

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**BALIK ATIKLARINDAN HİDROLİZE KOLAJEN ÜRETİMİ VE
HİDROLİZATLARIN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN VE BAZI
KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Onur BASANÇELEBİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2024

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**BALIK ATIKLARINDAN HİDROLİZE KOLAJEN ÜRETİMİ VE
HİDROLİZATLARIN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN VE BAZI
KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Onur BASANÇELEBİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BALIK ATIKLARINDAN HİDROLİZE KOLAJEN ÜRETİMİ VE
HİDROLİZATLARIN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN VE BAZI
KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Onur BASANÇELEBİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından FDK-2023-6222 no.lu proje ile desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BALIK ATIKLARINDAN HİDROLİZE KOLAJEN ÜRETİMİ VE
HİDROLİZATLARIN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN VE BAZI
KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Onur BASANÇELEBİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 25.07.2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Muharrem CERTEL (Danışman)
Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU
Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN
Prof. Dr. Yahya TÜLEK
Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER

ÖZET

BALIK ATIKLARINDAN HİDROLİZE KOLAJEN ÜRETİMİ VE HİDROLİZATLARIN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN VE BAZI KARAKTERİSTİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Onur BASANÇELEBİ

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr.Muharrem CERTEL

Temmuz 2024; 105 sayfa

Bu tezin amacı; balık işleme tesislerinde atık ürün olarak ortaya çıkan balık atıklarının değerlendirilerek bu atıklardan hidrolize kolajen üretimi, biyoaktif bileşik ekstraksiyonu ve hidrolize peptitlerin bazı karakteristik özelliklerinin belirlenmesine ilişkin kapsamlı bir araştırma yapmaktır.

Bu doktora tezi kapsamında, kaynak materyal olarak palamut ve çipura balıklarının kafatası ve iç organlarının toplamından oluşan balık atıklardan yararlanılmıştır. Palamut balığı için literatür verileri değerlendirildiğinde söz konusu materyalin kafatası ve iç organ atıklarının toplamından hidrolize kolajen peptitleri (HKP) elde etme üzerine yapılmış bilğimiz dahilinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çipura balığının ise baş bölgesinde alkalaz enzimi kullanılarak yapılan bir çalışma (Erol vd. 2017) olmasına rağmen; bu doktora tezinde izlenen yol; kaynak materyal, enzim konsantrasyonları, çözeltinin enzim ilavesine hazırlanış şekli, hidroliz şartları ve hidroliz süresi gibi birçok açıdan farklıdır.

Uygulanan işlemlerin sırası açısından enzimatik yöntem ve asidik yöntem olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmıştır. Her bir yöntemde alkalaz ve pepsin enzimleri ayrı ayrı olarak ve değişen konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Bu şekilde belli koşullarda ekstraksiyon ve hidroliz işlemleri ile gerçekleştirilerek balık atıklarından asit çözümlü kolajen (AÇK) ve HKP elde edilmiştir. Böylelikle kullanılmadan atılan balık atıkları değerlendirilmiş ve bu kısımlardan fonksiyonel etkili bileşikler elde edilmiştir.

Palamut atıklarından ortalama %10,50 AÇK, çipura atıklarından ise ortalama %14,51 AÇK elde edilmiştir. Moleküler ağırlık analizlerinde AÇK numunelerinin 130 kDa ile 250 kDa aralığında yer aldığı ve AÇK numunelerinin moleküler ağırlıklarının hidroliz işlemi ile 10 kDa ağırlığının altına düşürülebileceği tespit edilmiştir. Meydana gelen hidrolize peptitlerin moleküler ağırlıklarının genel olarak 10 kDa ile 55 kDa aralığında dağılım gösterdiği tespit edilmiştir.

Antioksidan analizlerinin sonuçlarına göre AÇK numunelerinin radikal süpürücü aktivitelerinin (RSA) sınırlı olduğu tespit edilmiştir. Fakat AÇK numunelerinin hidrolizi ile ortaya çıkan HKP numunelerinde RSA'nın arttığı tespit edilmiştir. Hidrolizatlardaki antioksidatif etkinin artışı ise önemli düzeyde meydana gelmiş olup AÇK numunesine kıyasla çipura HKP numunelerinde %594,181 oranına kadar artış gerçekleşmiştir. HKP

numunelerindeki en yüksek ortalama RSA değerleri incelendiğinde; en fazla antioksidan kapasitenin enzimatik yöntemde alkalaz enzimi ile ipura balık atıklarında ABTS radikali ile ortaya çıkarılabileceği tespit edilmiştir.

Palamut ve ipura atıklarından elde edilen HKP numunelerinin çözünürlük değerleri, AK numuneleri ile kıyaslandığında önemli oranda artış meydana getirmiştir. En yüksek çözünürlük özelliği gösteren HKP numunesi, %98,351 oranı ile palamut atıklarından %1,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat olmuştur.

HKP numunelerinde 25,498 m²/g düzeyine kadar değişen Emülsiyon Aktivite İndeksi (EAI) değerlerinin elde edildiği tespit edilmiştir. Enzimatik yöntemde Emülsiyon Stabilite İndeksi (ESI) değerlerinin ise 56 dakikaya kadar çıkabildiği belirlenmiştir.

Enzimatik yöntemde %88,571 düzeyine kadar, asidik yöntemde ise %98,113 düzeyine kadar hidrolizatlardan Köpük Genişlemesi (KG) zelliği elde edilmiştir. En yüksek KG değerinin, asidik yöntemle ipura atıklarından %1 pepsin enzimi ile elde edildiği tespit edilmiştir. Köpük Stabilitesi (KS) değerlerinin ise %28,571'e varan oranlarda meydana geldiği ve en yüksek KS değerinin, ipura balığı atıklarından %0,5 pepsin enzimi ile elde edildiği tespit edilmiştir.

Bu doktora tezi ile elde edilen kolajen bazlı hidrolize peptitlerin, fonksiyonel gıda bileşenleri olarak çeşitli gıda ürünlerinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmanın, atık yönetimi için yenilikçi çözümler arayan endüstriler için önemli çıkarımlar sunacağına; somut sağlık ve ticari faydalar sağlayan katma değerli ürünlerin geliştirilmesine dair bilgiler sağlayacağına inanılmaktadır.

ANAHTAR KELİMELEER: Asit znr kolajen, Balık atıkları, Hidrolize kolajen peptitleri, Kolajen hidrolizati

JÜRİ: Prof. Dr. Muharrem CERTEL
Prof. Dr. Nalan GöKOğLU
Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN
Prof. Dr. Yahya TLEK
Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER

ABSTRACT

PRODUCTION OF HYDROLYZED COLLAGEN FROM FISH WASTE AND DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITIES AND SOME CHARACTERISTIC PROPERTIES OF HYDROLYSATES

Onur BASANÇELEBİ

PhD Thesis in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

July 2024; 105 pages

The aim of the thesis is to evaluate the fish waste products emerged in fish processing plants and conduct a comprehensive research on the production of hydrolyzed collagen from these wastes, the extraction of bioactive compounds and the determination of some characteristic properties of hydrolyzed peptides.

Within the scope of this doctoral thesis, fish waste consisting of the skull and internal organs of bonito and sea bream fish were used as source material. When the literature data for bonito fish is evaluated, to the best of our knowledge, there is no study on obtaining hydrolyzed collagen peptides (HCPs) from the sum of the skull and internal organ wastes of the material. Although there is a study (Erol et al. 2017) using alcalase enzyme in the head region of sea bream; the path to be followed in this thesis differed in many aspects such as type of waste material, enzyme concentrations, the way of prepared solution for enzyme addition, hydrolysis conditions and hydrolysis time.

In terms of the order of the applied processes, two different methods were used: the enzymatic method and the acidic method. In each method, alcalase and pepsin enzymes were used separately and in varying concentrations. In this way, acid soluble collagen (ASC) and HCPs were obtained from fish waste by extraction and hydrolysis processes under certain conditions. Thus, fish wastes that were discarded without being used were evaluated and functional effective compounds were obtained from these parts.

An average of 10,50% ASC was obtained from bonito waste and an average of 14,51% AÇK was obtained from sea bream waste. In molecular weight analyses, it was determined that the ASC samples were between 130 kDa and 250 kDa and that the molecular weight of the ASC samples could be reduced below 10 kDa by hydrolysis. It has been determined that the molecular weights of the resulting hydrolyzed peptides generally range between 10 kDa and 55 kDa.

According to the results of antioxidant analyses, it was determined that the radical scavenging activities (RSA) of ASC samples were limited. However, it was determined that RSA increased in HCP samples obtained by hydrolysis of ASC samples. The increase in the antioxidative effect in hydrolysates was significant, with an increase of up to 594,181% in sea bream HCP samples compared to the ASC sample.

When the highest average RSA values in HCP samples are examined; it has been determined that the highest antioxidant capacity can be revealed in sea bream fish waste by the alcalase enzyme in the enzymatic method.

The solubility values of HCP samples obtained from bonito and sea bream waste increased significantly compared to ASC samples. The HCP sample showing the highest solubility was the hydrolyzate obtained from bonito waste with 1,5% alcalase enzyme, with a rate of 98,351%.

Emulsion Activity Index (EAI) values up to 25,498 m²/g were obtained in HCP samples. It has been determined that in the enzymatic method, Emulsion Stability Index (ESI) values can increase up to 56 minutes.

Foam Expansion (FE) property was obtained from hydrolysates up to 88,571% in the enzymatic method and up to 98,113% in the acidic method. It was determined that the highest FE value was obtained with 1% pepsin enzyme from sea bream waste using the acidic method. Foam Stability (FS) values were up to 28,571% and the highest FS value was obtained with 0,5% pepsin enzyme from sea bream fish waste.

Collagen-based hydrolyzed peptides explained in this doctoral thesis can be used in various food products as functional food ingredients. We believe that this study will provide important implications for industries seeking innovative solutions for waste management. It is believed that it will provide insights into the development of value-added products that provide tangible health and commercial benefits.

KEYWORDS: Acid soluble collagen, Collagen hydrolysate, Fish waste, Hydrolyzed collagen peptides

COMMITTEE: Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU

Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN

Prof. Dr. Yahya TÜLEK

Prof. Dr. Erdoğan KÜÇÜKÖNER

ÖNSÖZ

Dünya çapında gelişen trendler arasında bir süredir önemini koruyan sürdürülebilirlik kavramı, günden güne hayatımızda daha fazla yer almaktadır. Sürdürülebilirliğin kilit noktası, sınırlı kaynaklara sahip olan yeryüzünde ekosistemin dengesini bozmadan işleyişin devam ettirilmesini sağlamaktır. Ekosistemin dengesini bozmamak ise olabildiğince az atık üretmek ve ortaya çıkan atıklardan maksimum düzeyde istifade etmeyi gerektirir. Gıda endüstrisinde de diğer alanlarda olduğu gibi sürdürülebilirliğe katkı sağlayan uygulamaların geliştirilmesi bir ihtiyaçtır. Bu açıdan balıkçılık sektöründe tüketilmeyen ve atık olarak uzaklaştırılan yan ürünlerden fayda sağlamak oldukça önem kazanmıştır. Bu yan ürünler, kimyasal yapılarında biyoaktif özellikli çeşitli maddeler içermektedirler. Bu maddelerin açığa çıkarılarak bunlardan çeşitli alanlarda istifade edilmesi birçok açıdan avantajlıdır. Bu çalışmada değerlendirilmeden atılan çeşitli yan ürünlerin, gıda endüstrisinde kullanabilmesinin önünü açacak bilgilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda; çeşitli bilimsel analizler ve deneyler gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerle alakalı olarak birtakım değerlendirmelerde bulunulmuştur.

Bu çalışmanın her aşamasında yanımda olan ve yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Muharrem CERTEL'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmaya dair fikirler veren ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Numan HODA'ya, Prof. Dr. Nalan GÖKOĞLU'na, Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e, Prof. Dr. Mehmet İNAN'a ve Doç. Dr. Cüneyt DİNÇER'e şükranlarımı sunarım. Tezin oluşturulması sırasında her daim desteklerini hissettiren değerli hocalarım Doç. Dr. Rena MARALI'ya, Doç. Dr. Emriye AY'a, Doç. Dr. Mustafa CÜCE'ye, Dr. Öğr. Üyesi Muhammet DEMİRBAŞ'a ve Prof. Dr. Birsen Şengül OKSAL'a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmaları aşamasında kıymetli katkılarından dolayı Öğr. Gör. Nisa DURAK'a, Arş. Gör. Fatma ERSÖZ'e, Ayça URAS'a ve Öğr. Gör. Emrah EROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca desteklerinden dolayı Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne, Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi'ne, Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne ve Giresun Üniversitesi Şebinkarahisar Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Kolajen ve Önemi.....	4
2.2. Kolajen Kaynağı Olarak Balık Atığı.....	4
2.3. Kolajen ve Hidrolize Kolajen Peptitleri Üretimi.....	5
2.4. Verim.....	6
2.5. Moleküler Ağırlık.....	7
2.6. Antioksidan Kapasite	8
2.7. Bazı Karakteristik Özelliklerin Belirlenmesi	11
2.7.1. Çözünürlük	11
2.7.2. Emülsiyon Oluşturma.....	13
2.7.3. Köpük Oluşturma	14
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Materyal.....	16
3.2. Metot	16
3.2.1. Asit çözünür kolajenin elde edilmesi	17
3.2.2. Asidik yöntemle balık kolajen hidrolizatının elde edilmesi	19
3.2.3. Enzimatik yöntemle balık kolajen hidrolizatının elde edilmesi	20
3.2.4. Verim Değerinin Hesaplanması	23
3.2.5. Moleküler Ağırlık Düzeyinin Hesaplanması.....	24
3.2.6. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi	25
3.2.7. Bazı Karakteristik Özelliklerin Belirlenmesi	29
3.2.7.1. Çözünürlük Özelliğinin Belirlenmesi.....	29
3.2.7.2. Emülsiyon Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi	31

3.2.7.3. Köpük Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi.....	32
3.2.8. İstatistiksel Yöntemler.....	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
4.1. Balık kolajeni ve hidrolizatlarının elde edilmesi.....	34
4.2. Verim Değerinin Hesaplanması	34
4.3. Moleküler Ağırlık Düzeyinin Hesaplanması.....	35
4.4. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi	42
4.5. Bazı Karakteristik Özelliklerin Belirlenmesi	52
4.5.1. Çözünürlük Özelliğinin Belirlenmesi.....	52
4.5.2. Emülsiyon Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi	58
4.5.3. Köpük Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi.....	63
5. SONUÇLAR	71
6. KAYNAKLAR	75
7. EKLER.....	81
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Balık Atıklarından Hidrolize Kolajen Üretimi ve Hidrolizatların Antioksidan Aktivitelerinin ve Bazı Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi**” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

25 / 07 / 2024

Onur BASANÇELEBİ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: yüzde
°C	: derece Celcius
g	: gram
mg	: miligram
L	: litre
ml	: mililitre
M	: molar
N	: normalite
No	: numara
rpm	: devir sayısı / dakika
s	: saniye
µm	: mikrometre
kDa	: kilodalton
,	: ondalık ayırıcı

Kısaltmalar

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

AÇK: Asit Çözünür Kolajen (ASC: Acid Soluble Collagen)

ANOVA : Varyans analizi (Analysis of variance)

CAS: Chemical Abstracts Service

DNA : Deoksiriboz nükleik asit

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

EAI: Emülsiyon Aktivite İndeksi

EC: Enzyme Commission (Enzim Komisyonu)

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

ESC: Enzyme Soluble Collagen (Enzim Çözünür Kolajen)

ESİ: Emülsiyon Stabilite İndeksi

FDA: Food and Drug Administration (Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi)

GRAS: Generally Recognized as Safe List (Genellikle Güvenli Kabul Edilir Listesi)

HKP: Hidrolize Kolajen Peptitleri

HPLC: High-performance liquid chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)

IC₅₀: Radikalin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon

KG : Köpük Genişlemesi

KS: Köpük Stabilitesi

PÇK: Pepsin-Çözünür Kolajen

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid-Jel Elektroforezi

SSC: Salt Soluble Collagen (Tuzda çözünür kolajen)

