a
5	2.00	120.00	45.7±0.47 ^c
6	3.00	60.00	38.7±0.94 ^d
7	1.00	180.00	29.7±2.05 ^e
8	2.00	120.00	48.0±1.63 ^c
9	1.00	60.00	23.7±1.25 ^f
10	0.59	120.00	26.0±0.82 ^f
11	3.00	180.00	59.0±0.82 ^b
12	2.00	35.15	31.7±1.25 ^e
13	2.00	120.00	45.7±1.70 ^c
0*	0	0	t.e.

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; t.e.:Tespit edilememiştir; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Bağımsız değişkenlerin ACE inhibisyonunun üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. ACE inhibisyonunun üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	725.76	2	362.88	34.45	< 0.0001**
E/S (%)	530.58	1	530.58	50.37	< 0.0001**
Süre (dk)	195.17	1	195.17	18.53	0.0016**
Kalıntı	105.33	10	10.53		
Uyum Eksikliği	75.46	6	12.58	1.68	0.3195
Hata	29.87	4	7.47		
Düzeltilmiş Toplam	831.09	12			

**.: p<0.01, *: p<0.05

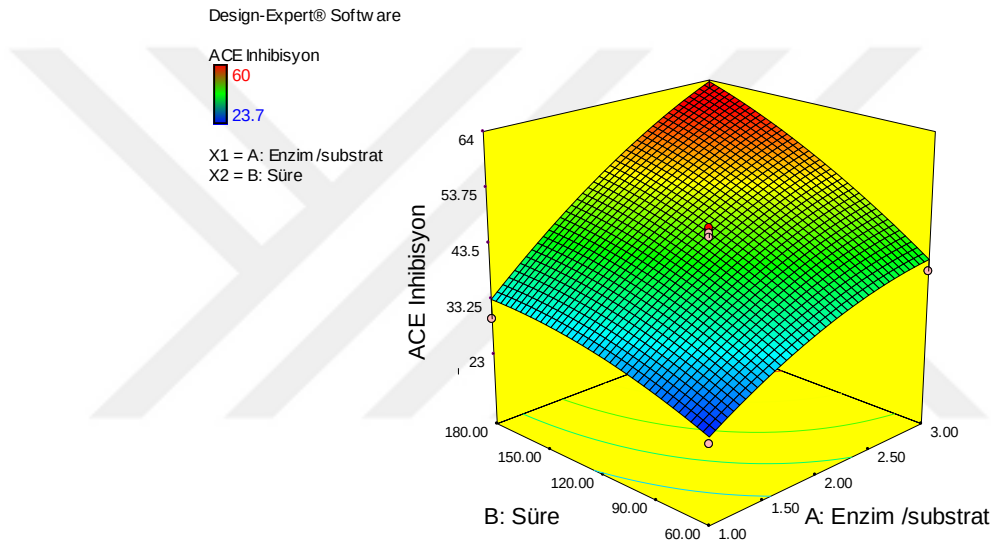
Ayrıca lineer regresyon modelinin kodlanmış faktörler ve gerçek faktörler kullanılarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

$$\text{ACE (\%)} \text{ inhibisyon} = +44.23 + 8.14 A + 4.94 B$$

$$\text{ACE (\%)} \text{ inhibisyon} = +18.06 + 8.14 (E/S) + 0.08 (\text{Süre})$$

Burada; A:E/S oranı iken B: Hidroliz süresi (dk)

Yukarıdaki denklemlerden görüldüğü üzere ACE inhibisyon aktivitesi üzerine en fazla etkiyi E/S oranı yaparken, her iki değişkeninin de artması ile oluşan protein hidrolizatının ACE inhibisyon aktivitesi artmaktadır. Deniz kaynaklı balık protein hidrolizatları ile yapılan çalışmalarda çalışmamızla uyumlu olarak hidroliz süresi ve/veya E/S oranı arttıkça ACE inhibisyon aktivitesi de artmıştır. (Dhanabalan ve ark., 2017; Bilir ve ark., 2022). ACE inhibisyonu üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik Şekil 4.4'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi bağımsız değişkenler arttıkça ACE inhibisyon aktivitesi de lineer olarak artmıştır.



Şekil 4.4. ACE inhibisyonunun üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik

Proteinin parçalanmasının bir göstergesi olan hidroliz derecesi, proteinin kaynağı, enzimin spesifikliğı ve hidroliz koşulları (pH, sıcaklık, E/S oranı, süre) ile birlikte ACE inhibisyon özelliğı üzerinde de oldukça etkili olmaktadır (García-Moreno ve ark., 2015).

4.6.2. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) Radikali Temizleme Aktivitesi

Balık unu protein hidrolizatlarının DPPH radikali temizleme aktivite değeri 22.4±0.78 ile 72.8±0.3 aralıklarında bulunmuştur (Çizelge 4.12). % E/S ve hidroliz süresi arttıkça DPPH radikali temizleme aktivitesi artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.01). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininin DPPH radikali

temizleme aktivitesi protein hidrolizatlarının hepsinden düşük bulunmuştur. Bu da protein hidrolizatlarının, hidroliz edilmemiş protein konsantresinden daha yüksek serbest amino grubu içerdiğini göstermektedir (Nielsen ve ark., 2001; Bilir ve ark., 2022). Protein hidrolizatı içerisinde bulunan serbest amino gruplarının fazla olması, ortamda bulunan serbest radikaller karşısında hidrojen atomu vererek zincir reaksiyonun sona ermesine olanak tanıyabilir. (Idowu ve ark., 2019). García-Moreno ve ark. (2014), balık atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarında DPPH radikali temizleme aktivitelerini %40-45 arasında bulmuştur. Tekle (2022), ve Zamorano-Apodaca ve ark. (2020), tarafından yapılan farklı çalışmalarda ise sonuçlarımızla benzer şekilde balık protein hidrolizatlarının DPPH radikali temizleme aktiviteleri sırası ile %67.3 ve %66 olarak bulunmuştur. DPPH radikali temizleme aktivite değeri arttıkça antioksidan aktivitenin de arttığı bilinmektedir (Yathisha ve ark., 2022).

Gıdalarda lipitlerin oksidasyonu, gıdanın bozulmasının temel nedenlerinden biridir. Çünkü oksidasyon sonucu gıdada ransidite artar ve raf ömrü kısalır. Ayrıca insan sağlığı için toksik olan bileşiklerin oluşmasına da sebep olur. Gıdalara katkı maddesi olarak antioksidan ilavesi bu sürecin önlenmesi için en sık kullanılan yöntemdir (Jamróz ve Kopel, 2020). DPPH radikali temizleme analizi antioksidan mekanizmasına dayalı olarak hem hidrojen atomu transferine hem de elektron transfer reaksiyonu altında sınıflandırılmaktadır. DPPH'deki azot atomunun tek elektronu, antioksidanlardan bir hidrojen atomu alarak hidrazine indirgenir (Idowu ve ark., 2019). Balık unundan elde edilen protein hidrolizatları serbest radikaller karşısında hidrojen atomu vererek zincir reaksiyonun sona ermesine olanak tanıyabilir. Bu hidrolizatların antioksidan olarak fonksiyonel gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımı önem taşımaktadır (Chalamaiah ve ark., 2013).

Çizelge 4.12. Balık unu protein hidrolizatlarının DPPH radikali temizleme aktivite değerleri

Deneme	E/S (%)	Hidroliz Süresi (dk)	DPPH radikali temizleme aktivitesi (%)
1	2.00	120.00	54.9±0.88 ^c
2	2.00	120.00	55.0±1.44 ^c
3	2.00	204.85	65.7±0.21 ^b
4	3.41	120.00	72.8±0.25 ^a
5	2.00	120.00	54.5±0.80 ^c
6	3.00	60.00	44.3±1.20 ^d
7	1.00	180.00	37.3±1.04 ^f
8	2.00	120.00	53.9±1.18 ^c
9	1.00	60.00	27.8±0.46 ^g
10	0.59	120.00	22.4±0.78 ^h
11	3.00	180.00	65.1±1.40 ^b
12	2.00	35.15	40.3±0.67 ^e
13	2.00	120.00	54.2±1.34 ^c
0*	0	0	9.9±0.8 ⁱ

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; t.e.:Tespit edilememiştir; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Bağımsız değişkenlerin DPPH radikali temizleme aktivitesi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.13'te verilmiştir.Yapılan ANOVA testine göre DPPH radikali temizleme aktivitesi üzerine E/S oranının (p<0.001) ve hidroliz süresinin etkisinin (p<0.01) istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur. Ancak E/S oranı ve hidroliz derecesinin ikili etkileşimi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p>0.05). Lineer doğrunun R² değeri 0.92 olarak hesaplanmıştır.

DPPH radikali temizleme aktivitesinin ikinci dereceden polinom denkleminin kodlanmış faktörler ve gerçek faktörler kullanılarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

DPPH radikali temizleme aktivitesi (%)

$$= +61.5 + 14.97 A + 9.62 B + 3.87 AB - 8.64 A^2 - 4.79 B^2$$

DPPH radikali temizleme aktivitesi (%)

$$= -25.9 + 41.8 (E/S) + 0.35 B + 0.06 (E/S \times \text{Süre}) - 8.64 (E/S)^2 - 1.33E003 (\text{Süre})$$

Burada; A:E/S oranı iken B: Hidroliz süresi (dk)

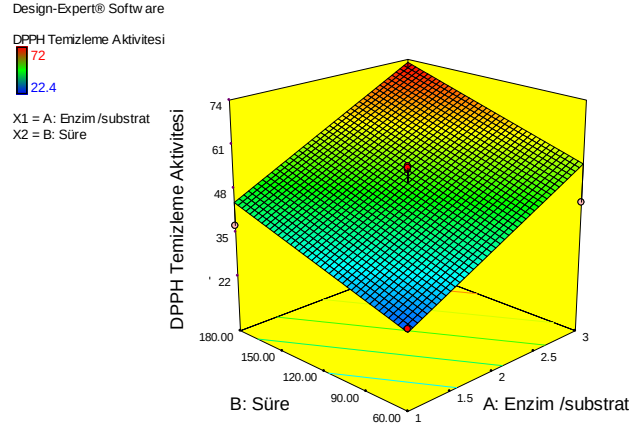
Yukarıdaki denklemlerden görüldüğü üzere DPPH radikalı temizleme aktivitesi üzerine E/S oranının hidroliz süresinden daha fazla etkiyi oluşturduğu görülmektedir. Bağımsız değişkenlerin DPPH radikalı temizleme aktivitesini pozitif yönde etkilediği görülmektedir. Hidroliz boyunca enzim spesifikliğine bağlı olarak küçük peptitler ve serbest amino asitler oluşmaktadır. Intarasirisawat ve ark. (2012), ve Chalamaiah ve ark. (2012), DPPH radikalı temizleme aktivitesinin enzim konsantrasyonu arttıkça arttığını bildirmişlerdir. DPPH radikalı temizleme aktivitesi hidroliz süresi ve enzim spesifikliğine bağlı olarak değişebilmektedir. Ayrıca düşük molekül ağırlığına sahip peptitler (1000-3000 Da) daha yüksek aktivite göstermektedirler (Chang ve ark., 2007).

Çizelge 4.13. DPPH radikalı temizleme aktivitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	3207.95	5	641.59	17.52	0.0008**
E/S (%)	1793.3	1	1793.3	48.96	0.0002**
Süre (dk)	739.71	1	739.71	20.19	0.0028*
E/S.Süre	60.06	1	60.06	1.64	0.2412
(E/S)²	519.75	1	519.75	14.19	0.0070**
(Süre)²	159.86	1	159.86	4.36	0.0751
Kalıntı	256.4	7	36.63		
Uyum Eksikliği	164.5	4	54.83	2.39	0.2098
Hata	91.9	4	22.98		
Düzeltilmiş Toplam	3464.35	12			

**: p<0.01, *: p<0.05

DPPH radikalı temizleme aktivitesinin üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik Şekil 4.5'te verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi bağımsız değişkenler arttıkça DPPH radikalı temizleme aktivitesi de artmıştır.



Şekil 4.5. DPPH radikalı temizleme aktivite üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik

4.6.3. Ferrik İyon İndirgeme (FRAP) Kapasitesi

Balık unu protein hidrolizatlarının FRAP değerleri 0.32 ± 0.01 ile 1.06 ± 0.06 μM TE/mg hidrolizat aralıklarında bulunmuştur (Çizelge 4.14). DPPH radikalı temizleme aktivitesini doğrular şekilde, % E/S ve hidroliz süresi arttıkça FRAP kapasitesi artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininin FRAP kapasitesi protein hidrolizatlarının hepsinden düşük bulunmuştur. Bu farklılık hidrolizatlar içerisinde bulunan peptitlerin elektron verme eğiliminden kaynaklanmış olabilir. Hidroliz sonucu oluşan düşük molekül ağırlığına sahip peptitler daha yüksek FRAP kapasiteye sahip olmaktadır. Daha düşük moleküler ağırlıklı hidrolizatların, daha fazla elektron bağışlayabilen yan zincirleri ortaya çıkaracağı ve Fe^{+3} -TPTZ kompleksi tarafından daha erişilebilir olacağı ve yüksek FRAP değerine sahip olacağı beklenmektedir (Wiriyaşan ve ark., 2015). Surimi üretiminden arta kalan balık atıklarından elde edilen protein hidrolizatının FRAP kapasite değeri çalışmamızla uyumlu bulunmuştur (Wiriyaşan ve ark., 2012).