TE: Trolox Eşdeğeri

Trolox: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Asit çözünür kolajenin ekstraksiyon aşamaları	19
Şekil 3.2. Enzimatik yöntem kullanılarak HKP numunelerinin elde edilmesi aşamaları	23
Şekil 3.3. AÇK ve HKP numunelerinin moleküler ağırlık düzeyinin tayin edilmesi aşamaları	25
Şekil 3.4. DPPH yönteminde zaman geçtikçe renk kaybına uğramış olan analitik numuneler	26
Şekil 3.5. ABTS yönteminde zaman geçtikçe renk kaybına uğramış olan analitik numuneler	26
Şekil 3.6. Hidrolizat numunelerinin bipiridil metal çelatlama yönteminde giderek artan şiddette karakteristik renk oluşturmaması	28
Şekil 3.7. Demir indirgeme yöntemindeki reaksiyon ortamında hidrolizat numunelerinin çökelti oluşturmaması	28
Şekil 3.8. Enzimatik yöntemle elde edilen hidrolizatların Folin Ciocalteu fenol reaktifi indirgeme yöntemi ile antioksidan aktivitelerinin tespitine dair yapılan çalışma	29
Şekil 3.9. AÇK ve HKP numunelerinin çözünürlük özelliğinin tayin edilmesi aşamaları	31
Şekil 3.10. AÇK ve HKP numunelerinin emülsiyon oluşturma özelliğinin tayin edilmesi aşamaları	32
Şekil 3.11. AÇK ve HKP numunelerinin köpük oluşturma özelliğinin tayin edilmesi aşamaları	33
Şekil 4.1. Palamut ve çipura balık atıklarından elde edilmiş olan AÇK moleküler ağırlıklarını gösteren SDS-PAGE görüntüsü	36
Şekil 4.2. Palamut ve çipuranın enzimatik (alkalaz) ekstraksiyonu ile elde edilen hidrolizatlarının SDS-PAGE jel görüntüsü	37
Şekil 4.3. Palamut ve çipuranın enzimatik (pepsin) ekstraksiyonu ile elde edilen hidrolizatlarının SDS-PAGE jel görüntüsü	38
Şekil 4.4. Palamut ve çipuradan asidik yöntem (alkalaz) aracılığıyla elde edilmiş olan hidrolizatlarının SDS-PAGE jel görüntüsü	39
Şekil 4.5. Palamut ve çipuradan asidik yöntem (pepsin) aracılığıyla elde edilmiş olan hidrolizatlarının SDS-PAGE jel görüntüsü	40

Şekil 4.6. Hidrolizatların 0.45 µm filtrelerden geçirilmesi işlemi	42
---	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışma sırasında uygulanan deneme deseni	21
Çizelge 4.1. AÇK numunelerinin DPPH ve ABTS radikali süpürme etkinlikleri.....	43
Çizelge 4.2. Enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin DPPH radikali üzerindeki antioksidan kapasitesi.....	45
Çizelge 4.3. Enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin ABTS radikali üzerindeki antioksidan kapasitesi.....	46
Çizelge 4.4. Asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin DPPH radikali üzerindeki antioksidan kapasitesi.....	47
Çizelge 4.5. Asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin ABTS radikali üzerindeki antioksidan kapasitesi	48
Çizelge 4.6. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin çözünürlük değerleri (%)	53
Çizelge 4.7. Palamut ve çipura HKP numunelerinin çözünürlük değerleri (%).....	54
Çizelge 4.8. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin emülsiyon aktivite indeksi değerleri (EAI) (%)	58
Çizelge 4.9. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin emülsiyon stabilite indeksi değerleri (ESI) (%).....	58
Çizelge 4.10. Enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin “Emülsiyon Aktivite İndeksi” ve “Emülsiyon Stabilite İndeksi” değerleri	60
Çizelge 4.11. Asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin “Emülsiyon Aktivite İndeksi” ve “Emülsiyon Stabilite İndeksi” değerleri	61
Çizelge 4.12. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin KG değerleri (%).....	63
Çizelge 4.13. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin KS değerleri (%)	64
Çizelge 4.14. Enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin KG ve KS değerleri	65
Çizelge 4.15. Asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin KG ve KS değerleri ...	66

1. GİRİŞ

Gıda endüstrisindeki balıkçılık sektörü, ülkemizde ve dünyanın çeşitli ülkelerinde ekonomik anlamda ve beslenme açısından önemli bir yer tutar. Sektörün ihtiyacını karşılamak üzere gerçekleştirilen dünya balık üretiminin 2030 yılına kadar 204 milyon tona çıkması beklenmektedir (Lee vd. 2022). Endüstride veya daha küçük çaplı deniz ürünleri dükkanlarında deniz ürünlerinin işlenmesi sırasında, kullanılmayan veya yeterince değerlendirilmeyen büyük miktarlarda (%35-45) atık ürün ortaya çıkmaktadır. Söz konusu atık ürünler, potansiyel nutrasötik/fonksiyonel özelliklere sahip zengin bir biyoaktif kolajen kaynağıdır (Pal ve Suresh 2016). Bu atıkların biyoaktif bileşen kaynağı olarak değerlendirilmesi; hem atık bertarafıyla ilgili çevresel kaygıların giderilmesine katkı sunar; hem de sürdürülebilir kaynak kullanımı ve ekonomik kalkınma için bu durum çeşitli imkanlar sağlar.

Ticari üretim süreçlerinde kullanılan kolajen; genellikle sığır, domuz ve tavuk gibi karasal organizmalardan elde edilmektedir (Chen vd. 2016). Bununla birlikte; son yıllarda kuş gribi, deli dana hastalığı, şap hastalığı ve diğer bulaşıcı hastalıkların görülme sıklıklarının artışı nedeniyle, kara hayvanlarından kolajen ekstraksiyonu artan bir hastalık riskini beraberinde getirmektedir (^aJongjareonrak vd. 2005). Dini sebeplerle ve tüketiciler ile ilgili durumlar nedeniyle, bazı topluluklarda ve bazı bölgelerde domuz kolajeni kullanımı yasaklanmıştır (Ahmad ve Benjakul 2010). Bu nedenle, günümüzde araştırmacılar yeni kolajen kaynakları aramaya odaklanmışlardır. Ayrıca; deniz canlılarından elde edilen kolajen miktarının, oransal olarak kara hayvanlarına kıyasla daha fazla olduğu bildirilmektedir. Bu gibi sebeplerden ötürü balık kolajenlerinden elde edilen antioksidan özelliklere sahip biyoaktif peptitler, gıda ve sağlık alanında büyük ilgi gören bir konu haline gelmiştir (Wang et al. 2020). Antioksidan kapasitesinin yanı sıra biyoaktif peptitlerin önemli ölçüdeki çözünürlük, emülsiyon oluşturma ve köpük oluşturma özelliklerine dair çeşitli çalışmalar dikkati çekmektedir (Pires ve Batista 2013; Zamorano-Apodaca vd. 2020; González-Serrano vd. 2022). Özellikle daha düşük moleküler ağırlıklara sahip peptitlerde söz konusu olumlu fonksiyonel etkilerin daha fazla ortaya çıktığı bildirilmektedir (Pires ve Batista 2013; Zhang vd. 2019; Nurilmala vd. 2020).

Bu doktora tezine konu olan hidrolize peptitlerin kaynağı kolajen proteini olup bu peptitler literatürde “hidrolize kolajen peptitleri”, “kolajen hidrolizati” ve “hidrolize kolajen” gibi farklı isimlerle ifade edilebilmektedir. Ayrıca kolajenin elde edildiği ana materyal olarak deniz ürünlerinin kullanıldığı çalışmalarda bu peptitlere “deniz kolajeni peptitleri”; ana materyal olarak balıkların kullanıldığı çalışmalarda bu peptitlere “balık kolajen hidrolizati” gibi isimlerin verilebildiği görülmüştür. Bu açıdan kullanılacak olan terimler, yaklaşık olarak birbirleriyle aynı anlamı taşımakta olup bu tezde ağırlıklı olarak hidrolize kolajen peptitleri (HKP) ifadesi kullanılmıştır.

Balık protein hidrolizatları, nutrasötik özellikte biyoaktif peptitler içermektedirler. Bu peptitlerin; iltihaplanmaya, hipertansiyona, kolesterol yüksekliğine, kanın damar içerisinde pıhtılaşmasına ve kansere karşı koruyucu etkileri bildirilmektedir (Khiari vd. 2014). Bu olumlu etkilerin yanı sıra, hidrolize peptitlerin bağışıklık sisteminin gücünü düzenleyici ve oksidatif stresi engelleyici etkilere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir (Korkmaz vd. 2021, Felician vd. 2018, Wang vd. 2020). Kolajen peptitlerinin oral tüketiminin vücut için bazı yararlı etkiler

sağladığı bildirilmektedir (Felician vd. 2018). Örneğin, bir gıda takviyesi olarak kolajen peptitlerinin oral yolla alınması sonucunda, yetersiz beslenme ve dejeneratif eklem hastalıklarından muzdarip kişilerde düşük kemik mineral yoğunluğunun iyileştirebileceği; cildin yaşlanmasına bağlı olarak ciltte azalan kolajen miktarının artırılabilmesi; ince saç tellerinin kalınlaştırılabileceği, kırılğan tırnaklar gibi tırnak bozukluklarını iyileştirebileceğini ve aşıl tendonundaki kolajen fibrillerinin boyutunun artırılabilmesi ifade edilmektedir (Felician vd. 2018). Düşük kemik mineral yoğunluğunun iyileştirilmesine katkı sağlama özelliği, özellikle kadınların ilerleyen yaşlarda yaşadığı osteoporoz rahatsızlığının azaltılması açısından önemli bir husustur.

Oksidasyon, gıdalarda ransidite meydana getirerek söz konusu maddede organoleptik kusurlardan besin değeri kayıplarına hatta toksik bileşiklerin ortaya çıkmasına kadar çeşitli olumsuz sonuçlara neden olur. Lipidlerin oksidasyon reaksiyonuna yatkınlığı, özellikle lipid oksidasyonunu önemli kılar. Lipid oksidasyon ürünleri; kardiyovasküler rahatsızlıklar, artrit, akciğer rahatsızlıkları, göz hastalıkları, diyabet, Parkinson, Alzheimer ve kanser gibi birçok patofizyolojik durumla ilişkilendirilmiştir (Felician vd. 2018). Bu açıdan oksidasyon ürünlerinin oluşumunu engelleyen/azaltan; diğer bir ifade ile antioksidatif özellikler gösteren maddelerin çalışılması günümüzde oldukça önemlidir. Deniz kolajen peptitlerinin çoğu; serbest radikalleri temizleme ve DNA'yı radikallerin neden olduğu hasardan koruma yeteneklerine sahip olan antioksidanlar olarak kabul edilirler (Felician et al. 2018).

Hidrolize kolajen peptitler, içerdikleri elzem veya elzem olmayan çeşitli amino asitlerden dolayı gıdaların biyolojik değerini artırabilme özelliğindedirler. Bu peptitler; gıdalarda çözünerek, emülsiyon oluşturarak veya köpük oluşturarak bu etkiyi sağlayabilmektedirler. Bunun yanı sıra; söz konusu peptitler genel anlamda gıdaların çözünürlük özelliklerini, emülsiyon oluşturma özelliklerini ve köpük oluşturma özelliklerini değiştirerek gıdaların fizikokimyasal özelliklerini olumlu anlamda etkilemektedirler (Pires ve Batista 2013). Gıda endüstrisinde fonksiyonel gıda katkı maddelerine her zaman ihtiyaç duyulmaktadır. Elde edilen hidrolize peptitler; kimyasal koruyucuların kullanımını azaltan, güvenli ve yeşil gıda ürünleri için tüketici taleplerini karşılayabilen doğal antioksidanlar ve tekstüre edici maddeler olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptirler (Pal ve Suresh 2016).

Bu tezin amacı; balık işleme tesislerinde atık ürün olarak ortaya çıkan balık atıklarının değerlendirilerek bu atıklardan hidrolize kolajen üretimi, atık değerlendirilmesi, biyoaktif bileşik ekstraksiyonu ve hidrolize peptitlerin bazı karakteristik özelliklerinin belirlenmesine ilişkin kapsamlı bir araştırma yapmaktır. Söz konusu amaca ulaşmak için farklı balık kaynaklarından iki farklı ekstraksiyon yöntemi, iki farklı enzim uygulaması ve söz konusu enzimlerin üç farklı konsantrasyondaki hidrolizleri gerçekleştirilmiştir. Hidrolize peptitlerin kaynağı, balık atıklarının yapısında bulunan kolajen proteindir. Kolajen proteini, çeşitli balıkların iç organları ve kafa kısımlarının toplamı olarak balık atıklarından elde edilmiştir. Böylelikle kullanılmadan atılan balık atıkları değerlendirilmiş ve bu kısımlardan fonksiyonel etkili bileşikler elde edilmiştir. Bu çalışmanın, atık yönetimi için yenilikçi çözümler arayan endüstriler için önemli çıkarımlar sunacağına; somut sağlık ve ticari faydalar sağlayan katma değerli ürünlerin geliştirilmesine dair bilgiler sağlayacağına inanılmaktadır.

Bu doktora tezi kapsamında yapılan çalışmaların önceki çalışmalardan farklı yönleri şunlardır: Ülkemizde önemli ölçüde tüketilen balık türlerinden çipura ve palamut balık atıklarının çalışılmasına karar verilmiştir. Bu kararın alınmasında kaynak materyallerinin ülkemizdeki tüketim sıklıklarının yanı sıra; materyallerin daha önceden aynı şartlarda, aynı parametrelerle çalışılmamış olmasına dikkat edilmiştir. Çalışma sırasında iki farklı yöntem kullanılmış olup yöntemlerin farklılığından kaynaklı olarak ortaya çıkan fonksiyonel etkilerin kıyaslanması mümkün olmuştur. Literatürde çipura balığının baş bölgesinde alkalaz enzimi kullanılarak yapılan bir çalışma (Erol vd. 2017) olmasına rağmen; bu doktora tezinde izah edildiği gibi izlenen yol, Erol vd. (2017)'ne yakın gibi görünmekle birlikte önemli oranda farklılıklar taşımaktadır. Örneğin bu çalışmadaki kaynak materyal; çipura balığının kafatası ve iç organ atıklarının toplamı şeklinde olup enzim konsantrasyonları, çözeltinin enzim ilavesine hazırlanış şekli, hidroliz şartları ve hidroliz süresi gibi noktalardaki uygulamalar söz konusu çalışmadan farklıdır. Bu doktora tezi kapsamındaki diğer kaynak materyal olan palamut için literatür verileri değerlendirildiğinde ise söz konusu materyalin kafatası ve iç organ atıklarının toplamından HKP elde etme üzerine yapılmış bilgimiz dahilinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen uygulamaların sonucunda çeşitli hidrolize peptitler elde edilmiştir ve elde edilen hidrolize peptitlerin verimi, moleküler ağırlık düzeyleri, antioksidan kapasiteleri, çözünürlük özellikleri, emülsiyon oluşturma özellikleri ve köpük oluşturma özellikleri ile ilgili birtakım bulgular ortaya konmuştur. Bu çalışma ile ortaya konan bulgular, çalışmanın kendi içerisinde ve literatürden elde edilen veriler ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Farklı kaynak materyallerden elde edilen kolajen peptitlerinin; hangi yöntem ile, hangi enzim ile, hangi enzim konsantrasyonunda optimum fonksiyonel faydalar sağlayacağı tespit edilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Kolajen ve Önemi

Kolajen, omurgalılarda en çok bulunan protein yapıdır ve toplam protein içeriğinin yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır (Abdollahi vd. 2018). Çoğunlukla kıkırdak, kemikler, dişler, tendonlar, bağlar ve deri gibi çeşitli bağ dokularında bulunmaktadır. Kolajen hücre dışı matrisinin ana bileşeni olup vücudun çeşitli kısımlarına güç ve esneklik sağlamaktadır (Sugiharta vd. 2023). Kolajen ayrıca kornealarda, kan damarlarında, bağırsaklarda, intervertebral disklerde ve dişlerdeki dentinde bol miktarda bulunmaktadır. Kolajen, kemik ve cilt komplikasyonlarının tedavisinde birçok tıbbi kullanıma sahiptir (Wikipedia 2022).

Günümüze kadar en az 29 farklı tip kolajen tanımlanmıştır (Chen vd. 2016). En bol bulunan kolajen tipleri, yapı iskelesini sağlayan ve hücrelerin göç etmesine, çoğalmasına, farklılaşmasına yardımcı olan tip I, tip II ve tip III kolajendir (Kulkarni ve Maniyar 2020). Her kolajen tipinin kendine özgü bir protein yapısı ve amino asit dizisi vardır (Chen vd. 2016).

Kolajen molekülü genel itibariyle, içerisinde Gly-X-Y- şeklinde tekrar eden bir yapı bulundurmaktadır. Zincir içi ve zincirler arası hidrojen bağıyla stabilize edilen bu özel yapıda X çoğunlukla prolin ve Y ise çoğunlukla hidroksiprolinden oluşmaktadır. Kolajen fibrilleri arasında bulunan kovalent bağlar ise yapıyı güçlendirmektedir. Böylece deri, tendon ve kemiklerin tipik güçlü ve sert doğası, söz konusu bu bağlar sayesinde ortaya çıkmaktadır (Gómez-Guillén vd. 2011).

Deniz kolajeni, FDA (*Food and Drug Administration*) tarafından GRAS (*Generally Recognized as Safe*) olarak kabul edilen makul bir kaynaktır (Raman ve Gopakumar 2018). Balık pullarından elde edilen tip I kolajen, üç polipeptit α zincirinden meydana gelir (Cardoso vd. 2014). Tip I kolajen, çeşitli kolajen proteinleri arasında en yaygın olanı olup gıda, biyomedikal malzemeler, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde kullanılmaktadır (Sinthusamran vd. 2013).

2.2. Kolajen Kaynağı Olarak Balık Atığı

Doğrudan insan tüketimi için önemli olan balık ve balık ürünleri üretimine ek olarak, kolajen gibi biyoaktif molekül içerikleri nedeniyle yan ürünlerin kullanımı dünyada giderek daha fazla ilgi görmektedir. Yan ürünlerden olan ve genellikle değerlendirilmeyip atık olarak uzaklaştırılan balıkların çeşitli kısımları az veya çok oranda kolajen proteini içermektedir. Kolajen hayvansal proteinler içerisinde en bol bulunan proteindir ve hayvan dokularından izole edilerek elde edilir. Araştırmacılar, doğal polimerlerin temini için günümüzde deniz ekosistemine daha fazla ilgi göstermektedir.

Balıklardan atık olarak uzaklaştırılan kısımlar; deri, kılçık, kafa, iskelet, yüzgeç, kuyruk, iç organlar gibi kısımlardır. Bu kısımlar için kaynak materyal olarak, literatürde özellikle bazı balık türlerinden yararlanıldığı bildirilmektedir. Bu balık türlerine; *Rachycentron canadum*, *Esox lucius*, *Spotless smooth hound*, *Sciaenops ocellatus*, *Sardinella fimbriata*, *Coryphaena hippurus*, *Alaska pollock*, *Takifugu flavidus*, *Pacu*,

Labeo rohita, *Labeo catla*, *Tuna*, *Thunnus obesus*, *Scomber japonicus*, *Gadus morhua*, *Prionace glauca*, *Cichla ocellaris*, *Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus*, *Trachurus japonicus*, *Saurida spp.*, *Mugil cephalis*, *Cypselurus melanurus*, *Dentex tumifrons* ve *Priacanthus tayenus* türleri örnek olarak verilebilmektedir (Thuy vd. 2014, Kittiphattanabawon vd. 2005, Rajabimashhadi vd. 2023). Söz konusu balıklar açısından çeşitli literatür çalışması örnekleri bu tezin ilerleyen kısımlarında sunulmuştur.

2.3. Kolajen ve Hidrolize Kolajen Peptitleri Üretimi

Balık atıklarından kolajen ve kolajen hidrolizatları üretimi son yıllarda büyük ilgi görmüştür (Bhagwat ve Dandge 2016). Kolajen ekstraksiyonu için çeşitli yöntemler vardır. Bu yöntemlere göre elde edilen kolajen tipleri; tuz çözünür kolajen (SSC), asit çözünür kolajen (ASC, AÇK) ve enzim çözünür kolajen (ESC) gibi farklı isimlerle adlandırılabilir. Kolajenin özellikleri ve geri kazanımı, kolajen ekstraksiyon yönteminden doğrudan etkilenir (Pal ve Suresh 2016). Bu açıdan hangi ekstraksiyon yönteminin kullanılarak optimum faydanın sağladığını bulabilmek önemli bir noktadır.

Birçok çalışma kolajenin bir asit yardımıyla kaynak materyal içerisinde ekstrakte edilmesine dayanmaktadır. Bu şekilde ekstrakte edilen kolajen, AÇK olarak isimlendirilmektedir. Ekstraksiyon için hidroklorik asit, asetik asit, sitrik asit, laktik asit gibi çeşitli asitlerin kullanılabilme imkânı olsa da en çok verimin alınabildiği asetik asit bu amaçla ekseriyetle kullanılan asit olmaktadır (Pei vd. 2019). Asit ekstraksiyonu yöntemi genellikle düşük sıcaklık derecelerinde (+4°C civarları) gerçekleştirilerek kolajen yapısının jelatin formuna dönüşmeden asli yapısını korunması amaçlanmaktadır.

Bir protein yapı olan kolajenin çeşitli enzimlerin kullanımı yoluyla daha küçük parçalara ayrılabilmesi mümkündür. Çeşitli enzimler kullanılarak gerçekleştirilen enzimatik hidroliz, kolajen moleküllerinin peptitlere kontrollü bir şekilde bölünmesini sağlayan önemli bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, balık atıklarından HKP elde etmek için çeşitli ekstraksiyon yöntemlerini araştırmıştır (Chalamaiah ve diğerleri, 2012). Ortaya çıkan peptitlerin büyüklükleri; enzim türü, kullanılan enzim miktarı, hidroliz sıcaklığı, karıştırma hızı ve hidroliz süresi gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak şekillenmiştir.

Hidroliz işlemi, kolajenin elde edilmesinden sonraki süreçte ayrı bir proses olarak gerçekleştirilebilir veya sürekli bir proses şeklinde kolajenin ekstraksiyonu ile eşzamanlı olarak gerçekleştirilebilir. Her iki yöntemde de kolajenin hidrolizi amacıyla kullanılacak enzimlerin; flavourzyme®, α -kimotripsin, tripsin, pepsin, nötraz, alkalaz, protamex ve papain gibi enzimler olduğu tespit edilmiştir (Baehaki vd. 2015; Chi vd. 2016; Chen vd. 2018; Li vd. 2018; Medina-Medrano vd. 2019; Wang vd. 2020).

Bu doktora tezi kapsamında yararlanılan yöntemlerden ilkinde asit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş olup asit ekstraksiyonunun devamında enzimlerle hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci yöntemde ise ekstraksiyon ve hidroliz işlemlerinin eş zamanlı olarak gerçekleştirilmesine imkân sağlayan enzimatik işlem uygulanmıştır. Böylelikle iki farklı balık türünün atıklarından kolajen menşeli hidrolize peptitler elde edilmiştir.

2.4. Verim

Balık atıklarından biyoaktif etkili HKP elde edilmesinde dikkat edilecek noktalardan birisi, atıkların verimli bir şekilde sürdürülebilirliğe katkı sağlamasıdır. Verimli olmayan bir çalışma; kaynakların, emek ve zamanın boşa harcanmasıdır. Bu açıdan yapılan çalışmalara bakıldığında; balık menşeli AÇK ve HKP elde edilmesinde genellikle balık derisi üzerine yoğunlaşmış olduğu tespit edilmiştir. Örneğin Wang vd. (2018), taş emen balığı (*Misgurnus anguillicaudatus*) derisinden AÇK ve PÇK (pepsin-çözünür kolajen) ekstraksiyonu konusunda çalışmıştır. Elde edilen verim neticesinde taş emen balığı deri kolajeninin karasal memeli kolajenine alternatif olabileceği ve bu durumun, balık türlerinin katma değerini artırabileceği bildirilmiştir.

Farklı araştırmacıların çalışmalarında verim hesabı yaparken literatürde farklı parametreleri kullanmış oldukları tespit edilmiştir. Örneğin Hou vd. (2023) ve Wei vd. (2019)'nin çalışmalarında verim, ekstraksiyon sonrası kolajenin kuru ağırlığının ekstraksiyon öncesi balık derisinin yaş ağırlığına oranının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Bununla birlikte; Chen vd. (2016)'nin çalışmasında verim hesabı, liyofilize edilmiş AÇK, kurutulmuş haldeki deri ve pul toplamına oranlanmasıyla gerçekleştirilmiştir. Başka bir çalışmada ise balık pulundan ekstrakte edilen AÇK'nın ekstrakt verimi; ekstrakttaki hidroksiprolin miktarının, kurutulmuş balık pulunda bulunan hidroksiprolin miktarına oranlanmasıyla elde edilmiştir (Thuy vd. 2014).

Mersin balığı (*Acipenser baerii* × *Huso huso*) derisinden elde edilen kuru haldeki AÇK'nın; yaş deri ağırlığına bölümünden hesaplanan verim Hou vd. (2023)'nin çalışmasında %4,13 olarak; Wei vd. (2019)'nin çalışmasında ise %5,73 AÇK olarak tespit edilmiştir. Çar balığı derisinden elde edilen AÇK'nın; kuru deri ağırlığına bölümünden hesaplanan verim değerinin ise %16,90 olarak tespit edildiği bildirilmiştir (Hou vd. 2023).

Chen vd. (2016)'nin çalışmasında; tilapia balığı (*Oreochromis niloticus*) pul ve derisinden AÇK ekstrakte edilmiştir. Çalışmada AÇK'nın kuru pul ağırlığına oranlanmasıyla %3,2 değerinde verim ve AÇK'nın kuru deri ağırlığına oranlanmasıyla %27,2 değerinde verim elde edildiği bildirilmiştir.

İspanyol uskumrusunun (*Scomberomorus niphonius*) AÇK verim değerleri; kolajenin yaş deriye oranlanmasıyla %13,68 olarak bulunmuş ve kolajenin kurutulmuş deriye oranlanmasıyla %58,62 olarak bulunmuştur (Li vd. 2013a). Aynı çalışmada kılçık kısımlarından ekstrakte edilen AÇK'nın verimi; yaş kılçıktan %12,54 olarak ve kuru kılçıktan %26,50 olarak bulunmuştur. Benzer bir çalışmada ise çizgili yayın balığı (*Pangasianodon hypophthalmus*) derisinden ekstrakte edilen kolajen ağırlığının, yaş deri ağırlığına bölünmesiyle elde edilen AÇK veriminin %5,10 olarak belirlendiği bildirilmiştir (Singh vd. 2011).

Thuy vd. 2014'nin çalışmasında; hidroksiprolin miktarının tespiti yoluyla, çeşitli balıkların pullarından hesaplanarak %0,43 ile %1,5 arasında değişen farklı verim değerleri elde edilmiştir. Bu balıklar içerisinde yer alan fangri balığı (*Dentex tumifrons*) pullarından elde edilen AÇK ekstraktı için verim değerinin %0,90 olduğu ifade edilmiştir.

Kırmızı tilapia balığı (*Oreochromis* sp.) derisinden elde edilen AÇK verimi %3,02 olarak bulunmuştur (Medina-Medrano vd. 2019).

Mandagöz balığı (*Priacanthus tayenus*) kılçıklarından %1,59 oranında ve derisinden %10,94 oranında verim elde edilmiştir (Kittiphattanabawon vd. 2005). Verim AÇK miktarının, kurutulmamış haliyle kılçık ve deri miktarına ayrı ayrı oranlanmasıyla elde edilmiştir.

Melez mersin balığı derisinden; kurutulmuş kolajenin yaş deriye oranlanması ile elde edilen AÇK verim değeri %5,73 olarak bulunmuştur (Pei vd. 2019). Sarı yüzgeçli ton balığı (*Thunnus albacares*) derisinden elde edilen AÇK verim ise %22,63 olarak bulunmuştur (Nurilmala vd. 2020).

2.5. Moleküler Ağırlık

Balık kaynaklı, hidrolize olmamış kolajen yapısının moleküler ağırlığının genel olarak 300 kDa civarlarında olduğu ifade edilmektedir (León-López vd. 2019). Literatür verilerine göre; HKP moleküler ağırlıklarının ise, genellikle 30 kDa-50 kDa aralığında yer aldığı bildirilmektedir (Kittiphattanabawon vd. 2005). Bununla birlikte; HKP'lerin moleküler ağırlıkları, kaynak materyal ve işlem koşullarına bağlı olarak 1 kDa düzeyinin altına kadar indirilebilmektedir.

Balık pullarından elde edilen hidrolize kolajenin Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid-Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile yapılan bir moleküler ağırlık dağılımı analizinde, çipura hidrolizatı moleküler ağırlığının 29 kDa'dan daha düşük olduğu ve moleküler ağırlık yoğunluğunun 6,5 kDa civarında olduğu bildirilmiştir (Bilgin, 2021). Söz konusu moleküler ağırlık düzeyleri, özellikle enzimatik yöntemin uygulanması durumunda 2,94 kDa seviyelerine kadar inebilmektedir (Nurilmala vd. 2020).

Kolajen yapısı; α zinciri, β zinciri ve γ zinciri olmak üzere temel anlamda 3 farklı alt ünitelerden oluşmaktadır (Zhang, 2009). Hacisa & Baygar (2023), altınbaş kefal (*Chelon auratus*) pullarından elde ettikleri AÇK'da 130 kDa civarlarında α zincirleri tespit etmiştir. Aynı çalışmada β zincir 226 kDa ve γ zincir 338 kDa olarak tespit edilmiştir. Nurilmala vd. (2020), ton balığı derisinden asit ekstraksiyonu ile elde ettiği kolajende $\alpha 1$ zincirinin yaklaşık 120 kDa ve β zincirinin yaklaşık 200 kDa olarak tespit edildiğini bildirmiştir. Wei vd. (2019)'nin tilapia balığının derisinden elde ettiği AÇK'da 116 kDa civarlarında α zincirleri, 220 kDa ve üzerinde β zincir tespit edilmiştir.

Protein hidrolizatlarının ortalama moleküler ağırlığı, antioksidan aktivite de dahil olmak üzere biyolojik aktiviteyi belirleyen en önemli faktörlerden biridir. Daha düşük moleküler ağırlıklara sahip peptitlerden daha fazla olumlu biyoaktif özellik elde edildiği bildirilmiştir (Azizah vd. 2020; Nurilmala vd. 2020). Bu amaçla çeşitli çalışmalarda balık kolajeni, enzimatik yollarda hidrolize edilerek daha küçük moleküler ağırlıklı peptitlere indirgenmiştir.

Ton balığı derisinden asit ekstraksiyonu ile elde edilen kolajenin moleküler ağırlığının 277,17 kDa olduğu ifade edilmiş ve bu kolajenden elde edilen hidrolizatların moleküler ağırlıklarının ise 2,94 kDa ile 11,93 kDa aralığında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Nurilmala vd. 2020). Bu tez konusuna benzer özellikleri olan bir

çalışmada (Zamorano-Apodaca vd. 2020), farklı balık türlerinden elde edilen karışık atık ürünler (deri, kafa ve kılçık), çalışma için kaynak materyal olarak kullanılmıştır. Söz konusu çalışmada alkalaz enzimi kullanılarak elde edilen hidrolizatların 1 kDa ile 27 kDa aralığındaki peptitlere karşılık gelen bantlar içerdiği ortaya konmuştur.

Moleküler ağırlık dağılımı ayrıca, kolajen ve kolajen peptitlerinin emülsiyon stabilitesini etkilemektedir (Chi vd., 2014).