Lipit oksidasyonu, gıda endüstrisi ve tüketiciler için büyük bir endişe kaynağıdır, çünkü istenmeyen kokuların ve tatların gelişimine ve potansiyel olarak toksik reaksiyon ürünlerinin oluşumuna yol açabilir (Centenaro ve ark., 2011). Yüksek FRAP kapasiteye sahip hidrolizatlar, serbest radikallere elektron vererek zincir reaksiyonun yayılmasını önlemede ve geciktirmede önemli rol oynamaktadır (Klomklao ve Benjakul, 2018). Böylelikle hem sağlık açısından hem de gıdanın bozulmasının gecikmesi bakımından antioksidan özelliğe sahip hidrolizatların kullanımının önemli olacağı düşünülmektedir.

Çizelge 4.14. Balık unu protein hidrolizatlarının FRAP değerleri

Deneme	E/S (%)	Hidroliz Süresi (dk)	FRAP Kapasitesi (μM TE/mg hidrolizat)
1	2.00	120.00	0.76±0.01 ^c
2	2.00	120.00	0.68±0.03 ^{d,e}
3	2.00	204.85	0.94±0.03 ^b
4	3.41	120.00	1.06±0.06 ^a
5	2.00	120.00	0.65±0.01 ^{c,d}
6	3.00	60.00	0.58±0.03 ^f
7	1.00	180.00	0.53±0.01 ^f
8	2.00	120.00	0.65±0.01 ^e
9	1.00	60.00	0.37±0.02 ^{g,h}
10	0.59	120.00	0.32±0.01 ^h
11	3.00	180.00	0.90±0.01 ^b
12	2.00	35.15	0.42±0.01 ^g
13	2.00	120.00	0.69±0.02 ^{d,e}
0*	0	0	0,11±0,0 ⁱ

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; t.e.:Tespit edilememiştir; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Bağımsız değişkenlerin FRAP kapasitesi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.15'te verilmiştir. Yapılan ANOVA testine göre balık unu protein hidrolizatlarının FRAP değeri üzerine E/S oranının (p<0.001) ve hidroliz süresinin etkisinin (p<0.001) istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuş ve lineer olarak arttığı belirlenmiştir. Bu lineer doğrunun R² değeri 0.85 olarak hesaplanmıştır.

Ayrıca lineer regresyon modelinin kodlanmış faktörler ve gerçek faktörler kullanılarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

$$\text{FRAP } (\mu\text{M TE/mg hidrolizat}) = +0.63 + 0.16 A + 0.12 B$$

$$\text{FRAP } (\mu\text{M TE/mg hidrolizat}) = +0.07 + 0.157(\text{E/S}) + 2.02047\text{E} - 0.03 (\text{Süre})$$

Burada; A:E/S oranı iken B: Hidroliz süresi (dk)

Çizelge 4.15. FRAP kapasitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	0.31	2	0.16	28.42	<0.0001**
E/S (%)	0.20	1	0.20	35.56	0.0001**
Süre (dk)	0.12	1	0.12	21.28	0.0010**
Kalıntı	0.055	10	5.524E-003		
Uyum Eksikliği	0.047	6	7.854E-003	3.87	0.1056
Hata	8.120E-003	4	2.030E-003		
Düzeltilmiş Toplam	0.37	12			

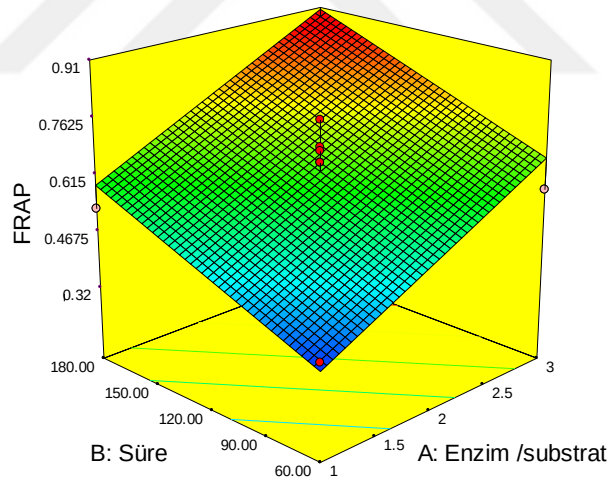
** : p<0.01, * : p<0.05

Denklemden görüldüğü gibi, FRAP kapasitesi üzerine en fazla etkiyi E/S oranı yaparken, her iki değişkeninin de artması ile oluşan protein hidrolizatının FRAP kapasitesi artmaktadır. Benzer şekilde Raghavan ve ark. (2008), Da Rocha ve ark. (2018), balık protein hidrolizatlarının FRAP değerlerinin hidroliz derecesinin artması ile arttığını bildirmişlerdir.

Design-Expert® Software

FRAP
0.86
0.32

X1 = A: Enzim /substrat
X2 = B: Süre



Şekil 4.6. FRAP aktivite üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik

4.6.4. α -Amilaz İnhibisyonu Aktivitesi (Antidiyabetik Özellik)

Balık unu protein hidrolizatlarının α -amilaz inhibisyonu aktivitesi 23.5 ± 1.6 ile 36.3 ± 0.4 aralıklarında bulunmuştur (Çizelge 4.16). % E/S ve hidroliz süresi arttıkça α -amilaz inhibisyonu aktivitesi önce artmış daha sonra düşmeye başlamıştır. Bunun

sebebinin hidrolizin ilerlemesi ile inhibisyon özelliğe sahip aktif peptitlerin parçalanmış olabileceği düşünülmektedir (Yuan ve ark., 2018). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininin α -amilaz inhibisyonu aktivitesi protein hidrolizatlarının hepsinden düşük bulunmuştur. Enzimatik hidroliz sırasında proteinin yapısında α -amilaz inhibisyonu aktivitesine sahip peptitlerin serbest kaldığı düşünülmektedir. Yuan ve ark., (2018), karides kabuğundan elde ettikleri protein hidrolizatlarının α -amilaz inhibisyon aktivitesini ölçtüklerinde çalışmamızla benzer olarak hidroliz süresince inhibisyon oranının önce arttığını daha sonra düşüşe geçtiğini bildirmişlerdir. Bu araştırma ile benzer şekilde De Matos ve ark., (2022), siyah cırcır böceğinin hidroliz edilmemiş protein izolatında en düşük α -amilaz inhibisyonu aktivitesi tespit etmişlerdir. Ancak aynı çalışmada bulunan % α -amilaz inhibisyon değeri %55, çalışmamızda elde ettiğimizden daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç ham maddenin ve kullanılan enzimin farklı olmasına bağlanabilir.

Çizelge 4.16. Balık unu protein hidrolizatlarının α -amilaz inhibisyonu aktivitesi değerleri

Deneme	E/S (%)	Hidroliz Süresi (dk)	α -Amilaz inhibisyonu (%)
1	2.00	120.00	36.3 $\pm$ 0.43 ^a
2	2.00	120.00	34.5 $\pm$ 0.98 ^{b,c}
3	2.00	204.85	31.1 $\pm$ 0.61 ^d
4	3.41	120.00	30.6 $\pm$ 0.45 ^{d,e}
5	2.00	120.00	35.1 $\pm$ 0.83 ^{a,b,c}
6	3.00	60.00	28.5 $\pm$ 0.66 ^{f,g}
7	1.00	180.00	27.5 $\pm$ 0.90 ^g
8	2.00	120.00	35.0 $\pm$ 1.97 ^{a,b,c}
9	1.00	60.00	23.5 $\pm$ 1.56 ^h
10	0.59	120.00	28.1 $\pm$ 0.54 ^{f,g}
11	3.00	180.00	33.7 $\pm$ 0.36 ^c
12	2.00	35.15	29.3 $\pm$ 0.61 ^{b,c}
13	2.00	120.00	35.9 $\pm$ 0.57 ^{a,b}
0*	0	0	t.e.

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; t.e.:Tespit edilememiştir; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Bağımsız değişkenlerin α -amilaz inhibisyonu aktivitesi üzerine etkisine ait ANOVA varyans analizi sonuçları Çizelge 4.17’de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi α -amilaz inhibisyonu aktivitesi üzerine E/S oranının etkisi (p<0.001) istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur. Hidroliz süresinin etkisi ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (p>0.05). Lineer doğrunun R² değeri 0.88 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.17. α -amilaz inhibisyonu üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	160.81	5	32.16	10.39	0.0039**
E/S (%)	27.14	1	27.14	8.77	0.0211*
Süre (dk)	17.24	1	17.24	5.57	0.0503
E/S.Süre	0.36	1	0.36	0.12	0.7431
(E/S)²	74.56	1	74.56	24.09	0.0017**
(Süre)²	56.45	1	56.45	18.24	0.0037**
Kalıntı	21.66	7	3.09		
Uyum Eksikliği	17.23	3	5.74	5.18	0.0729
Hata	4.43	4	1.11		
Düzeltilmiş Toplam	182.47	12			

**.: p<0.01, *: p<0.05

α -amilaz inhibisyonu aktivitesinin ikinci dereceden polinom denklemin kodlanmış faktörler ve gerçek faktörler kullanılarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

α – amilaz inhibisyon aktivitesi (%)

$$= +35.16 + 1.84 A + 1.47 B + 0.30 AB - 3.27 A^2 - 2.85 B^2$$

α – amilaz inhibisyon aktivitesi (%)

$$= +5,25 + 14.33 (E/S) + 0.2 (Süre) + 5.000000E - 003 (E/S \times Süre) - 3.27(E/S)^2 - 7.91319E - 004 (Süre)^2$$

Burada; A:E/S oranı iken B: Hidroliz süresi (dk)

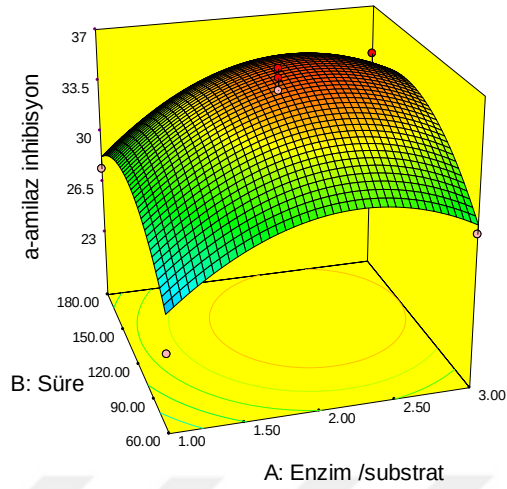
Yukarıdaki denklemlerden görüldüğü üzere α -amilaz inhibisyonu aktivitesi üzerine E/S oranının hidroliz süresinden daha fazla etkiyi oluşturduğu görülmektedir. E/S oranının ve hidroliz süresinin etkisi ve ikili etkileşimlerinin artması, α -amilaz inhibisyonu aktivitesini önce arttırmış daha sonra düşüşe neden olmuştur (Şekil 4.7).

Design-Expert® Software

α -amilaz inhibisyon

36.5
23.5

X1 = A: Enzim /substrat
X2 = B: Süre



Şekil 4.7. α -amilaz inhibisyon aktivitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik

4.6.5. Pankreatik Lipaz İnhibisyon Aktivitesi (Antiobezidik Özellik)

Balık unu protein hidrolizatlarının pankreatik lipaz inhibisyonu aktivitesi $\%13.2 \pm 0.67$ - 26.6 ± 0.94 aralıklarında bulunmuştur (Çizelge 4.18). %E/S ve hidroliz süresi arttıkça pankreatik lipaz inhibisyonu artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininde pankreatik lipaz inhibisyonu tespit edilememiştir. Pankreatik lipaz inhibitör peptitlerinin çoğunluğunda hidrofobik peptitler olan lösin, glisin, alanin, prolin, fenilalanin ve tirozin olduğu görülmüştür. Bu inhibitör peptitlerin hidrofobik özelliği, çözünebilen küresel bir protein olan pankreatik lipaza bağlanıp onu inhibe etme potansiyellerini arttırmaktadır (Wan ve ark., 2023). Enzimatik hidroliz ile bu inhibitör peptitlerin aktif hale gelip hidrolizatların inhibisyon özelliğini geliştirdikleri düşünülmektedir. Liu ve ark., (2013), tarafından yapılmış bir çalışmada, sazan balığı etinden elde edilen protein hidrolizatlarının pankreatik lipaz inhibisyonları çalışmamız ile benzer hidroliz süresinde benzer % inhibisyon değerleri elde edilmiştir.

Pankreatik lipaz besinlerdeki trigliseritlerin bağırsaklarda sindirilmesinden sorumlu en önemli enzimdir. Pankreatik lipazın inhibe edilmesi, obezitenin engellenmesi/tedavi edilmesinde anahtar yaklaşımlardan biridir (Liu ve ark., 2013). Pankreatik lipazın inhibe edilmesi yağın ince bağırsaktan emiliminin veriminde bir azalmaya neden olur.

Böylelikle emilemeyen trigliserit vücuttan atılarak aşırı kalori alımının önüne geçilebilir (Chia ve ark., 2023; Yathisha ve ark., 2023). Balık unundan elde edilen protein hidrolizatları obez bireylere yönelik fonksiyonel gıdaların geliştirilmesinde kullanılabilecektir.

Çizelge 4.18. Balık unu protein hidrolizatlarının pankreatik lipaz inhibisyon aktivitesi

Deneme	E/S (%)	Hidroliz Süresi (dk)	Pankreatik lipaz inhibisyon (%)
1	2.00	120.00	18.8±0.45 ^{d,e,f}
2	2.00	120.00	17.6±0.52 ^{e,f,g}
3	2.00	204.85	21.9±1.33 ^{b,c}
4	3.41	120.00	23.2±0.77 ^b
5	2.00	120.00	17.4±0.33 ^{e,f,g}
6	3.00	60.00	18.6±0.50 ^{d,e,f}
7	1.00	180.00	16.5±0.71 ^{g,h}
8	2.00	120.00	20.4±0.91 ^{c,d}
9	1.00	60.00	13.2±0.67 ⁱ
10	0.59	120.00	15.5±0.65 ^h
11	3.00	180.00	26.6±0.94 ^a
12	2.00	35.15	17.1±1.26 ^{f,g,h}
13	2.00	120.00	19.1±1.28 ^{d,e}
0*	0	0	t.e.

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; t.e.:Tespit edilememiştir; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

Bağımsız değişkenlerin lipaz inhibisyonu aktivitesi üzerine etkisine ait ANOVA varyans analizi sonuçları Çizelge 4.19’da verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi lipaz inhibisyonu aktivitesi üzerine E/S oranının ve hidroliz süresinin etkisini istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (p<0.0001). Lineer doğrunun R² değeri 0.87 olarak hesaplanmıştır. Protein hidrolizatlarının pankreatik lipaz inhibisyon aktivitelerinin incelendiği çalışmalarda, enzim inhibisyonu hidroliz süresi arttıkça artmıştır (Liu ve ark., 2013; Xiang ve ark., 2020).

Pankreatik lipaz inhibisyonu aktivitesinin pozitif lineer regresyon modelinin kodlanmış faktörler ve gerçek faktörler kullanılarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

$$\text{lipaz inhibisyon aktivitesi (\%)} = +18.92 + 3.30 A + 2.26 B$$

$$\text{lipaz inhibisyon aktivitesi (\%)} = +7.79 + 3.29 (E/S) + 0.03 (\text{Süre})$$

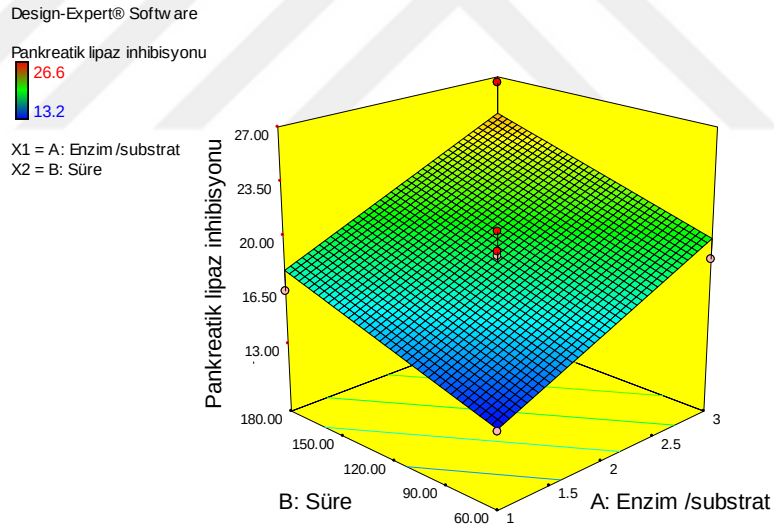
Burada; A:E/S oranı iken B: Hidroliz süresi (dk)

Çizelge 4.19. Pankreatik lipaz inhibisyonu üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	127.95	2	63.97	35.13	<0.0001**
E/S (%)	87.05	1	87.05	47.81	<0.0001**
Süre (dk)	40.90	1	40.90	22.46	0.0008**
Kalıntı	18.21	10	1.82		
Uyum Eksikliği	12.26	6	2.04	1.27	0.3959
Hata	5.95	4	1.49		
Düzeltilmiş Toplam	146.16	12			

**.: p<0.01, *: p<0.05

E/S oranının ve hidroliz süresinin etkisinin artması ile pankreatik lipaz inhibisyonu aktivitesi lineer olarak artmıştır (Şekil 4.8). Enzimatik hidroliz sonucu oluşan düşük molekül ağırlığına sahip peptitlerin daha yüksek pankreatik lipaz inhibisyonu sergiledikleri bildirilmiştir (González-Noriega ve ark., 2022).



Şekil 4.8. Pankreatik lipaz inhibisyonu üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik

4.7. Balık Unu Protein Hidrolizatlarının Biyoaktif Özelliklerinin Optimizasyonu

Biyoaktif özelliklerin optimizasyonunda bağımsız değişkenlerin aralığında (E/S oranı ve hidroliz süresi) hidroliz derecesi, suda çözünen protein, ACE inhibisyon aktivitesi, α -amilaz inhibisyon aktivitesi, pankreatik lipaz inhibisyon aktivitesi ve

antioksidan aktivitesinin maksimum değerleri alınarak belirlenmiştir. Çünkü bu değerlerin yüksek olması biyoaktif özelliklerin yüksek olmasının göstergesidir (Gao ve ark., 2021). Optimum şartlar, geliştirilen regresyon modellerinin analizi sonucunda 'arzu edilebilirlik' fonksiyonu kullanılarak belirlenmiştir. Kabul edilebilirlik fonksiyonu, tüm yanıtların birleştirildiği, 0 ile 1 arasında değişen tek bir yanıt indeksini ifade eder ve bu değer 1'e yaklaşması araştırmanın istenen hedeflere ne kadar uygun olduğunu gösterir (Pereira ve ark., 2021).

Çizelge 4.20'de optimizasyon modelinin çözümü için kullanılan değerler verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi optimizasyon sonucunda %90 değerinde kabul edilen hidrolize proteinin biyoaktif özelliklerinin bağımsız değişkenlerinin aralıkları %3 enzim/substrat ve süre 180 dk olarak belirlenmiştir. Optimize edilen protein hidrolizatının biyoaktif özellikleri; Hidroliz derecesi %16, suda çözünür protein %28.08, ACE inhibisyon aktivitesi %57.31, DPPH temizleme aktivitesi %76.53, FRAP kapasitesi 0.91 μ M TE/mg, pankreatik lipaz inhibisyonu %24.48, α -amilaz inhibisyon aktivitesi ise %32 olarak belirlenmiştir. Balık unu protein hidrolizatlarının biyoaktif özelliklerinin optimizasyonunun kabul edilebilirlik grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi bağımsız değişkenlerin (E/S oranı ve hidroliz süresi) lineer olmayan bir şekilde artması biyoaktif özelliklerin kabul edilebilirliğini artmıştır.

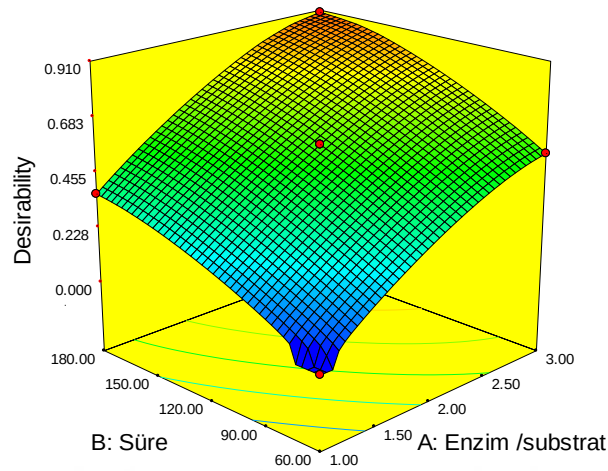
Çizelge 4.20. Balık unu hidrolizatlarının biyoaktif özelliklerinin optimizasyonunda kullanılan değerler ve optimizasyon sonucunda elde edilen değerler

Bağımsız Değişkenler ve Yanıtlar	Alınan Değer	Minimum Değer	Maksimum Değer	Optimum hedef değeri
E/S (%)	Deneme Aralığı	1	3	3
Süre(dk)	Deneme Aralığı	60	180	180
Hidroliz derecesi	Maksimum Değer	11.84	16.14	16
Suda çözünür protein miktarı	Maksimum Değer	24.6	28.5	28.08
ACE inhibisyon aktivitesi	Maksimum Değer	31.1	59.3	57.31
DPPH temizleme aktivitesi	Maksimum Değer	22.4	72.8	76.53
FRAP aktivitesi	Maksimum Değer	0.32	0.86	0.91
P. lipaz inhibisyon aktivitesi	Maksimum Değer	13.2	26.6	24.48
α -amilaz inhibisyon aktivitesi	Maksimum Değer	23.5	36.5	32.65

Design-Expert® Software

Desirability
1
0

X1 = A: Enzim /substrat
X2 = B: Süre



Şekil 4.9. Balık unu protein hidrolizatlarının biyoaktif özelliklerinin optimizasyonunun kabul edilebilirlik grafiği

4.8. Fonksiyonel Özellikler

4.8.1. Emülsifikasyon Aktivitesi ve Emülsiyon Stabilitesi

Balık unu protein hidrolizatlarının emülsifikasyon aktivite indeksi (EAI) değerleri 18.2 ± 0.7 ile 37.9 ± 0.71 m^2/g aralığında, emülsiyon stabilite indeksi (ESI) değerleri 31 ± 1.0 - 93 ± 1.0 dk aralığında bulunmuştur (Çizelge 4.21). %E/S ve hidroliz süresi arttıkça emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi her ikisi de azalmış ve bu azalmalar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.01$). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininin emülsiyon özellikleri protein hidrolizatlarının hepsinden yüksek bulunmuştur. Bu durum hidroliz edilmemiş protein konsantresinin, hidrolizatlara göre daha fazla yüksek molekül ağırlığına sahip peptitler içerdiğini göstermektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000; Nielsen ve ark., 2001; Gbogouri ve ark., 2004). Bunun sebebi ise düşük molekül ağırlıklarına sahip peptitlerin yeterince amfifilik özellik gösteremediği, bu nedenle belirgin emülsiyon özellikler sergileyememesidir (Padial-Domínguez ve ark., 2020; Mohanty ve ark., 2021). Düşük molekül ağırlığına sahip peptitler emülsiyon içerisinde hızla difüzyon gösterirler ve arayüze absorbe olurlar. Ancak hidrofobik/hidrofilik denge azalması nedeniyle emülsiyonu stabilize edemezler. Büyük peptitler ise yüzey gerilimini azaltmada daha etkilidirler ve emülsiyon içerisinde yeniden yönlendirilip emülsiyon stabilitesini artırırılar.

Emülsiyon içerisinde büyük peptitler, yağ yüzeyine absorbe olup daha küçük yağ damlacıklarının oluşmasını sağlayarak düşük molekül ağırlıklarına sahip peptitlere göre daha stabil bir emülsiyon oluşturular (Lee ve ark., 1987; Gbogouri ve ark., 2004). Görüldüğü gibi balık hidrolize proteini iyi bir emülsiyer madde özelliği taşımamaktadır. Surimi üretiminden arta kalan balık atıklarının protamex ve alkalaz enzimleri ile hidroliz edildiği bir çalışmada, elde edilen hidrolizatların EAI değerleri çalışmamızla benzer aralıklarda (30.2-54.9 m²/g) bulunmuştur (Liu ve ark., 2014).

Çizelge 4.21. Balık unu protein hidrolizatlarının EAI ve ESI değerleri

Deneme	E/S (%)	Hidroliz Süresi (dk)	EAI değerleri (m ² /g)	ESI değerleri (dk)
1	2.00	120.00	25.0±1.02 ^{f,g}	77±0.9 ^{e,f}
2	2.00	120.00	24.4±0.77 ^g	75±0.8 ^f
3	2.00	204.85	19.8±0.83 ^h	58±1.9 ^g
4	3.41	120.00	18.2±0.77 ^h	31±0.8 ⁱ
5	2.00	120.00	26.6±0.61 ^{e,f}	76±1.1 ^f
6	3.00	60.00	25.2±0.47 ^{f,g}	74±0.5 ^f
7	1.00	180.00	31.2±0.32 ^d	80±0.9 ^{d,e}
8	2.00	120.00	24.6±0.53 ^g	77±0.3 ^{e,f}
9	1.00	60.00	37.9±0.71 ^b	93±1.0 ^b
10	0.59	120.00	32.0±0.83 ^d	86±1.4 ^c
11	3.00	180.00	18.3±0.12 ^h	38±0.2 ^h
12	2.00	35.15	34.1±0.65 ^c	83±0.9 ^{c,d}
13	2.00	120.00	27.3±1.39 ^e	76±0.8 ^f
0*	0	0	58.5±1.13 ^a	102±5.2 ^a

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; t.e.:Tespit edilememiştir; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Bağımsız değişkenlerin EAI üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.22’de, ESI değerleri ise Çizelge 4.23’te verilmiştir. Yapılan ANOVA testine göre EAI ve ESI üzerine E/S oranının ve hidroliz süresinin etkisinin istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuş ve lineer olarak azaldığı belirlenmiştir. ESI üzerine E/S oranının ve hidroliz süresinin birlikte etkisi (p<0.05) ve E/S oranının ikinci dereceden etkisi (p<0.01) önemli bulunmuştur. Ancak hidroliz süresinin ikinci dereceden etkisi önemsiz bulunmuştur. Sonuçlarımızı destekler şekilde, balık protein hidrolizatlarında yapılan çalışmalarda, bu bağımsız değişkenlerin artmasıyla emülsiyon özelliklerinin azaldığı

bildirilmiştir (Klompong ve ark., 2007; Li ve ark., 2013; Liu ve ark., 2014; Mohanty ve ark., 2021; Alahmad ve ark., 2022).