2.6. Antioksidan Kapasite

Biyoaktif maddelerin antioksidan kapasitelerinin kıyaslanması açısından elde edilen sonuçlar literatürde TE cinsinden, IC₅₀ değeri cinsinden ve % (Radikal Süpürme Aktivitesi, RSA) cinsinden olmak üzere çeşitli şekillerde ifade edilebilmektedir. Çeşitli balıklarla yapılan denemelerin, ekseriyetle balık derisi üzerine odaklanmış olduğu görülmüştür (Chi vd. 2014, Baehaki vd. 2015, Wu vd. 2018, Medina-Medrano vd. 2019, Ardhani vd. 2019, Kusumaningtyas vd. 2019, Zamorano-Apodaca vd. 2020, Azizah vd. 2020, Chotphruethipong vd. 2021, Jantaratch vd. 2022, Lee vd. 2022). Deri haricinde ise kılçık, kafatası, iç organlar, omurga, kas dokusu, kuyruk ve pul kısımlarında antioksidatif kapasitenin çalışılmış olduğu tespit edilmiştir. Geçmiş yıllardan günümüze, tez konusu ile alakalı olarak yapılmış olan önemli çalışmalar konunun devamında özet olarak sunulmuştur.

İspanyol uskumrusu (*Scomberomorous niphonius*) derisinden pepsin enzimi ile elde edilen HKP numunelerinin mükemmel antioksidan aktiviteler gösterdiği, 5 mg/ml hidrolizat konsantrasyonunun %65,72 oranında DPPH radikali süpürme aktivitesi sağladığı bildirilmiştir (Chi vd. 2014). Söz konusu HKP numunelerinin IC₅₀ değeri cinsinden 1,57 mg/ml DPPH radikali süpürme aktivitesi sağladığı bildirilmiştir.

Çizgili yayın balığı (*Pangasius pangasius*) derisi ve kılçığından ayrı ayrı olarak papain enzimi ile kolajen hidrolizatları elde edilmiştir (Baehaki vd. 2015). En yüksek antioksidan kapasiteleri açısından; yayın balığı derisinden %63,06 oranında, yayın balığı kılçığından %71,55 oranında DPPH radikali süpürme aktivitesinin ortaya çıktığı ifade edilmiştir.

Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) balık atıklarından (kafatası, iç organlar ve omurga kısmı), alkalaz enzimi kullanılarak elde edilen HKP numunelerinin 1 mg/ml konsantrasyonundaki numunelerinde %21 oranında DPPH radikalinin süpürüldüğü bildirilmiştir (Koç 2016).

Çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) kafatası kısmından alkalaz ile elde edilen HKP numunelerinde en yüksek DPPH radikali süpürme aktivitesinin, alabalıktan elde edilende ortaya çıktığı bildirilmiştir (Erol vd. 2017). Çalışmada, serbest radikal süpürme aktivitelerinin çipurada %12,85; levrekte %71,39 ve alabalıkta %74,23 olduğu ifade edilmiştir.

Miichthys miiuy balığı pullarından ekstrakte edilen kolajende DPPH ve ABTS analizleri gerçekleştirilmiştir (Li vd. 2018). DPPH analizi sonucu 5 mg/ml konsantrasyonuna kadar kullanılan AÇK numunesinde %50 oranına varan radikal

süpürme etkisi elde edilmiştir. ABTS analizinde, 5 mg/ml konsantrasyonunda kullanılan AÇK numunesi ile %45 oranında radikal süpürme etkisi elde edilmiştir.

Literatür verileri değerlendirildiğinde kolajen hidrolizatlarının önemli oranda antioksidatif etkiler açığa çıkardığı bildirilmektedir (Zhang vd., 2019; Wang vd., 2020). Bunun yanı sıra; hidrolizatların moleküler ağırlıkları küçüldükçe söz konusu hidrolizatların daha fazla antioksidatif etki açığa çıkardıkları ifade edilmektedir (Zhang vd. 2019, Nurilmala vd. 2020).

Somon balığının deri ile karışık atık ürünlerinden elde edilen kolajen ekstraktı, *Vibrio* sp.den elde edilen proteaz enzimi ile hidrolize edilmiştir (Wu vd. 2018). Çalışmada, hidrolize peptitlerin %73,29 oranına kadar DPPH radikalini süpürdüğü tespit edilmiştir.

Çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarının omurga üzerine bağlı olarak bulunan kas doku atıkları üzerinde alkalaz ve flavourzyme enzimleri ile çalışma yapılmıştır (Türkaskan ve Çaklı 2018). DPPH radikal süpürücü aktiviteleri açısından hidrolizatlardan elde edilen değerlerin; çipura için alkalaz enzimi ile %90,58, çipura için flavourzyme enzimi ile %91,82, levrek için alkalaz enzimi ile %90,38 olarak ve levrek için flavourzyme enzimi ile %93,24 olduğu bildirilmiştir.

Süt balığı (*Chanos chanos*) pullarından pepsin ile elde edilen HKP numunelerinin 1 mg/ml konsantrasyonuna karşılık gelen DPPH radikal süpürücü aktivitesinin %50 oranında, 10 mg/ml konsantrasyonuna karşılık gelen DPPH radikal süpürücü aktivitesinin ise %99 oranında gerçekleştiği bildirilmiştir (Chen vd. 2018). Aynı çalışmanın ABTS radikali kullanıldığında verdiği sonuçların, 1 mg/ml HKP için %84 ve 10 mg/ml HKP için %85 oranında gerçekleştiği ifade edilmiştir.

Kırmızı tilapia (*Oreochromis* sp.) balığı derisinden elde edilen AÇK numunesinin %22,58 oranında DPPH radikal süpürücü etki ortaya çıkardığı bildirilmiştir (Medina-Medrano vd. 2019). AÇK numunesinin %0,1 pepsin enzimi ile hidrolizinden elde edilen fraksiyonun DPPH analizinde %12,28 oranında ve ABTS analizinden %30,40 oranında RSA açığa çıkardığı bildirilmiştir. Tilapia iç organ kolajeninin %0,1 pepsin enzimi ile hidrolizinden elde edilen fraksiyonun ise DPPH analizinde %10,34 oranında ve ABTS analizinden %29,43 oranında RSA açığa çıkardığı bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada deri ve iç organ AÇK'lerinin %0,1 pepsin enzimi ile hidrolizinden elde edilen fraksiyonların IC₅₀ değeri cinsinden DPPH analizinde sırasıyla 3,69 mg ve 5,34 mg; ABTS analizinde ise sırasıyla 7,03 mg ve 2,22 mg antioksidan kapasitesi gösterdiği ifade edilmiştir.

Kurt ringası (*Chirocentrus dorab*) derisinden elde edilen AÇK numunesinin antioksidan kapasitesi, DPPH yöntemi ile tayin edilmiş ve antioksidan kapasite IC₅₀ cinsinden 0,93 mg/ml olarak belirlemiştir (Ardhani vd. 2019).

Süt balığı (*Chanos chanos*) derisinden *Bacillus* proteazları ile elde edilen HKP numunelerinin yaklaşık %85 ile %95 arasında ABTS RSA ve yaklaşık %0,5 ile %15 arasında DPPH RSA açığa çıkardığı bildirilmiştir (Kusumaningtyas vd. 2019).

Sarı şarlatan balığı (*Pseudosciaena polyactis*) pullarından asidik yöntemle AÇK elde edilmiştir (Wang vd. 2020). Ardından AÇK pepsin, nötraz, papain, tripsin, flavourzyme ve alkalaz enzimleri ile ayrı ayrı hidrolize edilmiştir. Çalışmada altı HKP arasında en yüksek DPPH radikali süpürme aktivitesinin nötraz enzimi kullanılarak hazırlanan HKP numunesinde gözlemlendiği bildirilmiştir. 10 mg/ml konsantrasyonundaki numuneler için DPPH radikal süpürme aktivitesinin %30,97 olduğu ifade edilmiştir.

Tekir balığı, köpekbalığı, gitar balığı, gölge balığı, tırpana, mürekkep balığı, yunus balığı gibi muhtelif balıkların deri, kafa ve kılçık kısımlarının karışımından AÇK elde edilmiş; ardından AÇK alkalaz enzimi ile hidrolize edilmiştir (Zamorano-Apodaca vd. 2020). 5 mg/ml konsantrasyonundaki HKP numunelerinin %81 düzeyine kadar DPPH RSA açığa çıktığı bildirilmiştir.

Pangasius balığı (*Pangasius hypophthalmus*) derisinden %2 alkalaz ile elde edilen HKP numunelerinin ABTS radikal süpürme aktivitesinin 44,40 µmol TE/g hidrolizat olduğu tespit edilmiştir (Azizah vd. 2020). İlginç bir şekilde; hidrolize peptitlerin moleküler elemeye maruz bırakılması sonucu elde edilmiş olan daha düşük moleküler düzeydeki peptitlerin antioksidatif kapasitelerinde belirgin bir yükseliş gözlenmemiştir. <3 kDa düzeyine kadar düşürülmüş olan HKP numunelerinden 45,98 µmol TE/g hidrolizat şeklinde bir antioksidan kapasitesi elde edilmiştir.

Yağı alınmış Asya levreği (*Lates calcarifer*) derisinden papain ile elde edilmiş HKP numunelerinin antioksidan kapasitesinin, DPPH analizi sonucunda yaklaşık 5 µmol TE/g ile 20 µmol TE/g arasında olduğu tespit edilmiştir (Chotphruethipong vd. 2021). HKP numunelerinin ABTS yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasitesinin ise yaklaşık 150 µmol TE/g ile 400 µmol TE/g arasında olduğu bildirilmiştir.

Ticari HKP numunelerinde ABTS radikal süpürme aktivitesinin 51,57 µmol TE/g numune olduğu ifade edilmiştir (Gaspardi vd. 2022).

Tilapia balığı (*Oreochromis niloticus*) derisinden AÇK ekstrakte edilmiştir. Söz konusu AÇK, ton balığı midelerinden elde edilen ham enzim çözeltisi ile hidrolize edilmiştir. Ekstraksiyon süresine bağlı olarak HKP numunelerinde 4,285 µmol TE/g protein ile 6,751 µmol TE/g protein arasında değişen ABTS antioksidan aktivitesi ve 1,763 µmol TE/g protein ile 2,171 µmol TE/g protein arasında değişen DPPH antioksidan aktivitesi sağlanmıştır (Jantaratch vd. 2022).

Alaska Pollack balığı (*Theragra chalcogramma*) derisinden %1 alkalaz ile elde edilen HKP numunelerinin ABTS analizinde yaklaşık 0,9 mM TE/g düzeyinde antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Lee vd. 2022). Moleküler eleme işleminden sonra ortaya çıkan HKP'lerin <3 kDa fraksiyonu, antioksidan kapasitenin 2 kat artmasını sağlamıştır.

Çizgili orkinos balığı (*Katsuwonus pelamis*) kuyruk kısmından elde edilen AÇK numunesinden DPPH analizi ile IC₅₀ cinsinden 0,124 mg/ml ve ABTS analizi ile IC₅₀ cinsinden 14,6 mg/ml radikal süpürücü etki sağlandığı bildirilmiştir (Chanmangkang vd. 2022).

Sazan (*Cyprinus carpio*) balığının HKP numunelerinde gerçekleştirilen DPPH analizlerinden %61,83 ile %87 arasında RSA değerleri elde edilmiştir. Numune konsantrasyonları 1 mg/ml olup en yüksek RSA değeri, moleküler düzeyi <3 kDa olan numunenin DPPH analizi ile elde edilmiştir (González-Serrano vd. 2022).

2.7. Bazı Karakteristik Özelliklerin Belirlenmesi

Sentetik maddelerin yerini, doğal olanların giderek daha fazla almasına uygun olarak son zamanlarda ve özellikle gıda endüstrisinde; kolajenin ve kolajen hidrolizatlarının emülgatör, köpük oluşturunca, kolloid stabilizatörü, biyolojik olarak parçalanabilen film oluşturunca ve mikro kapsülleyici madde olarak kullanımı söz konusudur (Gómez-Guillén vd. 2011). Bu açıdan; bazı karakteristik özellikler kapsamında bu tez çalışmasında HKP'lerin çözünürlük, emülsiyon oluşturma ve köpük oluşturma özellikleri araştırılmıştır.

2.7.1. Çözünürlük

Çözünürlük, AÇK ve HKP'lerin en önemli fonksiyonel özelliklerinden birisidir. Kolajenin enzimatik olarak daha küçük peptitlere ayrışmasıyla polar grupların ve iyonlaşabilir grupların fazlalaştığı; bu durumun suyla etkileşimi artırdığı bilinmektedir (Mutlangi vd. 1996, Pires ve Batista 2013). Su ile peptitler arasında artan etkileşim, peptitlerde çözünürlüğün artışı da beraberinde getirmektedir. Ayrıca peptitlerdeki hidrofilik ve hidrofobik kuvvetler dengesinin peptitlerin çözünürlüğü üzerinde belirleyici olduğu ifade edilmiştir (Gbogouri vd. 2004, Pires ve Batista 2013). Emülsifikasyon ve köpürme gibi çeşitli özelliklerin ise çözünürlükten önemli düzeyde etkilendiği bildirilmiştir (Koç, 2016).

İspanyol uskumru (*Scomberomorus niphonius*) derisi ve kemiğinden elde edilen AÇK'larda çözünürlük değerlerinin asidik pH değerlerinde yüksek, alkali pH değerlerinde düşük seyrettiği ortaya konmuştur (Li vd. 2013a). Çalışmada sunulan veriler doğrultusunda asidik pH değerlerinde %100 değerine kadar çıkabilen çözünürlük değerleri söz konusu iken, alkali pH değerlerinde çözünürlük değerleri %13 civarına kadar düşmüştür. Asidik koşullarda AÇK'nın yüksek çözünürlük göstermesi AÇK'nın asit çözünür doğası gereği beklenen bir durumdur.

Kittiphattanabawon (2005) mandagöz balığı (*Priacanthus tayenus*) derisinden elde edilen AÇK'nın pH 2 değerinde ve kılçık kısmından elde edilen AÇK'nın pH 5 değerinde en yüksek çözünürlüğe sahip olduğunu bildirmiştir. En yüksek çözünürlük değerleri; %85 ile %100 arasında değişiklik göstermiştir. Çalışmada en düşük çözünürlük değerleri; kılçık için %2 (pH 8) ve deri için %30 (pH 7) civarlarında tespit edilmiştir.

pH 7, pH 8, pH 9 ve pH 10 değerleri için tilapia balığı (*Oreochromis niloticus*) deri kolajeninin %25 ile %30 aralığında; pul kolajeninin ise %19 ile %25 aralığında çözünürlük değerlerine sahip olduğu görülmüştür (Chen vd. 2016). Mandagöz balığı (*Priacanthus tayenus*) derisinden elde edilen AÇK'nın benzer alkali pH değerlerinde yaklaşık olarak %32 ile %53 arasında; kılçığından elde edilen AÇK'nın ise yaklaşık olarak %5 ile %15 arasında çözünürlük gösterdiği bildirilmiştir (Kittiphattanabawon vd. 2005).

AÇK'lerin enzimler vasıtasıyla hidrolize olması sonucu ortaya çıkan HKP'lerde moleköl ağırlığı azaldıkça, hidrolizat çözünürlüğünün önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (Chi vd. 2014). Bu durum aynı çalışmada, İspanyol uskumrusu (*Scomberomorous niphonius*) derisinden elde edilen HKP'lerde gösterilmiş, moleküler ağırlık azaldıkça HKP çözünürlüğü artış göstermiştir. Chi vd. (2014), HKP'lerde %65 ile %99 aralığında değişen çözünürlük değerleri elde etmiştir.

Pepsin enzimi kullanılarak hazırlanan süslü iplik yüzgeçli çipura (*Nemipterus hexodon*) kası hidrolizat çözünürlüğünün geniş bir pH aralığında (3-9), %70'in üzerinde olduğu bildirilmiştir (Nalinanon vd. 2011). Yüksek pH değerleri çalışmadaki HKP'lerin daha fazla çözünmesini sağlamıştır.

HKP'lerin çözünürlüğü; balığın çalışmada kullanılan bölümünün yanı sıra pH, sıcaklık ve enzim konsantrasyonu gibi parametrelerden önemli ölçüde etkilenmektedir.

Gümüş sazan (*Hypophthalmichthys molitrix*) HKP'lerinin çözünürlüklerinin pH 5 değerinde oldukça düşük iken pH 10 değerine doğru pH arttıkça çözünürlüklerin giderek arttığı ve çözünürlük değerinin yaklaşık %98'e kadar yükseldiği ortaya konmuştur (Dong vd. 2008). Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) atık hidrolizatlarında pH değeri arttıkça genellikle çözünürlüğün arttığı bildirilmiştir (Koç 2016). Aynı çalışmada hamsi atık hidrolizatlarında çözünürlük değerlerinin %90 ile %100 arasında değişim gösterdiği ifade edilmiştir. Sazan (*Cyprinus carpio*) balığı HKP'lerinde 3 farklı pH değerinde ölçümlenen çözünürlük değerlerinden en düşük çözünürlüğünün pH 4'te gözlemlendiği ifade edilmiştir (González-Serrano vd. 2022). Diğer pH değerleri olan 7 ve 10 değerlerinde çözünürlükte önemli bir değişiklik gözlenmemesine rağmen çözünürlük değerlerinin pH ile birlikte arttığı bildirilmiştir. Hidrolize peptitlerin çözünürlük değerleri yaklaşık olarak %81 ile %98 arasında değişiklik göstermiştir.

Buna karşın bazı çalışmalarda yüksek pH değerlerinde daha az çözünürlük değerlerinin elde edildiği tespit edilmiştir. Örneğin Chi vd. (2016), pH 4 değerinde HKP'lerin çözünürlüğünün pH 7 değerine göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

Sıcaklık açısından çözünürlük tayini, Zamorano-Apodaca vd. 2020, González-Serrano vd. 2022 gibi kaynaklarda olduğu gibi genellikle 25°C'da gerçekleştirilmektedir. Enzim miktarı, ortaya çıkacak olan HKP moleküler büyüklüklerini etkileyeceğinden çalışmalarda kullanılan enzim miktarı deklare edilmektedir.

Çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarının fileto edilmesinde ortaya çıkan atık hidrolizatlarından sırasıyla %98,51 oranına kadar ve %98,59 oranına kadar çözünürlük değerlerinin elde edilebildiği bildirmiştir (Türkaslan ve Çaklı 2018).

Çeşitli balık türlerinin deri, kafa ve kılçık kısımlarının karışımından elde edilen kolajenin alkalaz enzimi ile hidrolize edilmesi sonucunda farklı moleküler büyüklüklerde hidrolizatlar elde edilmiştir. Bu hidrolizatların pH 7 ve pH 10 değerlerindeki çözünürlüklerinin %95'in üzerinde olduğu bildirilmiştir (Zamorano-Apodaca vd. 2020).

2.7.2. Emülsiyon Oluşturma

Protein hidrolizatlarının emülsiyon oluşturma ve stabilize etme yeteneğini ölçmek için genellikle Emülsiyon aktivite indeksi (EAİ) ve emülsiyon stabilite indeksi (ESI) ifadelerinden yararlanılır. EAİ, meydana gelen emülsiyonda numunenin birim ağırlığı başına stabilize edilen arayüzey alanıdır. EAİ bir maddenin, herhangi bir emülsiyonun oluşumuna ve stabilizasyonuna yardımcı olma yeteneğinin yorumlanmasını sağlamaktadır. ESI, emülsiyon hacminin görsel olarak tespit edilemeyen 0,1 ml değerine azalması için dakika olarak gereken süre şeklinde tanımlanır. ESI, meydana gelen emülsiyonun kararlılığı hakkında fikir vermektedir.

Pepsin ile muamele edilen süslü iplik yüzgeçli çipura (*Nemipterus hexodon*) kas hidrolizatlarında %0,1 konsantrasyondaki numune için 102 m²/g ile 116 m²/g arasında EAİ değerleri ve 15,2 dakika ile 25,8 dakika arasında ESI değerleri elde edilmiştir (Nalınan vd. 2011). %0,25 konsantrasyondaki numune için 55 m²/g ile 58,6 m²/g arasında EAİ değerleri ve 17,5 dakika ile 18,5 dakika arasında ESI değerleri elde edilmiştir. %0,5 konsantrasyondaki numune için 29,9 m²/g ile 30,3 m²/g arasında EAİ değerleri ve 14,1 dakika ile 18,6 dakika arasında ESI değerleri elde edilmiştir. Çalışmada, hidrolize edilmemiş haldeki kolajen için herhangi bir EAİ ve ESI değerine rastlanmamıştır.

Sardalya balığı (*Sardinella aurita*) kas kısmından elde edilen hidrolizatlarda EAİ değerlerinin 5,1 m²/g ile 86,6 m²/g arasında değiştiği ve numune konsantrasyonu arttıkça EAİ değerinin azaldığı bildirilmiştir (Khaled vd. 2014). Aynı çalışmada ESI değerlerinin 1 dakika ile 44,4 dakika arasında değiştiği ve yine aynı şekilde numune konsantrasyonu arttıkça ESI değerinin azaldığı bildirilmiştir.

Kolajenin emülsiyon stabilitesi; kaynak materyalin özellikleri ve moleküler ağırlık dağılımı ile yakından ilişkilidir. İspanyol uskumrusu (*Scomberomorus niphonius*) derisi hidrolizatlarında yapılan bir çalışmada hidrolizatların moleküler ağırlıkları azaldıkça EAİ ve ESI değerlerinin azaldığı bildirilmiştir (Chi vd. 2014). Çalışmada tespit edilen EAİ değerlerinin yaklaşık olarak 37 m²/g ile 98 m²/g arasında; ESI değerlerinin ise 18 dakika ile 43 dakika arasında değişiklik gösterdiği ifade edilmiştir.

Koç (2016), hamsi atıkları hidrolizatlarındaki EAİ değerlerini 16,8 m²/g ile 34,8 m²/g arasında, ESI değerlerini 11,5 dakika ile 46,6 dakika arasında elde etmiştir. Chi vd. (2014), uskumru (*Scomberomorus niphonius*) deri hidrolizatlarında EAİ değerlerini 32,87 m²/g ile 97,44 m²/g arasında, ESI değerlerini yaklaşık 15 dakika ile 50 dakika arasında elde etmiştir. Thiansilakul vd. (2007), japon istavriti (*Decapterus maruadsi*) balığı hidrolizatlarındaki EAİ değerlerini 5,31 m²/g ile 37,28 m²/g arasında, ESI değerlerini 11,96 dakika ile 35,89 dakika arasında elde etmiştir.

Çeşitli balıkların deri, kafa ve kılçık kısımlarının karışımından elde edilen HKP'lerde, hidrolizatın tamamında ölçümlenen EAİ değeri yaklaşık olarak 70 m²/g iken ESI değeri ise yaklaşık 90 dakika olarak tespit edilmiştir (Zamorano-Apodaca vd. 2020). Moleküler eleme sonrası elde edilen daha düşük moleküler ağırlıklı HKP'lerde EAİ değerinin 70 m²/g değerinden 130 m²/g'a kadar çıktığı; ESI değerinin 90 dakikadan 45 dakikaya kadar düştüğü ortaya konmuştur.

Tilapia balığı (*Oreochromis niloticus*) kılçıklarından elde edilen kolajen, %1 konsantrasyon değerinde belli belirsiz emülsiyon aktivitesi gösterirken tilapia kılçık kolajen hidrolizatlarında emülsiyon aktivitesi yaklaşık olarak 55 m²/g olarak tespit edilmiştir (Dey vd. 2021). Çalışmada farklı balıkların deri, pul ve kılçık kaynaklarından elde edilen çeşitli HKP'lerin EAİ değerlerinin 53 m²/g ile 70 m²/g arasında değiştiği bildirilmiştir. Aynı HKP'lerin ESİ değerlerinin ise 62 dakika ile 85 dakika arasında değişiklik gösterdiği ifade edilmiştir.

González-Serrano vd. (2022)'nin çalışmasında, Zamorano-Apodaca vd. (2020)'de olduğu gibi numunelerin moleküler ağırlığı azaldıkça numunelerin EAİ değerlerinin arttığı bildirilmiştir. HKP'lerin EAİ değerlerinin 78,2 m²/g ile 121,1 m²/g arasında değiştiği ifade edilmiştir. Bununla birlikte; moleküler ağırlık azaldıkça ESİ değerlerinin de azaldığı bildirilmiştir. HKP'lerin ESİ değerlerinin 24,4 dakika ile 31,6 dakika arasında değiştiği ifade edilmiştir.

2.7.3. Köpük Oluşturma

Balık atıklarından elde edilen AÇK ve HKP'lerin köpürme özellikleri tespit edilirken genellikle Köpük Genişlemesi (KG) ve Köpük Stabilitesi (KS) parametreleri belirlenmektedir. Bu özellikler, kolajen ve kolajen peptitlerinin gıda, kozmetik ve farmasötikler de dahil olmak üzere çeşitli endüstrilerdeki potansiyel uygulamalarını anlamak için çok önemlidir. KG, peptit yapının hızlı bir şekilde karıştırılmasıyla oluşturulabilecek arayüzey alanı miktarıyla ölçülmektedir ve yapının köpük oluşturma kabiliyetine karşılık gelir. KS, peptit yapının meydana getirdiği köpük iskeletinin belirli bir zaman içerisinde ne kadarının sönmüldüğünün bir ölçütüdür ve meydana gelmiş olan köpük yapının kararlılığına işaret etmektedir.

AÇK'lerde KG ve KS'ye yönelik olarak literatürdeki veriler incelendiğinde; siyah fırır balığı (*Centrolophus niger*) derisi AÇK'larında farklı konsantrasyonlardaki numunelerin KG ve KS değerleri belirlenmiştir (Bhuimbar vd. 2019). %1,5 AÇK için KG değerinin %5 ve KS değerinin 0 olduğu; %3 AÇK için KG değerinin %15 ve KS değerinin %10 olduğu; %4,5 AÇK için KG değerinin %20 ve KS değerinin %15 olduğu tespit edilmiştir. Baraküda balığı (*Sphyræna sp.*) kılçık ve yüzgeç kısımlarından elde edilen AÇK'de ise KG değerinin %42,5 olduğu ve 1 saat sonra ölçülen KS değerinin %11,81 olduğu görülmüştür (İbrahim vd. 2023).

HKP'lerindeki KG ve KS değerleri incelendiğinde; pepsin ile muamele edilen süslü iplik yüzgeçli çipura (*Nemipterus hexodon*) kas hidrolizatlarında %0,1 konsantrasyondaki numune için %120 ile %128 arasında KG değerleri ve %55 ile %69 arasında KS değerleri elde edilmiştir (Nalinanon vd. 2011). Aynı çalışmada %0,25 konsantrasyondaki numune için %118 ile %128 arasında KG değerleri ve %60 ile %75 arasında KS değerleri elde edilmiştir. %0,5 konsantrasyondaki numune için ise %122 ile %131 arasında KG değerleri ve %61 ile %78 arasında KS değerleri elde edilmiştir.

Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) balık atıklarının alkalaz ile elde edilen HKP'lerinde %0,25, %0,5 ve %1,0 protein içeren çözeltilerinin %15,8 ile %43,3 arasında KG ve %10,8 ile %30,8 arasında KS sağladığı bildirilmiştir (Koç 2016).

Çeşitli balıkların deri, kafa ve kılçık kısımlarının karışımından elde edilen HKP’lerde KG değerleri, hidrolizatların moleküler ağırlık düzeylerine göre %42 ile %80 aralığında değişiklik göstermiştir. Moleküler ağırlık küçüldükçe KG değerlerinde düşüş gözlenmiştir (Zamorano-Apodaca vd. 2020). Aynı hidrolizatlarda KS değerleri, hidrolizatların oluşturdukları köpük yapının 10 dakika sonraki KG değeri türünden ifade edilmiştir. Bu açıdan hidrolizatların 10.dakikadaki KS değerleri, moleküler ağırlık düzeylerine göre %20 ile %60 aralığında değişiklik göstermiştir. Moleküler ağırlık küçüldükçe KS değerlerinde de düşüş gözlenmiştir.

Sazan (*Cyprinus carpio*) balığı HKP’lerinde KG değerleri, hidrolizatların moleküler ağırlık düzeylerine göre %50 civarlarından %87’lere kadar değişiklik göstermiştir. Moleküler ağırlık küçüldükçe KG değerlerinde azalma gözlenmiştir (González-Serrano vd. 2022). KS değerleri ise, hidrolizatların moleküler ağırlık düzeylerine göre %17 civarlarından %28,4’e kadar değişiklik göstermiştir. Moleküler ağırlık küçüldükçe KS değerlerinde azalma gözlenmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Kolajen kaynağı materyal olarak palamut (*Sarda sarda*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarından yararlanılması planlanmıştır. Çalışmanın başında kapsama ayrıca dahil edilmesi planlanan mezigit (*Merlangius euxmus*) balığından hedeflenen değerlere kıyasla oldukça düşük oranda AÇK veriminin elde edilmiş olması nedeniyle, mezgitin çalışma kapsamına dahil edilmemesinin daha uygun olacağına karar verilmiştir. Atık kısımlar olarak, palamut ve çipura balıklarının kafatası ve iç organ atıklarının toplamı kullanılmıştır.

HKP'lerin açığa çıkmasında yararlanılan enzimler; pepsin ve alkalaz enzimleridir. Pepsin enzimi EC 3.4.23.1 enzim numaralı (CAS No: 9001-75-6), 35.000 g/mol molekül ağırlığına sahip bir enzimdir. Bu çalışmada kullanılan pepsin enzimi; gastrik mukozadan elde edilmiş bir pepsin olup, ≥ 2000 U/g enzim aktivitesine sahiptir. Pepsin enziminin optimum çalışma pH değerinin 4.0-5.0 arasında olduğu ve optimum çalışma sıcaklık değerinin 48°C olduğu bildirilmektedir (Benhabiles vd. 2012). Alkalaz enzimi ise, EC 3.4.21.62 enzim numaralı (CAS No: 9014-01-1), *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen ve esas olarak subtilisin A'dan oluşan bir serin endopeptidazdır.

Yüksek proteolitik aktivitesi ve düşük maliyetli olması gibi bazı nedenlerle protein hidrolizatlarının hazırlanmasında yararlanılan en iyi enzimin alkalaz enzimi olduğu bildirilmektedir (Koç 2016). Bu açıdan bu çalışma kapsamında pepsin enziminin yanı sıra alkalaz enziminin de kullanılmasına karar verilmiştir. Alkalaz enzimi, proteinlerin hidrolizi için oldukça uygun olup bilimsel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir enzimdir. Bu enzim, alkali proteaz veya alkalaz olarak isimlendirilebilmektedir. Çalışmada kullanılan alkalaz enzimi; Xtisinobest firmasına ait alkalın proteaz olup 200.000 U/g aktiviteye sahiptir. Üretici firmanın verileri doğrultusunda enzimin optimum çalışma pH değerinin 10 ve optimum çalışma sıcaklık değerinin 45°C olduğu bilinmektedir.

3.2. Metot

Palamut ve çipura balıklarının her birinden 6 kg kadar satın alınmış ve temizlenmiştir. Temizleme sırasında atık olarak ortaya çıkan iç organlar ve kafa kısmı bir araya getirilmiştir. Bu atıkların tamamı, ≤ 1 cm büyüklüğünde parçacıklar halinde ince ince doğranarak işlemlere hazır hale getirilmiştir.

Kolajen hidrolizatının elde edilmesinde asidik yöntem ve enzimatik yöntem olmak üzere iki farklı yöntem uygulanmıştır. Her iki yöntemde de "3.1. Materyal" konu başlığı altında bahsedilmiş olan iki farklı enzim türü kullanılarak hidrolize peptitler ortaya çıkarılmıştır.