Ayrıca modelin kodlanmış faktörler ve gerçek faktörler kullanılarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

$$EAI = +26.42 - 5.66 A - 4.43 B$$

$$EAI = +46.6 - 5.66 A - 0.07 B$$

$$ESI = +76.2 - 17.35 (E/S) - 10.54 (Süre) - 5.75 (E/S \times Süre) - 7.16 (E/S)^2 - 1.16 (Süre)^2$$

$$ESI = +75.9 + 22.8 (E/S) + 0.09 (Süre) - 0.09 (E/S \times Süre) - 7.16 (E/S)^2 - 3.22917E - 0.004 (Süre)^2$$

Burada; A:E/S oranı iken B: Hidroliz süresi (dk)

Çizelge 4.22. EAI üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	413.67	2	206.84	54.94	< 0.0001**
E/S (%)	256.69	1	256.69	68.19	< 0.0001**
Süre (dk)	156.98	1	156.98	41.70	< 0.0001**
Kalıntı	37.65	10	3.76		
Uyum Eksikliği	30.96	6	5.16	3.09	0.1475
Hata	6.69	4	1.67		
Düzeltilmiş Toplam	451.32	12			

**.: p<0.01, *: p<0.05

R²=0.92

Çizelge 4.23. ESI üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

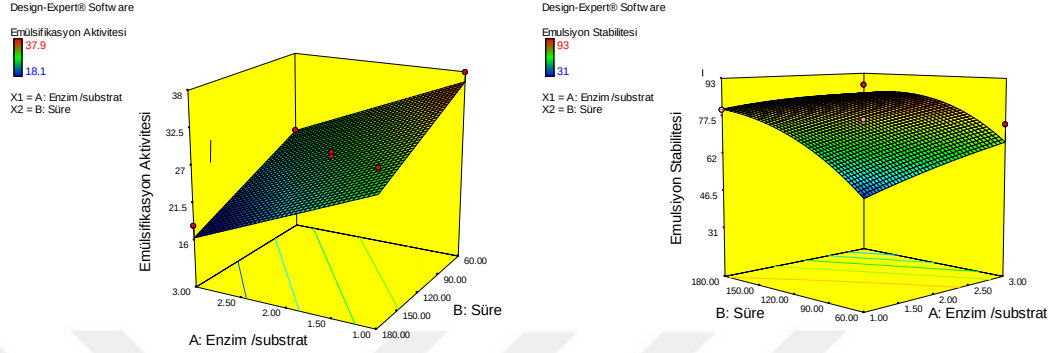
Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	3786.52	5	757.30	34.78	< 0.0001**
E/S (%)	2407.55	1	2407.55	110.58	< 0.0001**
Süre (dk)	889.48	1	889.48	40.86	0.0004**
E/S.Süre	132.25	1	132.25	6.07	0.0432*
(E/S)²	356.88	1	356.88	16.39	0.0049*
(Süre)²	9.40	1	9.40	0.43	0.5321
Kalıntı	152.40	7	21.77		
Uyum Eksikliği	149.90	3	49.87	71.24	0.006
Hata	2.80	4	0.70		
Düzeltilmiş Toplam	3938.92	12			

**.: p<0.01, *: p<0.05

R²=0.96

Emülsiyon özellikleri üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik Şekil 4.10'da verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi bağımsız değişkenler

arttıkça emülsiyon özellikleri azalmaktadır. Benzer şekilde, yılan balığı etinden farklı enzim konsantrasyonları kullanılarak elde edilen protein hidrolizatlarının EAI ve ESI değerleri enzim konsantrasyonu arttıkça azalmıştır (Samsudin ve ark., 2018).



Şekil 4.10. EAI ve ESI üzerine E/S oranının ve hidroliz süresinin etkisini gösteren 3 boyutlu grafik

4.8.2. Köpük Oluşturma Kapasitesi ve Stabilitesi

Balık unu protein hidrolizatlarının köpük oluşturma kapasitesi 36.0 ± 3.3 ile 104.7 ± 4.1 aralıklarında, köpük stabilitesi ise 19.3 ± 2.5 ile 73.4 ± 2.5 arasında bulunmuştur (Çizelge 4.24). %E/S ve hidroliz süresi arttıkça köpük oluşturma kapasite ve stabilitesi azalmış ve bu azalmalar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininin emülsiyon özellikleri protein hidrolizatlarının hepsinden yüksek bulunmuştur. Bu durum hidroliz edilmemiş protein konsantresinin, hidrolizatlara göre daha fazla uzun zincirli peptitler içerdiğini göstermektedir (Foegeding ve Davis, 2011). Köpürme özellikleri, proteinlerin yüzey aktivitesine bağlı olduğundan emülsifiye edici özellikler için belirtilenler ile benzer bir eğilim gösterirler (García-Moreno ve ark., 2017). Hidrolizin ilerlemesi ile kısa zincirli peptitler oluşmaktadır ve kısa zincirli peptitlerin oluşan köpüğü stabil halde tutamamaları köpük oluşturma özelliklerini zayıflatır (Klompong ve ark., 2007). Balık protein hidrolizatları iyi bir köpük oluşturma özellik taşımamaktadır.

García-Moreno ve ark. (2017), mavi mezgit balığının enzimatik hidrolizi ile elde edilen hidrolizatların köpük oluşturma aktivitelerini ve stabilitelerini incelediklerinde çalışmamızla benzer sonuçlar elde etmişlerdir. En düşük hidroliz derecesine sahip hidrolizatın çalışmamızdaki gibi en yüksek köpürme özelliklerini gösterdiklerini

bildirmişlerdir. Literatürdeki çalışmalarda balık protein hidrolizatlarının köpük oluşturma kapasitelerinin %23 ile %240 aralığında, köpük stabilite değerlerinin ise %20 ile %140 aralığında oldukları görülmüştür (Tekle, 2022). Buna göre çalışmamızın sonuçları literatür ile uyumlu bulunmuştur. Elavarasan ve ark. (2014), sazan balığının enzimatik hidrolizi ile elde ettikleri protein hidrolizatlarının köpük oluşturma kapasite ve stabilite değerlerinin (%75-130, %20-95) çalışmamızla benzer değerlerde olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.24. Balık unu protein hidrolizatlarının köpük oluşturma kapasitesi ve stabilitesi değerleri

Deneme	%E/S	Hidroliz Süresi (dk)	Köpük Oluşturma Kapasitesi (%)	Köpük Stabilitesi (%)
1	2.00	120.00	86.7±2.3 ^{c,d}	72.0±3.3 ^b
2	2.00	120.00	84.3±1.7 ^{c,d}	72.3±3.3 ^b
3	2.00	204.85	46.7±3.8 ^e	24.0±2.8 ^{d,e}
4	3.41	120.00	36.0±3.3 ^f	19.3±2.5 ^e
5	2.00	120.00	86.3±2.6 ^{c,d}	74.0±1.4 ^b
6	3.00	60.00	84.7±2.5 ^{c,d}	62.0±1.6 ^c
7	1.00	180.00	89.3±2.5 ^c	64.7±3.4 ^c
8	2.00	120.00	85.3±2.9 ^{c,d}	73.3±1.2 ^b
9	1.00	60.00	104.7±4.1 ^b	73.4±2.5 ^b
10	0.59	120.00	88.7±2.5 ^{c,d}	60.7±0.9 ^c
11	3.00	180.00	52.0±1.6 ^e	25.3±0.9 ^d
12	2.00	35.15	82.0±1.6 ^d	60.7±2.5 ^c
13	2.00	120.00	86.3±1.2 ^{c,d}	73.7±2.6 ^b
0*	0	0	123.3±4.7 ^a	100.0±4.0 ^a

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; t.e.:Tespit edilememiştir; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05).

Yapılan ANOVA testine göre köpürme özellikleri üzerine E/S oranının ve hidroliz süresinin negatif lineer etkisinin (p<0.05) istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur. Bağımsız değişkenlerin köpük oluşturma kapasitesi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.25’de, köpük stabilitesi üzerine etkisine ait varyans analizi sonuçları ise Çizelge 4.26’da verilmiştir. Köpük oluşturma kapasitesinin ve stabilitesinin negatif lineer regresyon modelinin kodlanmış faktörler ve gerçek faktörler kullanılarak gösterimi aşağıda verilmiştir.

$$\text{Köpük oluşturma kapasitesi} = +74.01 - 16.48 (E/S) - 12.25 (\text{Süre})$$

$$\text{Köpük oluşturma kapasitesi} = +131.47 - 16.47 A - 0.2 B$$

$$\text{Köpük stabilitesi} = +50.15 - 13.66 (\text{E/S}) - 12.15 (\text{Süre})$$

$$\text{Köpük stabilitesi} = +101.7 - 13.65 A - 0.2 B$$

Burada; A:E/S oranı iken B: Hidroliz süresi (dk)

Çizelge 4.25. Köpük oluşturma kapasitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	3373.40	2	1686.70	9.30	0.0052**
E/S (%)	2172.36	1	2172.36	11.97	0.0061**
Süre (dk)	1201.03	1	1201.03	6.62	0.0278*
Kalıntı	1841.61	10	181.46		
Uyum Eksikliği	883.85	6	147.31	0.63	0.7066
Hata	930.76	4	232.69		
Düzeltilmiş Toplam	5188.01	12			

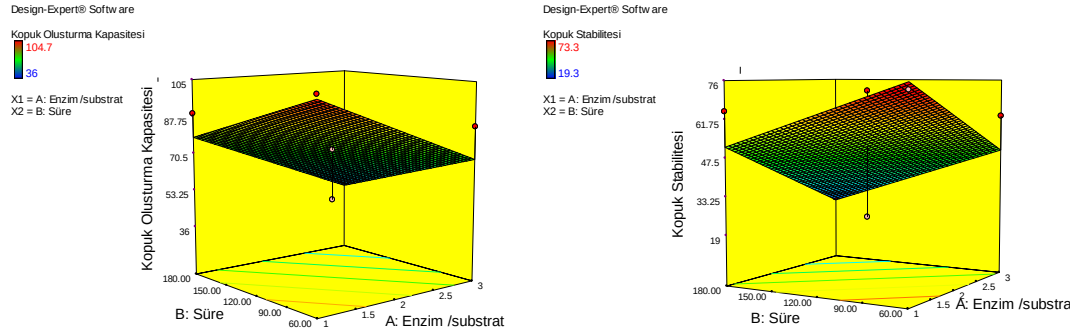
** : p<0.01, * : p<0.05 R²=0.65

Çizelge 4.26. Köpük stabilitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren varyans analiz sonucu

Varyasyon kaynağı	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F değeri	p-değeri
Model	2672.92	2	1336.46	6.84	0.0135*
E/S (%)	1491.90	1	1491.90	7.63	0.0200*
Süre (dk)	1181.02	1	1181.02	6.04	0.0338*
Kalıntı	1955.09	10	195.51		
Uyum Eksikliği	716.11	6	119.35	0.39	0.8574
Hata	1238.98	4	309.75		
Düzeltilmiş Toplam	4628.01	12			

** : p<0.01, * : p<0.05 R²=0.58

Yukarıdaki denklemlerde; E/S oranının köpürme özellikleri üzerine negatif lineer etkisinin, hidroliz süresinin etkisinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Çalışmamız ile benzer olarak Gao ve ark. (2020), köpürme özellikleri üzerine hidroliz süresinin negatif yönde lineer etkisinin var olduğunu bildirmişlerdir. Köpürme özellikleri üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik Şekil 4.11’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi bağımsız değişkenler arttıkça köpürme özellikleri lineer olarak azalmaktadır.



Şekil 4.11. Köpük oluşturma kapasitesi üzerine hidroliz süresi ve E/S oranının etkisini gösteren 3 boyutlu grafik

4.8.3. Yağ Bağlama Kapasitesi

Balık unu protein hidrolizatlarının yağ bağlama kapasite değerleri 4.16 ± 0.06 ile 4.79 ± 0.16 g yağ/g hidrolizat aralıklarında bulunmuştur (Çizelge 4.27). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininin yağ bağlama kapasitesi, protein hidrolizatlarının hepsinden düşük bulunmuştur (2.35 ± 0.10 g yağ/g hidrolizat). Bu da protein hidrolizatlarının, hidroliz edilmemiş protein konsantresinden daha fazla hidrofobik aminoasit kalıntıları içerebileceğine, lipid ve fosfolipid yapının fazla olmasına ve hidroliz sırasında artış gösteren COOH ve NH₂ gibi polar grupların artışından kaynaklanmaktadır (Razali ve ark., 2015). Limam ve ark. (2008), karides kafasından, García-Moreno ve ark. (2017) mavi mezgit balığından elde ettikleri protein hidrolizatlarının, yağ bağlama kapasitesini çalışmamızla benzer değerlerde bulmuşlardır.