Enzimatik işlemler sırasında pepsin ve alkalaz enzimleri, 3 farklı konsantrasyonda kullanılacak olup literatür verileri göz önünde bulundurulduğunda bu değerlerin hidrolize edilecek maddelerin %0,5 (w/w), %1,0 (w/w) ve %1,5 (w/w)'i olacak şekilde belirlenmesine karar verilmiştir. Söz konusu değerler, kurutulmuş

numunenin analizde kullanılacak miktarı üzerinden hesaplanacak olan yüzdesel değerlerdir.

3.2.1. Asit çözünür kolajenin elde edilmesi

Bu yöntemde elde edilen yapı, literatürde AÇK olarak ifade edilmektedir. Nitekim bu yapı suda çözünür bir nitelikten çok asit çözeltisi içerisinde çözünebilir bir özellik göstermektedir. AÇK'nin çözündürülmesi amacıyla formik asit gibi çeşitli asitlerin kullanılabildiği bilinse de bu amaçla genellikle asetik asit tercih edilmektedir. Asetik asit, hidroklorik asit, sitrik asit, laktik asit gibi asitlerle yapılan denemelerin sonunda en fazla verimin asetik asit ile elde edildiği görülmüştür (Wei vd. 2017). AÇK'ler, çeşitli enzimler yardımıyla suda çözünür hale getirilebilmektedirler.

Ekstraksiyon aşaması sırasında uygulanan işlemler genel anlamda benzer olup çalışmanın amacına uygun olarak çeşitli modifikasyonlar içermektedir. Sugiharta vd. (2023) gibi çalışmalarda olduğu üzere ekstraksiyon sırasında deproteinizasyon, demineralizasyon, yağdan arındırma ve hidroliz gibi işlemler uygulanabilmektedir.

AÇK elde edilmesinde izlenen yol şu şekildedir: Palamut ve çipura balık toplam atıklarının her birinden 600 gram kadar tartılmış ve atıklar ≤ 1 cm büyüklüğünde parçacıklar halinde ince ince doğranarak işlemlere hazır hale getirilmiştir.

Balık atıklarındaki (kafatası ve iç organlar toplamı), protein olmayan yapıların uzaklaştırılması amacıyla 600 gram kadar balık atığı, sodyum hidroksit çözeltisi ile muamele edilmiştir. Balık atığı, atık miktarının (400 g) 10 katı (a/h) kadar miktardaki (6 L) 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi içerisinde 24 saat kadar bekletilmiştir. Bekletme işlemi sırasında sıcaklık $4\pm 1^\circ\text{C}$ 'da sabit tutulmuş ve bir manyetik karıştırıcı yardımıyla stabil hızda (200 rpm) otomatik karıştırma işlemi uygulanmıştır. Balık atıkları, sodyum hidroksit çözeltisi içerisinde 24 saat boyunca karıştırıldıktan sonra basit bir mutfak süzgeci yardımıyla süzölmüş ve sodyum hidroksit çözeltisinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Balık atığı, süzgecin üst kısmında toplanmış ve bu tortu nötr pH değerine sahip $4\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklığındaki saf su aracılığıyla birkaç kez yıkanmıştır.

Balık atıklarındaki yağın uzaklaştırılması amacıyla; atık kitlesi ağırlığının (600 g) 10 katı kadar (a/h) (6 L), bütül alkol çözeltisi kullanılmıştır. Sodyum hidroksit ile 24 saat boyunca muamele edilen balık atıkları, %20'lik bütül alkol çözeltisi içerisine bırakılmıştır. Balık atıkları, bütül alkol çözeltisi içerisinde $4\pm 1^\circ\text{C}$ sabit sıcaklıkta ve bir manyetik karıştırıcı ile sağlanan stabil hızda (200 rpm) 24 saat boyunca karıştırılmıştır. 24 saat sonunda balık atıkları bir mutfak süzgeci yardımıyla süzölmüş ve bütül alkol çözeltisinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Süzgecin üst kısmında toplanan tortu nötr pH değerine sahip $4\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklığındaki saf su aracılığıyla birkaç kez yıkanmıştır.

Balık atıklarındaki mineral maddelerin uzaklaştırılması amacıyla; atık kitlesi ağırlığının (600 g) 10 katı kadar (a/h) (6 L), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi kullanılmıştır. Balık atıkları, 0,5 M EDTA çözeltisi içerisine bırakılmıştır. Balık atıkları, EDTA çözeltisi içerisinde $4\pm 1^\circ\text{C}$ sabit sıcaklıkta ve bir manyetik karıştırıcı ile sağlanan stabil hızda (200 rpm) 24 saat boyunca karıştırılmıştır. 24 saat sonunda EDTA çözeltisi içerisindeki balık atıkları, çift katlı bir cendere bezinden geçirilerek filtre edilmiş ve EDTA çözeltisinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bez

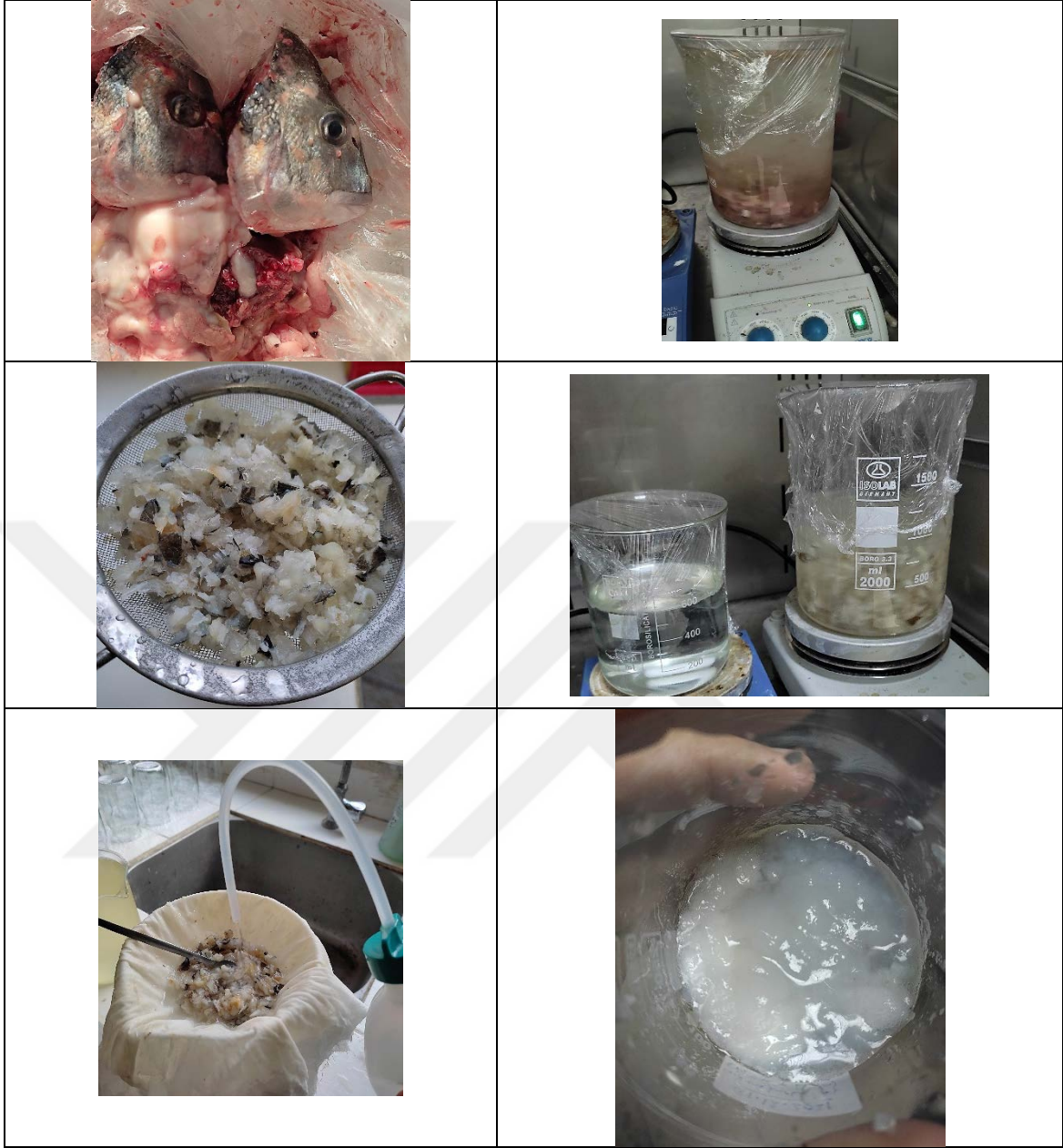
içerisinde toplanan süzölmüş balık atıkları nötr pH değeriine sahip $4\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklığındaki saf su aracılığıyla birkaç kez yıkanmıştır. Bezin iyice sıkılarak fazla suyun uzaklaştırılması işleminden sonra balık atıkları asit ekstraksiyonu için hazır hale getirilmiştir.

Sırasıyla sodyum hidroksit, bütöl alkol ve EDTA çözeltileri ile muamele edilerek bir seri ön işleme maruz bırakılan balık atıkları, asit ekstraksiyonu için asetik asit çözeltilisi içerisinde bekletilmiştir. Bu amaçla balık atık miktarının (600 g) 10 katı (a/h) kadar hacimde (6 L) asetik asit çözeltilisi kullanılmıştır. Balık atıkları, 0,5 M asetik asit çözeltilisi içerisinde $4\pm1^{\circ}\text{C}$ sabit sıcaklıkta ve bir manyetik karıştırıcı ile sağlanan stabil hızda (200 rpm) 48 saat boyunca karıştırılarak ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon aşaması sonrası çözeltili içerisindeki balık atıkları, yeniden çift katlı bir cendere bezinden geçirilerek filtre edilmiş ve fakat bu sefer çözeltilinin filtrat kısmı uzaklaştırılmayarak, analizin bir sonraki aşaması için bilakis bu filtrat kısmı kullanılmıştır.

Elde edilen çözeltili miktarının 1/10'i (a/h) kadar sodyum klorür tartılmış ve tartılan sodyum klorür, bu çözeltili içerisine aktarılmıştır. Kolajenin çöktürölmesi amacıyla içerisine sodyum klorür ilave edilmiş olan son durumdaki bu çözeltili, 48 saat boyunca sabit sıcaklık ($4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'da) ve stabil hızda (200 rpm) karıştırılmıştır.

Son aşamada; eldeki bu çözeltili, santrifüj tüplerine eşit bir şekilde pay edilerek en az 4500 rpm dönüş hızında 30 dakika boyunca tüpler santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında kolajen, tüplerin dip kısmında toplanmıştır. Üst fazların uzaklaştırılması sonucu geriye kalan tabakalar bir araya getirilmiş ve toplam kolajenin elde edilmesi sağlanmıştır.

Asit çözünlür kolajenin ekstraksiyon çalışmaları sırasında çekilmiş olan bazı fotoğraflar Şekil 3.1'de sunulmuştur.



Şekil 3.1. Asit çözümlü kolajenin ekstraksiyon aşamaları

3.2.2. Asidik yöntemle balık kolajen hidrolizatının elde edilmesi

“3.2.1. Asit çözümlü kolajenin elde edilmesi” başlığı altında izah edilen ekstraksiyon yöntemi ile AÇK elde edilmiştir. AÇK numunelerinin, 2 farklı tür enzim ve her bir enzimin 3 farklı konsantrasyonu kullanılarak hidrolize edilmesi sağlanmıştır. Bu enzimler pepsin ve alkalaz enzimleri olup bu enzimler aracılığıyla HKP numuneleri elde edilmiştir. Her bir enzimden AÇK numunelerinin %0.5'i, %1.0'i ve %1.5'i oranında kullanılmış olup asidik yöntemde AÇK numunesinden 12 adet HKP numunesi elde edilmiştir:

1. %0,5 alkalaz enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (APA1)

2. %1,0 alkalaz enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (APA2)
3. %1,5 alkalaz enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (APA3)
4. %0,5 alkalaz enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (AÇA1)
5. %1,0 alkalaz enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (AÇA2)
6. %1,5 alkalaz enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (AÇA3)
7. %0,5 pepsin enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (APP1)
8. %1,0 pepsin enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (APP2)
9. %1,5 pepsin enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (APP3)
10. %0,5 pepsin enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (AÇP1)
11. %1,0 pepsin enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (AÇP2)
12. %1,5 pepsin enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (AÇP3)

Asidik yöntemin uygulanması sonucu ortaya çıkan HKP numuneleri, bu çalışmadaki 2. yöntem olan enzimatik yöntem sonucu elde edilen hidrolize peptitlerden farklı yapı ve özelliklerdedir.

3.2.3. Enzimatik yöntemle balık kolajen hidrolizatının elde edilmesi

Enzim kullanılarak gerçekleştirilen kolajen hidrolizinin, ana materyaldeki protein yapısı ve fonksiyonel özellikleri olumsuz bir şekilde etkilemeden; hidroliz işleminin sağlıklı bir şekilde yürütülmesini sağladığı bildirilmektedir (Koç 2016). Bu hidroliz yönteminin genel olarak mutedil şartlarda (pH, sıcaklık ve basınç gibi) gerçekleştirilmesinden kimyasal hidroliz yöntemlerine göre üstün özellik gösterdiği ifade edilmektedir. Enzimatik yöntemde daha düşük sıcaklık değerleri kullanıldığı için enzimatik yöntemle hidrolizat üretimi günümüzde daha cazip hale gelmiştir (Korkmaz vd. 2021). Enzimatik yöntemde enzimin türü, enzim oranları, pH değeri, sıcaklık ve enzimatik hidroliz reaksiyon süresi önemlidir. Enzimatik yöntem ile hidrolize peptitlerin elde edilmesinin en önemli avantajı, asidik yöntemle göre işlem sayısının azaltılmış olmasıdır.

Enzimatik yöntem aracılığıyla HKP numunelerinin elde edilmesi sırasında aynen asidik yöntemde olduğu gibi, pepsin ve alkalaz enzimlerinden yararlanılmıştır. Enzimatik yöntemin uygulanışı, asidik yöntemde olduğu gibi balık atıklarından öncelikle AÇK numunelerinin elde edilmesi ve devamında AÇK hidrolizi şeklinde olmayıp balık atıklarının direkt olarak enzimlerle bir araya getirilmesi şeklindedir. Böylelikle; benzer veya daha üstün bir etkiyi, enzimatik yöntemle hidroliz işlemi sayesinde daha kısa yoldan ve daha kolay bir şekilde elde etmenin mümkün olup olmayacağını araştırmak amaçlanmıştır. Asidik ve enzimatik yöntemlerin uygulanmasına yönelik olarak oluşturulan deneme deseni Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışma sırasında uygulanan deneme deseni

	Asidik Yöntem						Enzimatik Yöntem					
	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları
PALAMUT	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	AÇK*	AÇK*	AÇK*	AÇK*	AÇK*	AÇK*	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	%0.5 pepsin	%1.0 pepsin	%1.5 pepsin	%0.5 alkalaz	%1.0 alkalaz	%1.5 alkalaz	%0.5 pepsin	%1.0 pepsin	%1.5 pepsin	%0.5 alkalaz	%1.0 alkalaz	%1.5 alkalaz
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ÇİPURA	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**
	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları	Balık Atıkları
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	AÇK*	AÇK*	AÇK*	AÇK*	AÇK*	AÇK*	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	%0.5 pepsin	%1.0 pepsin	%1.5 pepsin	%0.5 alkalaz	%1.0 alkalaz	%1.5 alkalaz	%0.5 pepsin	%1.0 pepsin	%1.5 pepsin	%0.5 alkalaz	%1.0 alkalaz	%1.5 alkalaz
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**	HKP**
	*AÇK: Asitte çözünür kolajen											
	**HKP: Hidrolize kolajen peptitleri											

Enzimatik yöntemdeki hidroliz sırasında da, asidik yöntemde olduğu gibi balık atıkları, ≤ 1 cm büyüklüğünde parçacıklar halinde ince ince doğranarak işlemlere hazır hale getirilmiştir. Enzim hidrolizine geçilmeden önce balık atıklarına yukarıda bahsedilen ön işlemler uygulanmış ve istenmeyen kısımların kitleden uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu amaçla protein olmayan yapıların uzaklaştırılması için sodyum hidroksit çözeltisi, lipid yapıların uzaklaştırılması için bütül alkol çözeltisi ve mineral maddelerin uzaklaştırılması için EDTA çözeltisi; “3.2.1. Asit çözünür kolajenin elde edilmesi” başlığı altında anlatıldığı gibi balık atıkları ile muamele edilmiştir.