Yağ bağlama kapasitesi, yağın protein tarafından bağlanan miktarını göstermektedir (Souissi ve ark., 2007). Et ve şekerleme endüstrisi için oldukça önemli bir fonksiyonel özelliktir (Lee ve ark., 2011). Balık protein hidrolizatının artan yağ bağlama kapasitesi gıdaların yapısını geliştirebilecek gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan ANOVA testinin sonuçlarına göre E/S oranının ve hidroliz süresinin balık unundan elde edilen protein hidrolizatlarının yağ bağlama kapasiteleri üzerine etkileri istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p > 0.05$). Çeşitli balık derilerinden flavourzyme kullanarak elde edilen hidrolizatların fonksiyonel özellikleri incelendiğinde ana protein olan jelatinin en düşük su tutma kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur (Tekle ve ark.,

2022). Çalışmamızla benzer şekilde enzimatik hidroliz sayesinde hidrolizatların su tutma kapasiteleri artmıştır. Balık protein hidrolizatlarının yağ bağlama kapasitelerinin araştırıldığı çalışmalarda, hidroliz derecesi ile yağ bağlama kapasiteleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Amiza ve ark., 2012; García-Moreno ve ark., 2017).

Çizelge 4.27. Balık unu protein hidrolizatlarının yağ bağlama kapasitesi değerleri

Deneme	E/S (%)	Hidroliz Süresi (dk)	Yağ Bağlama Kapasitesi (g yağ/g hidrolizat)
1	2.00	120.00	4.55±0.01 ^{b,c}
2	2.00	120.00	4.41±0.18 ^{c,d}
3	2.00	204.85	4.18±0.01 ^e
4	3.41	120.00	4.16±0.06 ^e
5	2.00	120.00	4.54±0.02 ^{b,c}
6	3.00	60.00	4.51±0.11 ^c
7	1.00	180.00	4.21±0.01 ^{d,e}
8	2.00	120.00	4.26±0.07 ^a
9	1.00	60.00	4.79±0.16 ^a
10	0.59	120.00	4.27±0.08 ^{d,e}
11	3.00	180.00	4.22±0.09 ^{d,e}
12	2.00	35.15	4.24±0.02 ^{d,e}
13	2.00	120.00	4.73±0.10 ^{a,b}
0*	0	0	2.35±0.10 ^f

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

4.8.4. Su Tutma Kapasitesi

Balık unu protein hidrolizatlarının su tutma kapasite değerleri 2.17 ± 0.01 ile 2.68 ± 0.07 g su/g hidrolizat aralıklarında bulunmuştur (Çizelge 4.28). Hidroliz edilmemiş balık unu proteininin su tutma kapasitesi, protein hidrolizatlarının hepsinden düşük bulunmuştur. Bu da protein hidrolizatlarının, hidroliz edilmemiş protein konsantresinden daha fazla polar gruplar ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$) içerdiğini göstermektedir (Ucak ve ark., 2021). Bu sebepten dolayı enzimatik hidroliz sayesinde hidrolizatın su tutma kapasitesi artmıştır. Ayrıca polar karboksil ve amino gruplarının artması hidrolizatların suyu bağlama kuvvetini arttırarak yapıyı higroskopik yapar. Bundan dolayı hidroliz edilmemiş proteinin su tutma kapasitesi, protein hidrolizatlarınkine göre daha zayıf olabilmektedir (Pires ve

Batista, 2013). Literatürde balık protein hidrolizatlarının su tutma kapasitelerinin oldukça iyi ve genellikle 2.47-6.60 g su/g hidrolizat aralığında olduğu bildirilmiştir (Taheri ve ark., 2013). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarımızın literatürdeki bu bilgi ile uyumlu olduğu söylenebilmektedir. Protein hidrolizatlarının su tutma kapasitelerinin araştırıldığı çalışmalar ile sonuçlarımız uyumlu bulunmuştur (Wahyuningtyas ve ark., 2023; Tadesse ve ark., 2023).

Yapılan ANOVA testinin sonuçlarına göre E/S oranının ve hidroliz süresinin balık unundan elde edilen protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesi üzerine etkileri istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Noman ve ark. (2019), yılan balığı eti protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesi değerlerini 1.47-1.58 g su/g hidrolizat olarak bulmuşlardır. Hidroliz süresi ile su tutma kapasitesi arasında çalışmamızla benzer olarak istatistiksel olarak fark görülmemiştir ($p>0.05$).

Çizelge 4.28. Balık unu protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesi değerleri

Deneme	%E/S	Hidroliz Süresi (dk)	Su Tutma Kapasitesi(g su/g hidrolizat)
1	2.00	120.00	2.45±0.01 ^b
2	2.00	120.00	2.41±0.01 ^b
3	2.00	204.85	2.48±0.05 ^b
4	3.41	120.00	2.17±0.01 ^d
5	2.00	120.00	2.48±0.02 ^b
6	3.00	60.00	2.46±0.04 ^b
7	1.00	180.00	2.47±0.03 ^b
8	2.00	120.00	2.45±0.04 ^b
9	1.00	60.00	2.68±0.07 ^a
10	0.59	120.00	2.26±0.08 ^{c,d}
11	3.00	180.00	2.41±0.07 ^b
12	2.00	35.15	2.37±0.05 ^{b,c}
13	2.00	120.00	2.44±0.03 ^b
0*	0	0	1.69±0.14 ^e

*:Hidroliz edilmemiş balık unu proteini; Analiz sonuçlarında, aynı sütun içerisinde farklı harfe sahip değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$).

Proteinlerin su tutma kapasitesi, ürünlerin hem ekonomik hem de duyuşal özelliklerini etkilediği için gıda endüstrisi için önemli bir fonksiyonel özelliktir (Pires ve Batista, 2013). Su tutma kapasitesine sahip protein hidrolizatlarının orta nemli gıdalarda dokuyu iyileştirmek amacıyla katkı maddesi olarak kullanılabileceği önerilmektedir (Chiang ve ark., 1999).

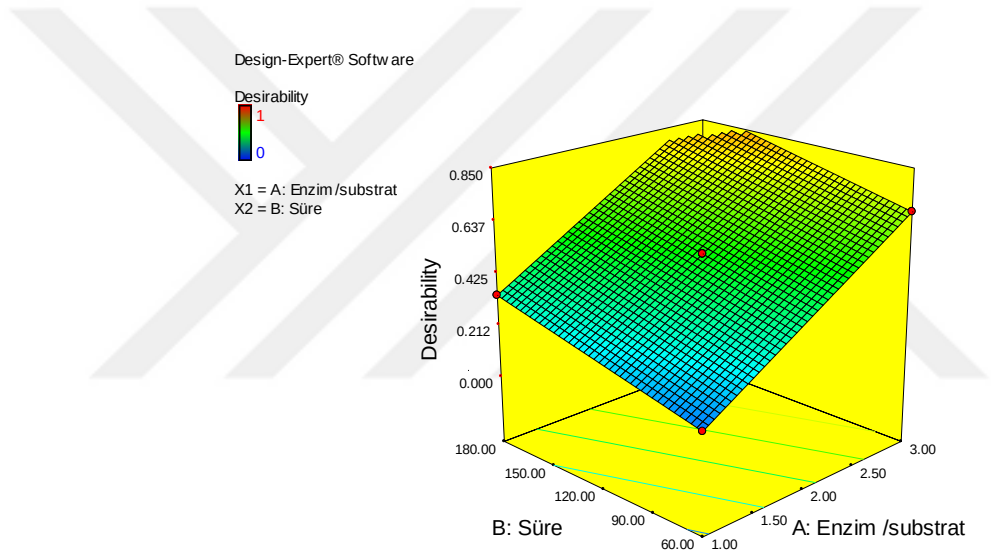
4.9. Balık Unu Protein Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özelliklerinin Optimizasyonu

Balık unu protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin optimizasyonu Desing Expert 7.0 (Version 7.0 StatEase, ABD) paket programı kullanılarak yapılmış ve optimum enzimatik hidroliz koşulları belirlenmiştir (Myers ve ark., 2016). Optimizasyonda emülsiyon aktivitelerinin, köpük oluşturma özelliklerinin, yağ bağlama ve su tutma kapasitelerinin yüksek olması beklenmektedir. Balık protein hidrolizatlarından elde edilen protein hidrolizatları gıdalarda yapıyı iyileştirici katkı maddeleri olarak kullanılabilir (Dekkers ve ark., 2011; Halim ve ark., 2016). Enzimatik hidrolizasyonun optimizasyonu, farklı uygulamalar için fonksiyonel özellikleri değiştiren ve hatta iyileştiren bir dizi daha küçük polipeptit üretmektedir. Örneğin balık protein hidrolizatları, balık bazlı pate veya sufle gibi bazı gıda ürünlerinin dokusundan sorumlu olan stabil köpükler oluşturabilmektedirler (Pires ve Batista, 2013). Balık protein hidrolizatları çeşitli ürünlerde emülsifikasyon özellikleri sayesinde emülsiyonu stabilize edici bileşenler olarak kullanılabilir (Leni ve ark., 2020). Protein hidrolizatlarının yağ bağlama kabiliyeti, özellikle et ve şekerleme ürünlerinde ürünlerin tadını etkileyen önemli bir faktördür (Halim ve ark., 2016). Optimizasyonda hidroliz derecesi minimum olarak seçilmiştir. Çünkü yüksek hidroliz derecesine sahip protein hidrolizatlarının daha zayıf, düşük hidroliz derecesine sahip hidrolizatların ise çok iyi fonksiyonel özellikler sergilediği bildirilmektedir (Kristinsson ve Rasco, 2000; Gbogouri ve ark., 2004).

Çizelge 4.29'da optimizasyon modelinin çözümü için kullanılan değerler verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi optimizasyon sonucunda %78 değerinde kabul edilen hidrolize proteinin fonksiyonel özelliklerinin bağımsız değişkenlerinin aralıkları %1 enzim/substrat ve süre 60 dk olarak seçilmiştir. Optimize edilen protein hidrolizatının fonksiyonel özellikleri hidroliz derecesi %11.67, emülsiyon aktivitesi 36.51 m²/g, emülsiyon stabilitesi 90.02 dk, köpük oluşturma kapasitesi %102.74, köpük oluşturma stabilitesi %74.75, su tutma kapasitesi 2.38 g su/g hidrolizat, yağ bağlama kapasitesi 4.37 g yağ/g hidrolizat olarak belirlenmiştir. Ayrıca balık unu protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin optimizasyonunun kabul edilebilirlik grafiği Şekil 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.29. Balık unu protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin optimizasyonunda kullanılan değerler ve optimizasyon sonucunda elde edilen değerler

Bağımsız Değişkenler ve Yanıtlar	Alınan Değer	Minimum Değer	Maksimum Değer	Optimum hedef değeri
Enzim /substrat	Deneme Aralığı	1	3	1
Süre	Deneme Aralığı	60	180	60
Hidroliz derecesi	Minimum Değer	11.84	16.14	11.67
Emülsifikasyon Aktivitesi	Maksimum Değer	18.11	37.9	36.51
Emülsiyon Stabilitesi	Maksimum Değer	31	93	90.02
Köpük Oluşturma Kapasitesi	Maksimum Değer	36	104.7	102.74
Köpük Oluşturma Stabilitesi	Maksimum Değer	19.3	73.3	74.75
Su Tutma Kapasitesi	Maksimum Değer	2.03	2.68	2.38
Yağ Bağlama Kapasitesi	Maksimum Değer	4.1	4.79	4.37



Şekil 4.12. Balık unu protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin optimizasyonunun kabul edilebilirlik grafiği

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada protein bakımından zengin olan ancak sadece yem işletmeleri tarafından kullanılan, katma değeri düşük yan ürün olan balık unundan alkalaz enzimi ile tepki yüzey yöntemi kullanılarak protein hidrolizatları etmek amaçlanmıştır. Elde edilen hidrolizatların antihipertansif, anti-obezidik, anti-diyabetik, antioksidan özellikleri belirlenerek potansiyel sağlık faydaları araştırılmıştır. Ayrıca fonksiyonel özellikleri de belirlenmiş olup gıda katkı maddesi olarak değerlendirilebilirliği belirlenmiştir.

Çalışmada kullanılan balık ununun % nem, yağ, kül, protein ve karbonhidrat içerikleri sırasıyla 8.81 ± 0.08 , 7.21 ± 0.09 , 24.58 ± 0.65 , 53.85 ± 1.24 ve 5.55 ± 1.04 olarak bulunmuştur. Enerji değeri ise 302.53 ± 1.86 kcal/100 g olarak hesaplanmıştır. Balık ununun belirlenen mineral içeriklerinden özellikle kalsiyum, fosfor ve sodyum değerleri 65,600, 52,330 ve 11,092 ppm olarak bulunmuştur. Toplam aflatoksin (B1+B2+G1+G2), B1 ve okratoksin A miktarları ise sırasıyla 10.74 ± 0.08 , 3.76 ± 0.23 ve 1.12 ± 0.10 ppb olarak belirlenmiştir. Hidrolizatların hidroliz derecesi, çözünür protein miktarı, protein miktarı sırasıyla $\%11.7 \pm 0.20$ - 16.8 ± 0.5 , $\%24.7 \pm 1.6$ - 28.5 ± 0.6 , $\%80.5 \pm 0.40$ - 86.7 ± 0.6 aralıklarında bulunmuştur. E/S oranı ve hidroliz süresi arttıkça bu özellikler de artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Hidrolizatların biyoaktif özelliklerinden ACE, α -amilaz ve pankreatik lipaz inhibisyon değerleri sırasıyla $\%23.7 \pm 1.2$ - 66.7 ± 1.2 , $\%23.5 \pm 1.6$ - 36.3 ± 0.4 , $\%13.2 \pm 0.67$ - 26.6 ± 0.94 aralıklarında bulunmuştur. Ayrıca aynı özellikler hidroliz edilmemiş balık unu proteininde de incelenmiş ve enzim inhibisyon aktivitesi tespit edilememiştir. Elde edilen hidrolizatların belirlenen antioksidan özelliklerinden DPPH radikali temizleme aktivite ve FRAP kapasite değerleri sırasıyla 22.4 ± 0.78 - 72.8 ± 0.3 ve 0.32 ± 0.01 - 1.06 ± 0.06 μ M TE/mg hidrolizat olarak bulunmuştur. E/S oranı ve hidroliz süresinin artmasıyla antioksidan özellikler de artmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Balık unu protein hidrolizatlarının enzimatik hidroliz sonucu oluşan biyoaktif özellikleri (antihipertansif, anti-obezidik, anti-diyabetik, antioksidan), fonksiyonel gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmalarına olanak tanıyabilir. Hidrolizatların fonksiyonel özellikleri incelendiğinde EAI, ESI, köpük oluşturma kapasite ve stabilite değerleri, yağ bağlama ve su tutma kapasiteleri sırası ile 18.2 ± 0.7 - 37.9 ± 0.71 m²/g, 31 ± 1.0 - 93 ± 1.0 dk, $\%36.0 \pm 3.3$ - 104.7 ± 4.1 , $\%19.3 \pm 2.5$ - 73.4 ± 2.5 , 4.16 ± 0.06 - 4.79 ± 0.16 g yağ/ g hidrolizat ve 2.17 ± 0.01 - 2.68 ± 0.07 g su/g hidrolizat aralıklarında bulunmuştur. E/S oranı ve hidroliz süresinin artmasıyla

fonksiyonel özellikler azalmış ve bu azalışlar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. E/S oranı ve hidroliz süresinin ise yağ bağlama ve su tutma kapasitesi üzerinde etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Balık unu proteinlerinin hidrolizi sonucu meydana gelen hidrolizatların hidroliz derecesi arttıkça, emülsiyon ve köpük oluşturma özellikleri zayıflamaktadır. Bu nedenle, bu hidrolizatlar gıda katkı maddesi olarak iyi bir emülsiyer madde ve köpük oluşturuca ajan özelliği taşımamaktadır. Ancak, balık protein hidrolizatlarının enzimatik hidroliz ile artan yağ bağlama ve su tutma kapasitesi, gıdaların yapısını geliştirebilecek bir gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceklerini düşündürmektedir. Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda biyoaktif özellikler için farklı, fonksiyonel özellikler için farklı enzimatik hidroliz koşulları belirlenmiştir. %90 değerinde kabul edilen hidrolize proteinin biyoaktif özelliklerinin bağımsız değişkenlerinin aralıkları %3 enzim/substrat ve süre 180 dk olarak seçilmiş iken, %78 değerinde kabul edilen hidrolize proteinin fonksiyonel özelliklerinin bağımsız değişkenlerinin aralıkları %1 E/S ve süre 60 dk olarak seçilmiştir. Optimize edilen protein hidrolizatının biyoaktif özellikleri; Hidroliz derecesi %16, suda çözünür protein %28.08, ACE inhibisyon aktivitesi %57.31, DPPH temizleme aktivitesi %76.53, FRAP kapasitesi 0.91 $\mu\text{M TE/mg}$, pankreatik lipaz inhibisyonu %24.48, α -amilaz inhibisyon aktivitesi ise %32 olarak bulunmuştur. Optimize edilen protein hidrolizatının fonksiyonel özellikleri; Hidroliz derecesi %11.67, emülsiyon aktivitesi 36.51 m^2/g , emülsiyon stabilitesi 90.02 dk, köpük oluşturma kapasitesi %102.74, köpük oluşturma stabilitesi %74.75, su tutma kapasitesi 2.38 g su/g hidrolizat, yağ bağlama kapasitesi 4.37 g yağ/g hidrolizat olarak bulunmuştur.

Beslenmeye bağlı sağlık sorunlarının (obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar) her geçen gün giderek artması ile araştırmacılar ve gıda sanayi daha fazla fonksiyonel gıda geliştirmeye yönelmiştir. Protein üretimi ve bunların biyoaktif ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi çalışmaları her geçen gün artmaktadır. Deniz kaynaklı protein hidrolizatları güçlü antioksidan, antihipertansiyon, antidiyabetik ve antiobezidik etkiler göstermektedir. Bu hidrolizatların gıdalara eklenerek duyusal, biyoaktif ve fonksiyonel özelliklerin incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca bu hidrolizatların peptit dizilimlerinin belirlenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abbasi, S., Moslehishad, M., and Salami, M., 2022. Antioxidant and alpha-glucosidase enzyme inhibitory properties of hydrolyzed protein and bioactive peptides of quinoa. **International Journal of Biological Macromolecules**, 213, 602-609.
- Adler-Nissen, J., 1986. Enzymic hydrolysis of food proteins. **Elsevier Applied Science Publishers**.
- Agustin, V., Husni, A., and Putra, M.M.P., 2021. Antioxidant activity of protein hydrolysate from snakehead fish (*Channa striata*) viscera obtained by enzymatic process. *Earth and Environmental Science* 919 (1), p. 012046. **IOP Publishing**.
- Ahmad, H., Khan, H., Haque, S., Ahmad, S., Srivastava, N., and Khan, A., 2023. Angiotensin-converting enzyme and hypertension: A systemic analysis of various ACE inhibitors, their side effects, and bioactive peptides as a putative therapy for hypertension **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**.
- Alahmad, K., Xia, W., Jiang, Q., and Xu, Y., 2022. Effect of the degree of hydrolysis on nutritional, functional, and morphological characteristics of protein hydrolysate produced from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) using ficin enzyme. **Foods**, 11(9), 1320.
- Aldemir, R., Tekeli, A., Üstündağ, B., Bilgeçli, K., ve Çelik, L.B., 2022. Türkiye’de Karadeniz’in farklı bölgelerinde üretilen balık unlarının hayvan besleme açısından değeri. **Journal of the Institute of Science and Technology**, 12(4), 2581-2589.
- Amiza, M.A., Kong, Y.L., and Faazaz, A.L., 2012. Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of Cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. **International Food Research Journal**. 19(1), 199
- AOAC, 2005. Association of official analytical chemist, **Official Methods of Analysis**. 18th Edition, Aoac International, Suite 500, 481 North Frederick Avenue, Gaithersburg, Maryland 20877-2417, Usa.
- AOAC, 2007. AOAC (999.07). **Official Methods of Analysis**, Association of official analytical chemists. 18th edition, Washington D C.
- Arise, R.O., Yekeen, A.A., and Ekun, O.E., 2016. In vitro antioxidant and α -amylase inhibitory properties of watermelon seed protein hydrolysates. **Environmental & Experimental Biology**, 14(4).
- Auwal, S M., Zainal Abidin, N., Zarei, M., Tan, C.P., and Saari, N., 2019. Identification, structure-activity relationship and in silico molecular docking analyses of five novel angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from stone fish (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates. **PLOS One**, 14(5), e0197644.
- Awosika, T. O., and Aluko, R.E., 2019. Inhibition of the in vitro activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase by yellow field pea (*Pisum sativum* L.) protein hydrolysates. **International Journal of Food Science & Technology**, 54(6), 2021-2034.
- Azizi, K.M., Sharifan, A., Hoseini, E., and Ghavami, A., 2020. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) ” by-product for production of bioactive peptides with antioxidative properties. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 26(4), 1829-1838.
- Baharuddin, N.A., Halim, N.R.A., and Sarbon, N.M., 2016. Effect of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of eel (*Monopterus* sp.) protein hydrolysate. **International Food Research Journal**, 23(4), 1424.

- Baldissera, M.D., Souza, C.F., da Silva, J.A., Barroso, D.C., Glória, E.M., Baldisserotto, B., and Val, A.L., 2020. Dietary exposure to ochratoxin A reduces growth performance and impairs hepatic purinergic signaling in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 46(6): 2055-2064.
- Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N.M., and Nunes, M.L., 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. **Process Biochemistry**, 45(1), 18-24.
- Bayraklı, B., 2019. Karadeniz’de Hamsi ununa alternatif olarak üretilen Çaça ununun besin bileşenlerinin karşılaştırılması. **Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences**, 4(3), 545-550.
- Benjakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S.M., and Kristinsson, H.G., 2014. Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications. **Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods**, 237-281.
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., and Kumar, V., 2020. A review on bioactive peptides: Physiological functions, bioavailability and safety. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 26, 139-150.
- Bilir, G., Khalesi, M., Cermeño, M., FitzGerald, R.J., and Ekinici, D., 2022. Extraction and characterization of protein concentrates from limpets (*Patella vulgata*) and peptide release following gastrointestinal digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 70(36), 11212-11223.
- Bkhairia, I., Ben S.B.S.R., Nasri, R., Jridi, M., Ghorbel, S., and Nasri, M., 2016. In-vitro antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from golden grey mullet prepared by commercial, microbial and visceral proteases. **Journal of Food Science and Technology**, 53, 2902-2912.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., and Nasri, M., 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**, 118(3), 559-565.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Plé, R., Leroy, Y., Guillochon, D., Barkia, A., and Nasri, M., 2008. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. **Food Chemistry**, 111(2), 350-356.
- Bravo, R.K.D., Angelia, M.R.N., Uy, L.Y.C., Garcia, R.N., and Torio, M.A.O., 2022. Isolation, purification and characterization of the antibacterial, antihypertensive and antioxidative properties of the bioactive peptides in the purified and proteolyzed major storage protein of pigeon pea (*Cajanus cajan*) seeds. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, 4, 100062.
- Cao, M., Li, W., Li, H., Zhang, J., Liu, Y., and Liu, X., 2022. Antioxidant and ACE inhibitory activities of peptides prepared from adzuki bean by semi-solid enzymatic hydrolysis. **Food Bioscience**, 47, 101620.
- Capuano, E., Oliviero, T., Fogliano, V., and Pellegrini, N., 2018. Role of the food matrix and digestion on calculation of the actual energy content of food. **Nutrition Reviews**, 76(4), 274-289.
- Centenaro, G.S., Centenaro, M.S., and Hernandez, C.P., 2011. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. **Advance Journal of Food Science and Technology**, 3(4), 280-288.

- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., and Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, 135(4), 3020-3038.
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., Hemalatha, R., and Kumar, B. D., 2013. Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. **Food Research International**, 52(1), 221-229.
- Chang, C.Y., Wu, K.C., and Chiang, S.H., 2007. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. **Food Chemistry**, 100(4), 1537-1543.
- Chia, T.Y., Gan, C.Y., Shafie, M.H., Yap, P.G., Rodhi, A.M., Ahmad, A., and Johns, E.J., 2023. A comprehensive review on the pancreatic lipase inhibitory peptides: A future anti-obesity strategy. **Electronic Journal of General Medicine**, 20(3).
- Chiang, W.D., Shih, C.J., and Chu, Y.H., 1999. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. **Food Chemistry**, 65(2), 189-194.
- Cho, J.H., and Kim, I.H., 2011. Fish meal–nutritive value. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 95(6), 685-692.
- Cunha, S.A., and Pintado, M.E., 2022. Bioactive peptides derived from marine sources: Biological and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, 119, 348-370.
- Da Rocha, M., Alemán, A., Baccan, G.C., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, C., Montero, P., and Prentice, C., 2018. Anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial effects of underutilized fish protein hydrolysate. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 27(5), 592-608.
- Da Silva, P.C., Toledo, T., Brião, V., Bertolin, T.E., and Costa, J.A.V., 2021. Development of extruded snacks enriched by bioactive peptides from microalga *Spirulina* sp. LEB 18. **Food Bioscience**, 42, 101031.
- De la Fuente, B., Aspevik, T., Barba, F.J., Kousoulaki, K., and Berrada, H., 2023. Mineral bioaccessibility and antioxidant capacity of protein hydrolysates from Salmon (*Salmo salar*) and Mackerel (*Scomber scombrus*) backbones and heads. **Marine Drugs**, 21(5), 294.
- De Matos, F.M., de Lacerda, J.T.J.G., Zanetti, G., and De Castro, R.J.S., 2022. Production of black cricket protein hydrolysates with α -amylase, α -glucosidase and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities using a mixture of proteases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 39, 102276.
- Dekkers, E., Raghavan, S., Kristinsson, H.G., and Marshall, M.R., 2011. Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**, 124(2), 640-645.
- Dhanabalan, V., Xavier, M., Kannuchamy, N., Asha, K.K., Singh, C. B., and Balange, A., 2017. Effect of processing conditions on degree of hydrolysis, ACE inhibition, and antioxidant activities of protein hydrolysate from *Acetes indicus*. **Environmental Science and Pollution Research**, 24, 21222-21232.
- Dinakarkumar, Y., Krishnamoorthy, S., Margavelu, G., Ramakrishnan, G., and Chandran, M., 2022. Production and characterization of fish protein hydrolysate: effective utilization of trawl by-catch. **Food Chemistry Advances**, 100138.
- Ekici, H., 2017. Balıklarda yemlerden kaynaklanan olumsuzluk faktörleri. **Türkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics**, 3(2), 139-43.