600 gram balık atığı ön işlemlerden geçirildikten sonra bir etüv yardımıyla 80°C’da 72 saat boyunca kurutularak kırılgan hale getirilmiştir. Kurutulmuş balık atıkları bir havan yardımıyla toz haline gelinceye kadar ezilmiştir. Pepsin enzimi ile gerçekleştirilen enzimatik yöntem için şu adımlar uygulanmıştır: 3 adet beher içerisine, her birinde 10’ar gram olacak şekilde toz halindeki balık atıklarından 3 kez tartım yapılmıştır. Her bir beherin içerisine, tartılmış miktarların 10 katı kadar (100 mL) asetik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Deney sırasında kullanılan asetik asit çözeltisi 0,5 M olup pepsin ilavesi öncesinde bu çözelti 48°C sıcaklık değerine ve 4,5 pH değerine ayarlanmıştır. Asetik asit çözeltisi hazır hale getirildikten sonra, çözelti içerisine toz haldeki balık atığının %0,5’i, %1,0’i ve %1,5’i oranlarında pepsin ilave edilmiş ve 4 saat boyunca sabit sıcaklık değerinde (48°C) stabil bir karıştırma işlemi (350 rpm) uygulanmıştır (Benhabiles vd. 2012). 4 saat sonunda pepsin enzimini inaktif hale getirmek için karışımın sıcaklığı 85°C değerine çıkarılmış ve bu sıcaklık değerinde karışım, 15 dakika boyunca bekletilmiştir (Mazloomi vd. 2021). Ardından karışımın, oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.

Aynı işlemler farklı optimum şartlar sağlanarak alkalaz enzimi için tekrarlanmıştır. Toz halindeki balık atıklarından 10’ar gram alınmış ve toz haldeki balık atık miktarının 10 katı kadar (100 mL) asetik asit çözeltisi ile karıştırılmıştır. Deney sırasında kullanılan asetik asit çözeltisi 0,5 M olup alkalaz ilavesi öncesinde bu çözelti 45°C sıcaklık değerine ve 10,0 pH değerine ayarlanmıştır. Asetik asit çözeltisi hazır

hale getirildikten sonra, çözelti içerisine toz balık atık miktarının %0,5'i, %1,0'i ve %1,5'i oranlarında alkalaz ilave edilmiş ve 5 saat boyunca sabit sıcaklık değerinde (45°C) stabil bir karıştırma işlemi (200 rpm) uygulanmıştır (Bilgin 2021). Bu sürenin sonunda alkalaz enziminin inaktivasyonu için karışım sıcaklığı, 90°C değerine çıkarılmış ve bu değerde karışım 10 dakika boyunca bekletilmiştir (Zamorano-Apodaca vd. 2020). Ardından karışımın, oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.

Enzimatik yöntemin palamut ve çipura kaynak materyallerine uygulanması neticesinde 12 farklı HKP numunesi elde edilmiştir. Bu numuneler şunlardır:

1. %0,5 alkalaz enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (PA1)
2. %1,0 alkalaz enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (PA2)
3. %1,5 alkalaz enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (PA3)
4. %0,5 alkalaz enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (ÇA1)
5. %1,0 alkalaz enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (ÇA2)
6. %1,5 alkalaz enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (ÇA3)
7. %0,5 pepsin enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (PP1)
8. %1,0 pepsin enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (PP2)
9. %1,5 pepsin enzimi kullanılarak palamuttan elde edilmiş hidrolizat (PP3)
10. %0,5 pepsin enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (ÇP1)
11. %1,0 pepsin enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (ÇP2)
12. %1,5 pepsin enzimi kullanılarak çipuradan elde edilmiş hidrolizat (ÇP3)

Enzimatik yöntem kullanılarak HKP numunelerinin elde edilmesi aşamalarına dair örnek görseller Şekil 3.2'de sunulmuştur.



Şekil 3.2. Enzimatik yöntem kullanılarak HKP numunelerinin elde edilmesi aşamaları

3.2.4. Verim Değerinin Hesaplanması

Balık atıklarının ekonomik anlamda katma değer sağlaması için atıklardan elde edilen hidrolize kolajen miktarının, dikkate değer ölçüde yüksek olması arzu edilmektedir. Bu açıdan balık atıklarından elde edilen kitlede verim hesabı gerçekleştirilmiştir.

Balık atıklarından kolajen hidrolizatı üretiminde ortaya çıkan verim, elde edilen AÇK miktarı ile doğru orantılı olup verim hesabı literatürdeki verilerle kıyaslanabilir olacak şekilde Denklem 3.1’de sunulmuştur. Kolajen hidrolizatları; AÇK numunelerinin kendi miktarlarının 10 katı kadar asetik asit çözeltisinde enzim ilave edilerek hidroliz edilmeleri neticesinde elde edilmiştir. Bu hidrolizatlar, sonuç olarak homojen bir çözelti haline dönüştüklerinden HKP numunelerinde katı kitle düzeyinde bir verim hesabı sunmak güç olacaktır. Nitekim Hou vd. (2023), Wei vd. (2019) ve benzeri literatür verileri değerlendirildiğinde; verim hesabının bu doktora tezinde olduğu gibi yine AÇK üzerinden yapılmış olduğu görülecektir. HKP numuneleri, her iki yöntemde de AÇK katı kitesinden elde edilmiş sıvı kitleler olduğundan HKP

numunelerinin konsantrasyon olarak ifade edilmesi ve verimin ise AÇK katı kitlesi üzerinden verilmesi doğru bir yaklaşım olacaktır. Örneğin asidik yöntemde öncelikle AÇK katı kitlesi elde edilmekte ve AÇK, kendisinin 10 katı kadar 0,5 M asetik asit çözeltisi içerisinde belirli miktarlardaki enzimlerle hidroliz edilerek HKP numuneleri elde edilmektedir. Enzimatik yöntemde ise HKP numuneleri, 0,5 M asetik asit çözeltisi içerisinde AÇK'yi ayırmadan; çözelti içerisine direkt enzimlerin eklenmesi suretiyle AÇK'den elde edilmektedir. Dolayısıyla verim hesabında temel alınması gereken madde miktarının AÇK olduğu ve kolajen hidrolizatı verimlerinin AÇK miktarı ile orantılı olduğu açıktır.

Bu çalışmadaki verim değeri (%); elde edilen liyofilize haldeki AÇK miktarının, ekstraksiyon işlemine kullanılan yaş balık atık miktarına oranlanması ve bu oranın yüzdesel olarak ifadesi şeklinde sunulmuştur (Bknz Denklem 3.1).

$$\text{Verim (\%)} = \frac{\text{Liyofilize haldeki asit çözünür kolajen miktarı (g)}}{\text{Kullanılan yaş balık atığı miktarı (g)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.2.5. Moleküler Ağırlık Düzeyinin Hesaplanması

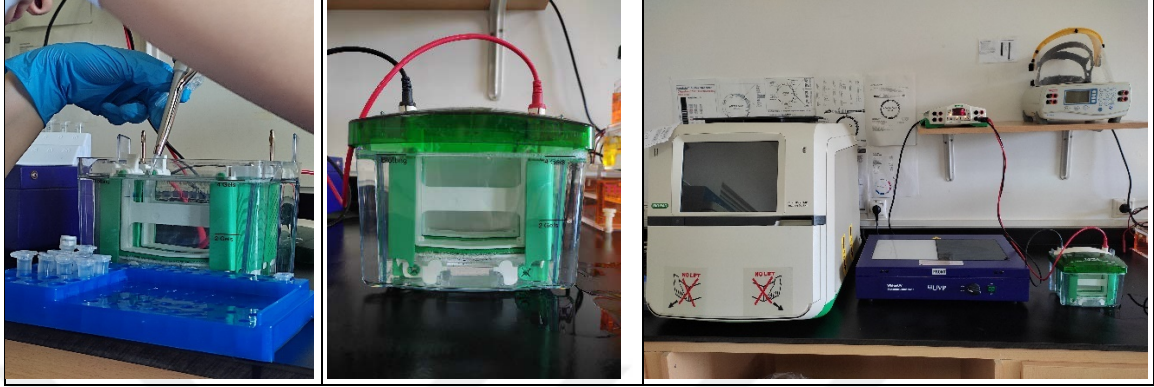
Biyoaktif peptitlerden elde edilen olumlu fonksiyonel özelliklerin özellikle daha düşük moleküler ağırlıklara sahip peptitlerde daha fazla ortaya çıktığı bildirilmiştir (Zhang vd. 2019; Nurilmala vd. 2020). Bu açıdan asidik veya enzimatik yöntemlerle elde edilen HKP numunelerinde moleküler ağırlık analizi gerçekleştirilmiştir. Olumlu fonksiyonel etkilerin hangi moleküler ağırlık düzeyinde elde edilmiş olduğu “4. *Bulgular ve Tartışma*” bölümünde değerlendirilmiştir.

Bu doktora tezinin moleküler ağırlığın belirlenmesi aşaması ile ilgili olarak numuneler SDS-PAGE analizine tabi tutulmuştur. SDS-PAGE analizi yapılan numuneler; her iki balıktan elde edilen AÇK numuneleri, enzimatik yöntemle elde edilen HKP numuneleri ve asidik yöntemle elde edilen HKP numuneleri şeklindedir. Moleküler ağırlıkların tespiti için akrilamid jel üzerindeki bantlarda belirgin bir kümelenmenin görülmesi amaçlanmıştır.

SDS-PAGE analizi için Mini-PROTEAN Tetra Dikey Elektroforez Hücresi (BioRad, ABD) cihazı kullanılmıştır. 1 mm %5 poliakrilamid yükleme jeli ve %10 poliakrilamid ayırma jeli hazırlanmıştır. Numuneler, hacimleri toplam 30 µl olacak şekilde 1:3 oranında 4X SDS jel yükleme tamponu (200 mM Tris-Cl, pH 6.8, %8 SDS, % 0.4 Bromphenol Blue, %40 gliserol, 100 mM DTT) ile karıştırılarak 70°C'da 10 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu yapılan karışımların her birinden 20 µl alınarak jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Numuneler, 1X TGS (0.025 M Tris base, 0.192 M Glisin, % 0.1 SDS, pH 8.3) tamponunda 120 V akımda 90 dakika boyunca elektroforez cihazında yürütülmüştür. Elektroforez uygulamasından sonra jel, Coomassie Brilliant Blue içeren boyama tamponu (%10 Asetik asit, %50 Metanol, %0.1 Coomassie Blue Staining) ile 2 saat orbital çalkalayıcı üzerinde boyanmıştır. Ardından fazla boyanın arınması ve bantların görünür hale gelmesi için boya içermeyen yıkama tamponu (%10 Asetik asit, %10 Metanol) ile akrilamid jel yıkanmıştır. En son aşamada; jel ChemiDoc MP görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve protein standardı

(Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, ABD) yardımıyla doğrulama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.3'te AÇK ve HKP numunelerinin moleküler ağırlık düzeyinin tayin edilmesi aşamalarına dair örnek görseller sunulmuştur.



Şekil 3.3. AÇK ve HKP numunelerinin moleküler ağırlık düzeyinin tayin edilmesi aşamaları

3.2.6. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

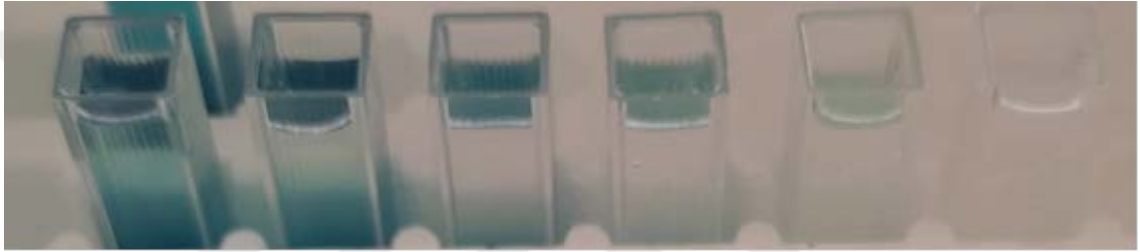
Her iki balık türünden elde edilen AÇK ve iki farklı yöntemle elde edilen HKP numunelerinin antioksidan aktivitelerini belirlemek için; söz konusu numunelerin DPPH ve ABTS radikallerini indirgeme kapasiteleri tayin edilmiştir. ABTS analizinin hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan sistemlerine uygulanabilir olduğu; DPPH analizinin ise hidrofobik sistemlere daha çok uygun olduğu bildirilmiştir (Floegel vd. 2011; Gaspardi vd. 2022). Bu bakımdan; seçilecek antioksidan analiz yöntemine karar verilirken balıkların deri, pul, kılçık ve iç organlar gibi kısımlarından hangisi ile çalışılacağına belirlenmesi ön koşul olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu doktora tez çalışmasında balık atıklarının tek bir grubu ile çalışmak yerine atıklarının tamamının değerlendirilmesi söz konusu olduğundan çalışmada hem DPPH yöntemi hem ABTS yönteminden yararlanılması uygun görülmüştür. DPPH radikali, mor renkli bir çözelti oluştururken ABTS radikali mavi/yeşil renkli bir çözelti oluşturmaktadır. Bu iki kararsız radikal, antioksidan bileşiklerle indirgendiğinde renksiz ve radikal olmayan formlarına dönüşmektedirler.

Antioksidan aktivitesi tayini sırasında deney tüplerinde, numune ve radikal çözeltileri bir araya getirilerek tüpler içerisinde indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarının oluşması sağlanmıştır. Her bir deney tüpündeki reaksiyon ortamında; radikallerin indirgenme düzeylerine bağlı olarak, reaksiyon çözeltilerinde renk açılmaları (renk kaybı) meydana gelmiştir. Zaman geçtikçe DPPH radikalinde meydana gelen mor rengin kaybolması durumu Şekil 3.4'te ve ABTS radikalinde meydana gelen mavi/yeşil rengin kaybolması durumu Şekil 3.5'te sunulmuştur. Çözeltilerde meydana gelen bu renk kayıplarının derecesiyle orantılı olarak, numunelerin absorbe ettiği ışın miktarında azalma meydana gelmiş ve bu azalma miktarı, kantitatif olarak spektrofotometre (Mapada 6100PCS) cihazında tayin edilmiştir. Böylelikle; radikal süpürücü etkinin artışı ile beraber, giderek azalan miktarlarda absorbans değerleri elde

edilmiştir. Absorbanslardaki azalış düzeyi; miktarı optimizasyon çalışmaları ile önceden belirlenen kontrol numunelerine (numunenin bulunmadığı ve dolayısıyla en yüksek absorbans değerine sahip olan numuneler) kıyasla belirlenerek TE, IC₅₀ ve RSA değerleri şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 3.4. DPPH yönteminde zaman geçtikçe renk kaybına uğramış olan analitik numuneler



Şekil 3.5. ABTS yönteminde zaman geçtikçe renk kaybına uğramış olan analitik numuneler

Yapılmış olan ön denemeler neticesinde, Gülçin vd. (2004)'nin metodu modifiye edilerek DPPH radikali temizleme etkinliğinin şu şekilde belirlenmesine karar verilmiştir: Bu yöntemde 0,1 mM DPPH radikal çözeltisi hazırlamak için 0,0039 gram DPPH, etanol içerisinde çözündürülerek 100 ml hacmine tamamlanmıştır. DPPH radikal çözeltisinin daha kararlı hale gelmesi açısından çözelti, alüminyum folyoya sarılarak en az 12 saat boyunca manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakılmıştır. Numune çözeltileri, etanol içerisinde 25 µg/ml ile 800 µg/ml arasında 6 farklı konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır. Her bir numune çözeltisinden 3 ml alınarak numune çözeltilerinin her biri 1 ml 0,1 mM DPPH radikal çözeltisi ile karıştırılmıştır. Radikal çözeltisi ile karıştırılan bu numuneler, daha sonra vortekslenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığındaki karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Ardından numune çözeltileri, 517 nm dalga boyuna ayarlanmış bir spektrofotometrede kontrol örneğine karşı okutulmuştur. Kontrol örneği, 1 ml DPPH radikal çözeltisi ve 3 ml etanolden meydana gelmiştir.