- Elavarasan, K., and Shamasundar, B.A., 2014. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of protein hydrolysates prepared from three freshwater carps (Catla catla, Labeo rohita and Cirrhinus mrigala) using Flavorzyme. **International Journal of Food Science & Technology**, 49(5), 1344-1350.
- Elavarasan, K., and Shamasundar, B.A., 2021. Antioxidant properties of papain mediated protein hydrolysates from fresh water carps (Catla catla, Labeo rohita and Cirrhinus mrigala) and its application on inhibition of lipid oxidation in oil sardine mince during ice storage. **Journal of Food Science and Technology**, 1-10.
- Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., and Shamasundar, B.A., 2014. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (C Atla Catla) as influenced by the nature of enzyme. **Journal of Food Processing and Preservation**, 38(3), 1207-1214.
- Erol, N.D., Erdem, Ö.A., and Çaklı, Ş., 2017. Stability of fish protein hydrolysate from heads of gilthead sea bream (Sparus aurata), european sea bass (Dicentrarchus labrax) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during storage. **Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 34(3), 327-336.
- Fathi, P., Moosavi-Nasab, M., Mirzapour-Kouhdasht, A., and Khalesi, M., 2021. Generation of hydrolysates from rice bran proteins using a combined ultrasonication-Alcalase hydrolysis treatment. **Food Bioscience**, 42, 101110.
- Fernandes, I., Fernandes, T., and Cordeiro, N., 2019. Nutritional value and fatty acid profile of two wild edible limpets from the Madeira Archipelago. **European Food Research and Technology**, 245(4), 895-905.
- Fernando, I.P.S., Ryu, B., Ahn, G., Yeo, I.K., and Jeon, Y.J., 2020. Therapeutic potential of algal natural products against metabolic syndrome: A review of recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, 97, 286–99
- Foegeding, E.A., and Davis, J.P., 2011. Food protein functionality: A comprehensive approach. **Food Hydrocolloids**, 25(8), 1853-1864.
- Gaikwad, S.B., More, P.R., Sonawane, S.K., and Arya, S.S., 2021. Antioxidant and Anti-hypertensive Bioactive Peptides from Indian Mackerel Fish Waste. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 27(4), 2671-2684.
- Gao, R., Shen, Y., Shu, W., Bai, F., Jin, W., Wang, J., and Yuan, L., 2020. Optimization of enzymatic conditions of sturgeon muscles and their anti-inflammatory potential. **Journal of Food Quality**, 2020, 1-12.
- Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., and Sun, Q., 2021. Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. **Trends in Food Science & Technology**, 110, 687-699.
- García-Moreno, P.J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N.M., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A., and Guadix, E.M., 2014. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. **Food Research International**, 65, 469-476.
- García-Moreno, P.J., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A., and Guadix, E.M., 2015. Production and identification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Mediterranean fish discards. **Journal of Functional Foods**, 18, 95-105.
- García-Moreno, P.J., Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F.J., Ruiz-Quesada, C., Pérez-Morilla, A.I., Martínez-Agustín, O., and Guadix, E.M., 2017. Functional, bioactive and antigenicity properties of blue whiting protein hydrolysates: Effect of

- enzymatic treatment and degree of hydrolysis. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, 97(1), 299-308.
- Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J., and Parmentier, M., 2004 . Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. **Journal of Food Science**, 69(8), C615-C622.
- Godinho, I., Pires, C., Pedro, S., Teixeira, B., Mendes, R., Nunes, M.L., and Batista, I., 2016. Antioxidant properties of fish protein hydrolysates prepared from cod protein hydrolysate by *Bacillus* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 178, 1095-1112.
- González-Noriega, J.A., Valenzuela-Melendres, M., Hernández-Mendoza, A., Astiazarán-García, H., Mazorra-Manzano, M.Á., and Peña-Ramos, E.A., 2022. Hydrolysates and peptide fractions from pork and chicken skin collagen as pancreatic lipase inhibitors. **Food Chemistry: X**, 13, 100247.
- Gu, R.Z., Li, C.Y., Liu, W.Y., Yi, W.X., and Cai, M. Y., 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin. **Food Research International**, 44(5), 1536-1540.
- Gunasekaran, J., Kannuchamy, N., Kannaiyan, S., Chakraborti, R., and Gudipati, V., 2015. Protein hydrolysates from shrimp (*Metapenaeus dobsoni*) head waste: Optimization of extraction conditions by response surface methodology. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 24(5), 429-442.
- Halim, N.R.A., Yusof, H.M., and Sarbon, N.M., 2016. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, 51, 24-33.
- Harnedy, P.A., and FitzGerald, R.J., 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. **Journal of Functional Foods**, 4(1), 6-24.
- Idowu, A.T., Benjakul, S., Sinthusamran, S., Sookchoo, P., and Kishimura, H., 2019. Protein hydrolysate from salmon frames: Production, characteristics and antioxidative activity. **Journal of Food Biochemistry**, 43(2), e12734.
- Idowu, A.T., Igiehon, O.O., Idowu, S., Olatunde, O.O., and Benjakul, S., 2021. Bioactivity potentials and general applications of fish protein hydrolysates. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 27, 109-118.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Wu, J., 2012. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. **Food Chemistry**, 135(4), 3039-3048.
- Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., and Sharma, A., 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**, 121(1), 178-184.
- Jamróz, E., and Kopel, P., 2020. Polysaccharide and protein films with antimicrobial/antioxidant activity in the food industry: A review. **Polymers**, 12(6), 1289.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N., Marshall, M., 2012. Food proteins and peptides as bioactive agents. bioactive food proteins and peptides: **Applications in Human Health**, Eds: N. S. Hettiarachchy. CRC Press, Taylor And Francis Group, Boca Raton, p. 1-27.
- Kaprasob, R., Khongdetch, J., Laohakunjit, N., Selamassakul, O., and Kaisangsri, N., 2022. Isolation and characterization, antioxidant, and antihypertensive activity of

- novel bioactive peptides derived from hydrolysis of King Boletus mushroom. **Food Science and Technology**, 160, 113287.
- Karami, Z., and Akbari-Adergani, B., 2019. Bioactive food derived peptides: A review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. **Journal of Food Science and Technology**, 56, 535-547.
- Karami, Z., Butkinaree, C., Yingchutrakul, Y., Simanon, N., and Duangmal, K., 2022. Comparative study on structural, biological and functional activities of hydrolysates from Adzuki bean (*Vigna angularis*) and mung bean (*Vigna radiata*) protein concentrates using Alcalase and Flavourzyme. **Food Research International**, 161, 111797.
- Kari, N. M., Ahmad, F., and Ayub, M.N.A., 2022. Proximate composition, amino acid composition and food product application of anchovy: a review. **Food Research**, 6(4), 16-29.
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O., and Rawdkuen, S., 2017. Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. **Food chemistry**, 215, 383-390.
- Khiari, Z., Ndagijimana, M., and Betti, M., 2014. Low molecular weight bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of collagen after isoelectric solubilization/precipitation process of turkey by-products. **Poultry Science**, 93(9), 2347-2362.
- Kiettiolarn, M., Kitsanayanyong, L., Maneerote, J., Unajak, S., and Tepwong, P., 2022. Optimization and production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from tuna cooking juice concentrate by response surface methodology. **Fisheries and Aquatic Sciences**, 25(6), 335-349.
- Klomkiao, S., and Benjakul, S., 2018. Protein hydrolysates prepared from the viscera of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*): antioxidative activity and functional properties. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 18(1), 69-79.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., and 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(4), 1317-1327.
- Kocak, A., Sanli, T., Anli, E. A., and Hayaloglu, A.A., 2020 . Role of using adjunct cultures in release of bioactive peptides in white-brined goat-milk cheese. **Food Science and Technology**, 123, 109127.
- Koç, S., 2016. Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve işleme atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının besleyici, fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin araştırılması, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, **Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı**, Doktora Tezi.
- Koopman, R., Crombach, N., Gijzen, A.P., Walrand, S., Fauquant, J., Kies, A.K., and van Loon, L.J., 2009. Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 90(1), 106-115.
- Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A., 2000. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(3), 657-666.
- Lee, P.W., Nordlee, J.A., Koppelman, S.J., Baumert, J.L., and Taylor, S.L., 2011. Evaluation and comparison of the species-specificity of 3 antiparvalbumin IgG antibodies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59(23), 12309-12316.

- Lee, S.W., Shimizu, M., Kaminogawa, S., and Yamauchi, K., 1987. Emulsifying properties of a mixture of peptides derived from the enzymatic hydrolyzates of bovine caseins. **Agricultural and Biological Chemistry**, 51(6), 1535-1540.
- Lee, S.Y., and Hur, S.J., 2017. Angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of enzymatic hydrolysates of Korean native cattle (Hanwoo) myofibrillar protein. **BioMed Research International**.
- Leni, G., Soetemans, L., Caligiani, A., Sforza, S., and Bastiaens, L., 2020. Degree of hydrolysis affects the techno-functional properties of lesser mealworm protein hydrolysates. **Foods**, 9(4), 381.
- Li, X.X., Han, L.J., and Chen, L.J., 2008. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 88(9), 1660-1666.
- Li, Y., and Yu, J., 2015. Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. **Journal of Medicinal Food**, 18(2), 147-156.
- Li, Z., Wang, B., Chi, C., Gong, Y., Luo, H., and Ding, G., 2013. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. **Food Research International**, 51(1), 283-293.
- Liceaga-Gesualdo, A.M., and Li-Chan, E.C.Y. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of food science*, 64(6), 1000-1004.
- Li-Chan, E. C., 2015. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. **Current Opinion in Food Science**, 1, 28-37.
- Limam, Z., Sadok, S., and Abed, A.E., 2008. Enzymatic hydrolysis of shrimp head waste: functional and biochemical properties. **Food Biotechnology**, 22(4), 352-362.
- Lin, D., Sun, L.C., Chen, Y.L., Liu, G.M., Miao, S., and Cao, M.J., 2022. Peptide/protein hydrolysate and their derivatives: Their role as emulsifying agents for enhancement physical and oxidative stability of emulsions. **Trends in Food Science & Technology**, 129, 11-24.
- Liu, L., Wang, Y., Peng, C., and Wang, J., 2013. Optimization of the preparation of fish protein anti-obesity hydrolysates using response surface methodology. **International Journal of Molecular Sciences**, 14(2), 3124-3139.
- Liu, Y., Li, X., Chen, Z., Yu, J., Wang, F., and Wang, J., 2014. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, 151, 459-465.
- Liu, Y., Ma, X.Y., Liu, L.N., Xie, Y.P., Ke, Y.J., Cai, Z.J., and Wu, G.J., 2018. Ultrasonic-assisted extraction and functional properties of wampee seed protein. **Food Science and Technology**, 39, 324-331.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., and Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193(1), 265-275.
- Macedo, M.W.F.S., Cunha, N.B.D., Carneiro, J.A., Costa, R.A.D., Alencar, S.A.D., Cardoso, M.H., Dias, S.C., 2021. Marine organisms as a rich source of biologically active peptides. **Frontiers in Marine Science**, 8, 667764.
- Meldstad, F., 2015. Hydrolysis of Marine Cod (*Gadus Morhua*) Head-Utilization of rest raw material from cod for production of ingredients for human consumption Master's thesis, NTNU.

- Moghaddam, H.N., Mesgaran, M.D., Najafabadi, H.J. and Najafabadi, H.J., 2007. Determination of chemical composition, mineral contents, and protein quality of Iranian Kilka fish meal. **International Journal of Poultry Science**, 6(5), 354-361.
- Mohanty, U., Majumdar, R.K., Mohanty, B., Mehta, N.K., and Parhi, J., 2021. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysates from visceral waste of *Labeo rohita*. **Journal of Food Science**
- Mudgil, P., Kilari, B.P., Kamal, H., Olalere, O.A., FitzGerald, R.J., Gan, C.Y., and Maqsood, S., 2020. Multifunctional bioactive peptides derived from quinoa protein hydrolysates: Inhibition of α -glucosidase, dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin I converting enzymes. **Journal of Cereal Science**, 96, 103-130.
- Mune Mune, M.A., 2015. Influence of degree of hydrolysis on the functional properties of cowpea protein hydrolysates **Journal of Food Processing and Preservation**, 39(6), 2386-2392.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C., and Anderson-Cook, C.M., 2016. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. **John Wiley & Sons**.
- Najafian, L., and Babji, A.S., 2012. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, 33(1), 178-185.
- Nasri, R., Chataigné, G., Bougatef, A., Chaâbouni, M.K., Dhulster, P., Nasri, M., and Nedjar-Arroume, N., 2013a. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from enzymatic hydrolysates of goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) muscle proteins. **Journal of Proteomics**, 91, 444-452.
- Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., and Karra-Châabouni, M., 2013b. ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: Effect on meat lipid oxidation. **Food Research International**, 54(1), 552-561.
- Nielsen, P.M., Petersen, D., and Dambmann, C., 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. **Journal of Food Science**, 66(5), 642-646.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., and Assavanig, A., 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **Journal of food Engineering**, 70(4), 571-578.
- NMKL 161., 1998. **Nordic Committee on Food Analysis**. Metals Determination by Atomic Absorption Spectrophotometry after Wet Digestion in a Microwave Oven.
- Noman, A., Qixing, J., Xu, Y., Ali, A.H., Al-Bukhaiti, W.Q., Abed, S.M., and Xia, W., 2019. Influence of degree of hydrolysis on chemical composition, functional properties, and antioxidant activities of chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) hydrolysates obtained by using alcalase 2.4 L. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, 28(6), 583-597.
- Noman, A., Xu, Y., Al-Bukhaiti, W.Q., Abed, S.M., Ali, A.H., Ramadhan, A.H., and Xia, W., 2018. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. **Process Biochemistry**, 67, 19-28.
- Nongonierma, A.B., Paoletta, S., Mudgil, P., Maqsood, S., and FitzGerald, R.J., 2017. Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory properties of camel milk protein hydrolysates generated with trypsin. **Journal of Functional Foods**, 34, 49-58.
- Oliveira, D., Bernardi, D., Drummond, F., Dieterich, F., Boscolo, W., Leivas, C., and Waszczynskyj, N., 2017. Potential use of tuna (*Thunnus albacares*) by-product:

- production of antioxidant peptides and recovery of unsaturated fatty acids from tuna head. **International Journal of Food Engineering**, 13(7).
- Oseguera-Toledo, M.E., De Mejia, E. G., and Amaya-Llano, S.L., 2015. Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. **Food Research International**, 76, 839-851.
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., and 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(1), 238-242.
- Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R., and Motamedzadegan, A., 2010. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using Alcalase and Protamex. **International Aquatic Research**, 2(2), 87.
- Padial-Domínguez, M., Espejo-Carpio, F.J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., and Guadix, E.M., 2020. Optimization of the emulsifying properties of food protein hydrolysates for the production of fish oil-in-water emulsions. **Foods**, 9(5), 636.
- Pereira, L. M. S., Milan, T. M., and Tapia-Blácido, D. R., 2021. Using Response Surface Methodology (RSM) to optimize 2G bioethanol production: A review. **Biomass and Bioenergy**, 151, 106166.
- Pires, C., and Batista, I., 2013. Functional properties of fish protein hydrolysates. **Utilization of Fish Waste**, 59-75.
- Raghavan, S., Kristinsson, H. G., and Leeuwenburgh, C., 2008. Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, 56(21), 10359-10367.
- Rahim, A., Abbas, G., Naeem, M., Ferrando, S., Gallus, L., Khan, N., and Mateen, A., 2017. Fish Meal: Production and Quality Assessment for Aqua Feed Formulation in Pakistan. **Pakistan Journal of Zoology**, 49(1)
- Razali, A.N., Amin, A.M., and Sarbon, N.M., 2015. Antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight. **International Food Research Journal**, 22(2), 651.
- R-Biopharm, A20-P14.V9, Darmstadt, Germany.
- Roslan, J., Kamal, S.M., Yunus, M., and Abdullah, N., 2015. Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product using response surface methodology. **International Food Research Journal**, 22(3), 1117-1123.
- Samsudin, N.A., Halim, N.R.A., and Sarbon, N.M., 2018. PH levels effect on functional properties of different molecular weight eel (*Monopterus* sp.) protein hydrolysate. **Journal of Food Science and Technology**, 55(11), 4608-4614.
- Sandoval-Gallardo, J.M., Osuna-Ruiz, I., Martínez-Montaño, E., Hernández, C., Hurtado-Oliva, M.Á., Valdez-Ortiz, Á., and Ramírez-Pérez, J.S., 2020. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on biochemical and antioxidant properties of pacific thread herring (*Ophistonema libertate*) hydrolysates. **CyTA-Journal of Food**, 18(1), 392-400.
- Sarteshnizi, R.A., Sahari, M.A., Gavligi, H.A., Regenstein, J.M., Nikoo, M., and Udenigwe, C.C., 2021. Influence of fish protein hydrolysate-pistachio green hull extract interactions on antioxidant activity and inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and DPP-IV enzymes. **Food Science and Technology**, 142: 111019.

- Senapati, S.R., Xavier, K.M., Nayak, B.B., and Balange, A.K., 2017. Quality evaluation of edible fish flour prepared from Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*). **Journal of Food Processing and Preservation**, 41(3).
- Sheriff, S.A., Sundaram, B., Ramamoorthy, B., and 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(1), 19-26.
- Silva, J.F.X., Ribeiro, K., Silva, J.F., Cahú, T.B., and Bezerra, R.S., 2014. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, 196, 96-106.
- Slizyte, R., Rommi, K., Mozuraityte, R., Eck, P., Five, K., and Rustad, T., 2016. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. **Biotechnology Reports**, 11, 99-109.
- Slizyte, R., Rustad, T., and Storro, I., 2005. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. **Process Biochemistry**, 40(12), 3680-3692.
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., and Nasri, M., 2007. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. **Food Technology and Biotechnology**, 45(2), 187-194.
- Sumaya-Martínez, T., Castillo-Morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa, S., and Prado-Barragán, L.A., 2005. Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*): I. A study of hydrolysis parameters using response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 85(1), 98-104.
- Tadesse, S.A., Emire, S.A., Barea, P., Illera, A.E., Melgosa, R., Beltrán, S., and Sanz, M.T., 2023. Valorisation of low-valued ray-finned fish (*Labeobarbus nedgia*) by enzymatic hydrolysis to obtain fish-discarded protein hydrolysates as functional foods. **Food and Bioproducts Processing**, 141, 167-184.
- Taheri, A., Anvar, S.A.A., Ahari, H., and Fogliano, V., 2013. Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry by-products and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, 12(1), 154-169.
- Tekle, S., 2022. Balık Atıklarından Protein Hidrolizatlarının Üretilmesi ve Özelliklerinin Belirlenmesi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Tekle, S., Bozkurt, F., Akman, P.K., and Sagdic, O., 2022. Bioactive and Functional properties of gelatin peptide fractions obtained from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) skin. **Food Science and Technology**, 42, e60221.
- Thuy, C.X., Lam, T.B., and Mc Commick, K., 2015. Biochemical and functional properties of fish protein isolate (FPI) from pangasius hypophthalmus byproducts as influenced by time and degree of hydrolysis (DH). **International Food Research Journal**, 22(1).
- Türk Gıda Kodeksi, Yemlerde İstenmeyen Maddeler Hakkında Tebliğ, (TEBLİĞ NO: 2014/11)
<https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=19608&MevzuatTur=9&MevzuatTertip=5> Erişim tarihi: 02.02.2024.
- Ucak, I., Afreen, M., Montesano, D., Carrillo, C., Tomasevic, I., Simal-Gandara, J., and Barba, F.J., 2021. Functional and bioactive properties of peptides derived from marine side streams. **Marine Drugs**, 19(2), 71.

- Uzzaman, M.A., Bakar, J., Rahman, R.A., and Karim, R., 2018. Storage stability of spray-dried tilapia meat powder produced under optimized condition. **The Journal of Food Science and Technology**, 2, 6-14.
- Valle, B.C.S., Dantas Jr, E.M., Silva, J.F.X., Bezerra, R.S., Correia, E.S., Peixoto, S.R. M., and Soares, R.B., 2015. Replacement of fishmeal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of *L. itopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Nutrition**, 21(1), 105-112.
- Vásquez, P., Zapata, J.E., Chamorro, V.C., Fillería, S.F.G., and Tironi, V.A., 2022. Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera hydrolysates subjected to simulated gastrointestinal digestion and intestinal absorption. **Food Science and Technology**, 154, 112834.
- Wahyuningtyas, W.S., Santoso, U., Wagiman, F.X., and Ningrum, A., 2023. Functional properties of *Oryctes rhinoceros* larvae protein hydrolysates affected by different enzyme concentration and hydrolysis time. **Journal of Insects as Food and Feed**, 9(3), 339-351.
- Wali, A., Ma, H., Rashid, M.T., and Liang, Q.F., 2017. Preparation of rapeseed protein hydrolysates with ACE inhibitory activity by optimization and molecular weight distribution of hydrolysates. **Turkish Journal of Biochemistry**, 42(4), 469-479.
- Wan, P., Cai, B., Chen, H., Chen, D., Zhao, X., Yuan, H., and Pan, J., 2023. Antidiabetic effects of protein hydrolysates from *Trachinotus ovatus* and identification and screening of peptides with α -amylase and DPP-IV inhibitory activities. **Current Research in Food Science**, 6, 100446.
- Ween, O., Stangeland, J.K., Fylling, T.S., and Aas, G.H., 2017. Nutritional and functional properties of fishmeal produced from fresh by-products of cod (*Gadus morhua* L.) and saithe (*Pollachius virens*). **Heliyon**, 3(7).
- Wen, L., Bi, H., Zhou, X., Zhu, H., Jiang, Y., Ramadan, N. S., and Yang, B., 2022. Structure and activity of bioactive peptides produced from soybean proteins by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry Advances**, 1, 100089.
- Wiriaphan, C., Chitsomboon, B., and Yongsawatdigul, J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. **Food Chemistry**, 132(1), 104-111.
- Wiriaphan, C., Xiao, H., Decker, E.A., and Yongsawatdigul, J., 2015. Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration. **Food Chemistry**, 167, 7-15.
- Wisuthiphaet, N., Klinchan, S., and Kongruang, S., 2016. Fish protein hydrolysate production by acid and enzymatic hydrolysis. **Applied Science and Engineering Progress**, 9(4).
- World Health Organization (WHO). Global Status Report on Non communicable Diseases, 2022; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>. Erişim tarihi: 12.02.2024.
- Wouters, A.G., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., and Delcour, J.A., 2016. Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 15(4), 786-800.
- Xia, E.Q., Zhu, S.S., He, M.J., Luo, F., Fu, C.Z., and Zou, T.B., 2017. Marine peptides as potential agents for the management of type 2 diabetes mellitus-A prospect. **Marine Drugs**, 15(4), 88.

- Xiang, H., Waterhouse, D.S., Liu, P., Waterhouse, G.I., Li, J., and Cui, C., 2020. Pancreatic lipase-inhibiting protein hydrolysate and peptides from seabuckthorn seed meal: Preparation optimization and inhibitory mechanism. **Food Science and Technology**, 134, 109870.
- Xiao, C., Toldrá, F., Zhao, M., Zhou, F., Luo, D., Jia, R., and Mora, L., 2022. In vitro and in silico analysis of potential antioxidant peptides obtained from chicken hydrolysate produced using Alcalase. **Food Research International**, 157, 111253.
- Yang, P., Ke, H., Hong, P., Zeng, S., and Cao, W., 2011. Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. **International Journal of Food Science & Technology**, 46(12), 2460-2466.
- Yaroglu, T., ve Mehmet, G., 2007. Erzurum İli Piyasasında Tüketime Sunulan Yavru Alabalık Yemlerinde Aflatoksin B1 Varlığının Araştırılması. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 18(2), 51-58.
- Yathisha, U.G., Tanaaz, M., Bhat, I., Luckose, F., and Mamatha, B.S., 2023. Physicochemical properties and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of lipid-free ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) protein hydrolysate. **Journal of Food Science and Technology**, 60(1), 340-352.
- Yathisha, U.G., Vaidya, S., and Sheshappa, M.B., 2022. Functional properties of protein hydrolyzate from ribbon fish (*Lepturacanthus Savala*) as prepared by enzymatic hydrolysis. **International Journal of Food Properties**, 25(1), 187-203.
- Yeşilayer, N., Kaymak, İ.E., Gören, H.M., ve Karşlı, Z., 2013. Balık yemlerinde balık ununa alternatif bitkisel protein kaynaklarının kullanım olanakları. **Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi**, (4), 12-30.
- Yuan, G., Li, W., Pan, Y., Wang, C., and Chen, H., 2018. Shrimp shell wastes: Optimization of peptide hydrolysis and peptide inhibition of α -amylase. **Food Bioscience**, 25, 52-60.
- Zamorano-Apodaca, J.C., García-Sifuentes, C.O., Carvajal-Millán, E., Vallejo-Galland, B., Scheuren-Acevedo, S.M., and Lugo-Sánchez, M.E., 2020. Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species. **Food Chemistry**, 331, 127350.
- Zhang, L., Li, Q., Hong, H., and Luo, Y., 2020. Prevention of protein oxidation and enhancement of gel properties of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi by addition of protein hydrolysates derived from surimi processing by-products. **Food Chemistry**, 316, 126343.
- Zhang, S.Y., Zhao, G.X., Suo, S.K., Wang, Y.M., Chi, C.F., and Wang, B., 2021. Purification, identification, activity evaluation, and stability of antioxidant peptides from alcalase hydrolysate of Antarctic Krill (*Euphausia superba*) proteins. **Marine Drugs**, 19(6), 347.
- Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X.D., Zhong, H., Wang, S., and Zhou, Q., 2012. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. **Food Chemistry**, 134(3), 1360-1367.
- Zhou, B., Perel, P., Mensah G.A., and Ezzati M., 2021. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, 18:785–802.

- Zhou, J., Han, Q., Koyama, T., and Ishizaki, S., 2023. Preparation, Purification and Characterization of Antibacterial and ACE Inhibitory Peptides from Head Protein Hydrolysate of Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Molecules**, 28(2), 894.
- Zhu, C.F., Li, G.Z., Peng, H.B., Zhang, F., Chen, Y., and Li, Y., 2010. Treatment with marine collagen peptides modulates glucose and lipid metabolism in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, 35(6), 797-804.



ÖZGEÇMİŞ

Yazar ilkokul ve ortaokul eğitimini Bursa’da, lise eğitimini ise Konya ve Adana illerinde tamamladı. 2008 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde yükseköğrenime başladı. 2013 yılında bölümden mezun olup aynı yıl Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2016 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2017 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Teknoloji ve Ar-Ge UAM’ne öğretim görevlisi olarak atandı ve aynı yıl Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda doktora öğrenimine başladı. Halen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi’nde öğretim görevlisi olarak görev yapmaktadır.