Numunelerin ABTS radikal süpürme etkinliği, Nalinanon vd. (2011)'in metodu modifiye edilerek tayin edilmiştir. Eşit hacimde olmak üzere 7,4 mM ABTS çözeltisi ve 2,6 mM potasyum persülfat çözeltisi hazırlanmıştır. ABTS.+ katyon radikali, suda çözündürülerek hazırlanmış 4 mM ABTS çözeltisi ve 2,6 mM potasyum persülfat çözeltilerinin birbirleriyle karıştırılarak 12 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmesiyle elde edilmiştir. ABTS.+ katyon radikali, 734 nm dalga boyundaki absorbans değeri 700 değerinde sabitlenene kadar distile su ile seyreltilmiştir.

Pozitif kontrol olarak 1 mg/ml konsantrasyonundaki trolox (*6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid*) standart çözeltisi kullanılmıştır. Trolox, E vitamininin suda çözünür eş değeri olup güçlü antioksidan özellik gösteren standart bir maddedir.

Numune çözeltileri, etanol içerisinde 25 µg/ml ile 800 µg/ml arasında 6 farklı konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyonu başlatmak için her bir numune çözeltisinden 3 ml alınarak numune çözeltilerinin her biri 1 ml ABTS.+ çözeltisi ile karıştırılmıştır. Bu numuneler daha sonra vortekslenerek 30 dakika boyunca oda sıcaklığındaki karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Ardından numune çözeltileri, 734 nm dalga boyuna ayarlanmış bir spektrofotometrede kontrol örneğine karşı okutulmuştur. Kontrol örneği 1 ml ABTS.+ çözeltisi ve 3 ml etanolden meydana gelmiştir.

DPPH ve ABTS radikal süpürme etkinliklerinin her ikisinde, Denklem 3.2’de sunulan formülünden yararlanılmıştır.

$$\% \text{ Radikal temizleme etkinliği} = \frac{\text{Kontrol Absorbansı} - \text{Numune Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100 \quad (3.2)$$

Antioksidan analizleri sonucunda, aynı numunenin farklı miktarlarına karşılık okunan absorbans değerleri Excel paket programında bir grafiğe aktarılıp lineer regresyon analizi uygulanmış ve söz konusu numuneye ait bir doğru denklemi elde edilmiştir. Doğru denklemdeki y ifadesi, absorbans değeridir; x ifadesi ise bu absorbans değerine karşılık gelen numune miktarıdır.

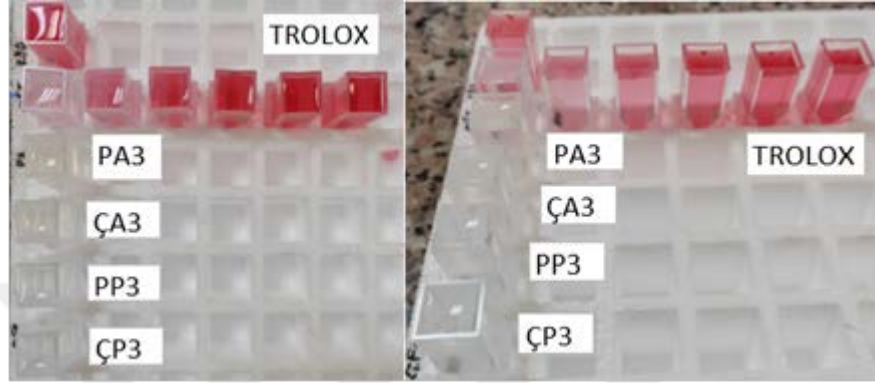
Numunelerin Trolox eşdeğeri (Trolox equivalent, TE) cinsinden antioksidan kapasitelerini belirlemek için; 6 farklı konsantrasyonda hazırlanan trolox çözeltilerinden absorbans değerleri elde edilmiştir. Ardından bu absorbans değerleri, lineer regresyon analizine tabi tutulmuştur. Lineer regresyon analizi sonucunda trolox için bir standart doğru denklemi elde edilmiştir. Denklemde gram numuneye karşılık indirgenen bileşik miktarı µmol cinsinden tespit edilip bulunan değer, TE şeklinde ifade edilmiştir.

IC₅₀ değeri; radikalin %50’sinin inhibisyonunu sağlayan mg düzeyindeki numune miktarıdır. IC₅₀ değeri cinsinden antioksidan kapasitesini belirlemek için; numunenin 5 farklı konsantrasyon değeri ve bu konsantrasyon değerlerine karşılık gelen absorbans değerleri Excel programına girilerek bir doğru denklemi elde edilmiştir. IC₅₀ değeri; kontrol absorbans değerinin yarısının, bu doğru denklemde y ifadesi yerine yazılması sonucu bulunan x ifadesinin karşılığı olarak tespit edilmiştir.

Numunelerin RSA değeri cinsinden antioksidan kapasitelerini belirlemek için; 5 mg/ml numuneye karşılık gelen absorbans değerleri, Denklem 3.2’deki “*Numune Absorbansı*” kısmına yazılarak numunenin radikalde oluşturduğu %inhibisyon değerleri tespit edilmiştir.

Yüksek TE ve RSA değerleri, daha fazla antioksidan kapasitesini ifade ederken; IC₅₀ değerlerinde durum tam tersi bir şekilde gerçekleşmekte olup yüksek IC₅₀ değerleri daha az oranda antioksidan kapasitesini ifade etmektedir.

Antioksidan aktivitesi tayini kapsamında ayrıca “Bipiridil Metal Çelatlama”, “Demir İndirgeme” ve “Folin Ciocalteu Fenol Reaktif İndirgeme” yöntemleri ile çeşitli denemeler gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda Bipiridil metal çelatlama yönteminde; hidrolizat numunelerinin metal çelatlama aktivitesi göstermediği (Şekil 3.6) tespit edilmiştir. Bu tespit, trolox standart madde konsantrasyonunun artışına paralel olarak trolox çözeltilerinin renk şiddetini artırmalarına karşın aynı durumun hidrolizat numunelerinde gözlenmemiş olmasına dayanmaktadır.



Şekil 3.6. Hidrolizat numunelerinin bipiridil metal çelatlama yönteminde giderek artan şiddette karakteristik renk oluşturmaması

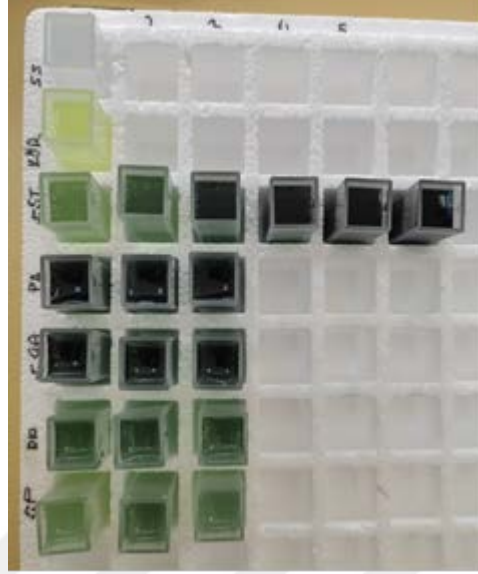
Demir indirgeme yönteminde; numunelerin tortu oluşturmak suretiyle yöntemden sonuç alınmasını mümkün kılmadığı, diğer bir anlatımla numunelerin yöntem ile uyum göstermediği (Şekil 3.7) tespit edilmiştir.



Şekil 3.7. Demir indirgeme yöntemindeki reaksiyon ortamında hidrolizat numunelerinin çökelti oluşturması

Folin Ciocalteu fenol reaktifi indirgeme yönteminde ise; numunenin antioksidatif kapasitesi Folin Ciocalteu reaktifinin indirgenmesine neden olmuştur. Sarı renkte olan Folin Ciocalteu reaktifi, indirgenme reaksiyonu ile birlikte yeşil renkli bir hale dönüşmeye başlamıştır. Bu renk değişimi, radikal süpürücü etkinin getirdiği bir sonuçtur. Enzimatik yöntemle elde edilen hidrolizatların antioksidatif kapasiteleri, Folin

Ciocalteu fenol reaktifi indirgeme yöntemi ile “miligram gallik asit/gram numune” düzeyinde tespit edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Enzimatik yöntemle elde edilen hidrolizatların Folin Ciocalteu fenol reaktifi indirgeme yöntemi ile antioksidan aktivitelerinin tespitine dair yapılan çalışma

Sonuç olarak; diğer antioksidan analiz yöntemleri ile de çeşitli denemeler gerçekleştirilmiş fakat daha optimal sonuçlar elde edilen ve literatürde daha sık yer alan (Akar vd. 2017) iki antioksidan analiz yönteminin bu çalışmada kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla numunelerin DPPH ve ABTS radikal süpürücü etkileri incelenmiş ve birtakım değerlendirmelerde bulunulmuştur.

3.2.7. Bazı Karakteristik Özelliklerin Belirlenmesi

Karakteristik özelliklerinin belirlenmesi kapsamında balık kolajen hidrolizatlarının çözünürlük özelliği, emülsiyon oluşturma özelliği ve köpük oluşturma özelliği belirlenmiştir.

3.2.7.1. Çözünürlük Özelliğinin Belirlenmesi

Çözünürlük özelliğinin hesaplanması Koç (2016)'da açıklandığı üzere, Lowry vd. (1951)'e ait metodun modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Lowry vd. (1951)'in çözünürlük tayini için önerdikleri metotta bakır, peptit bağları aracılığıyla indirgenmekte ve folin ayırıcı ile renk oluşturmaktadır. Bu sayede numunelerde bulunan protein miktarı tespit edilebilmektedir. Söz konusu indirgenme reaksiyonu, numunelere uygulanan çözündürme işlemi öncesinde ve sonrasında olmak üzere iki şekilde uygulanmış ve elde edilen sonuçlar, Denklem 3.3'te sunulduğu üzere birbirlerine oranlanarak numunelerde çözünürlük tespiti yapılmıştır.

$$\text{Protein çözünürlüğü (\%)} = \frac{\text{Supernatanttaki protein miktarı}}{\text{Numunedeki toplam protein miktarı}} \times 100 \quad (3.3)$$

Çözünürlük tespiti amacıyla yapılan bu protein tayininde öncelikle aşağıdaki solüsyonlar hazırlanmıştır:

1. 0,1 M NaOH çözeltisi içerisinde %2 oranında sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözündürülerek “Çözelti A” elde edilmiştir.
2. Ayrı bir şekilde 0,1 M NaOH çözeltisi hazır edilmiştir.
3. %1’lik potasyum sodyum tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi içerisinde %0,5 oranında Bakır(II)sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) çözündürülerek “Çözelti B” elde edilmiştir.
4. 50 birim Çözelti A’dan ve 1 birim Çözelti B’den kullanılarak yeni bir solüsyon elde edilmiştir ve bu solüsyon “Reaktif I” olarak isimlendirilmiştir.
5. %50 oranında 0,1 M NaOH çözeltisi ve %50 oranında Folin-cio ayırıcı kullanarak hazırlanan solüsyon ise “Reaktif II” olarak isimlendirilmiştir.
6. Standart madde olarak Sığır Serum Albümini (SSA) kullanılmış olup 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, 160 ppm ve 320 ppm konsantrasyonları olmak üzere SSA’nın 5 farklı konsantrasyonunda çözeltiler hazırlanmıştır.

Öncelikle SSA standart çözeltileri spektrofotometrede okutulmuş ve absorbens değerleri elde edilmiştir. Söz konusu absorbens değerleri standart kalibrasyon eğrisi oluşturmak amaçlı kullanılmıştır. Excel programında oluşturulan kalibrasyon eğrisinden bir doğru denklemi elde edilmiştir. Bu denklemdeki x ifadesi okutulan SSA konsantrasyon değeri olup y ifadesi ise bu konsantrasyon değerine karşılık gelen absorbens değeridir.

Bakırın indirgenerek protein miktarının tayin edildiği bu yöntemde; AÇK numunelerinden 1 g alınıp 0,5 M asetik asit çözeltisi ile 100 ml’ye tamamlanmıştır. Vorteks cihazında 1 dakika kadar karıştırılıp Lowry vd. x yöntemine göre protein ölçümleri yapılmıştır. Bu yöntemde; numunelerden 1 ml alınmış ve numune 4,5 ml Reaktif I ile karıştırılmıştır. Bu karışım, 10 dakika bekletildikten sonra karışımın üzerine 0,5 ml Reaktif II ilave edilmiş ve 30 dakika karanlıkta beklemeye bırakılmıştır. Süre sonunda karışım, spektrofotometre cihazında 660 nm dalga boyunda okutularak absorbens değerleri elde edilmiştir. AÇK numunelerinin absorbens değerleri, standart kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemdeki y değeri yerine yazılarak palamut ve çipura için ayrı ayrı konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Elde edilen bu konsantrasyon değerleri “numunedeki toplam protein miktarı” olarak ifade edilmiştir.

0,5 M asetik asit çözeltisi içerisindeki AÇK numuneleri, bu sefer çözündürme işlemlerine tabi tutulmuştur. Çözündürme işlemi için bir manyetik karıştırıcı yardımıyla numuneler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırılmış ve ardından süspansiyon, 8,5 cm yarıçapındaki bir santrifüj cihazında 12 000 rpm dönüş hızı ile 4°C’da santrifüj edilmiştir. Santrifüjleme işlemi sonrası süpernatantlardan alınan 1 ml’lik numunelerle Lowry vd. (1951)’nin protein tayini yöntemi tekrarlanmış ve 660 nm dalga boyunda absorbens değerleri elde edilmiştir. Absorbans değerleri, standart kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemdeki y değeri yerine yazılarak palamut ve çipura için ayrı ayrı

konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Elde edilen bu konsantrasyon değerleri “supernatanttaki protein miktarı” olarak ifade edilmiştir.

AÇK numunelerinin çözünürlük oranlarını (%) bulmak için Denklem 3.3’e uygun olarak “supernatanttaki protein miktarı” ve “numunedeki toplam protein miktarı” değerleri birbirlerine oranlanıp 100 değeri ile çarpılmıştır.

Protein çözünürlüğü tayini için yapılan işlemler HKP numuneleri için de tekrarlanmıştır. HKP numunelerinden Lowry vd. (1951) yöntemine göre numuneler çözündürülmeksizin ve çözündürülerek iki kez protein tayini gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerlerine SSA kalibrasyon eğrisinde karşılık gelen konsantrasyon değerleri tespit edilmiştir. Tayin edilen bu konsantrasyon değerleri, Denklem 3.3’te yerlerine yazılarak HKP’lerin çözünürlük değerleri tespit edilmiştir.

Şekil 3.9’da AÇK ve HKP numunelerinin çözünürlük özelliğinin tayin edilmesi aşamalarına dair örnek görseller sunulmuştur.



Şekil 3.9. AÇK ve HKP numunelerinin çözünürlük özelliğinin tayin edilmesi aşamaları

Protein çözünürlüğü; pH, sıcaklık ve konsantrasyon gibi parametrelerden etkilenmektedir. Analizin ilkesine göre ortam alkali özellik göstermelidir. Çünkü analizde peptit bağları ile indirgenen bakırın, alkali ortamda folin reaktifi ile renk oluşturması sağlanmaya çalışılmaktadır. Bu açıdan protein çözünürlüğü analizi, 25°C sıcaklıkta 10.00 ± 0.5 pH değerine ayarlanan 10 000 ppm konsantrasyonundaki numunelerde gerçekleştirilmiştir. Numuneler, literatür verileri doğrultusunda konsantrasyonları 10 000 ppm olacak şekilde ayarlanarak hazırlanmıştır (Li vd. 2013b).

3.2.7.2. Emülsiyon Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

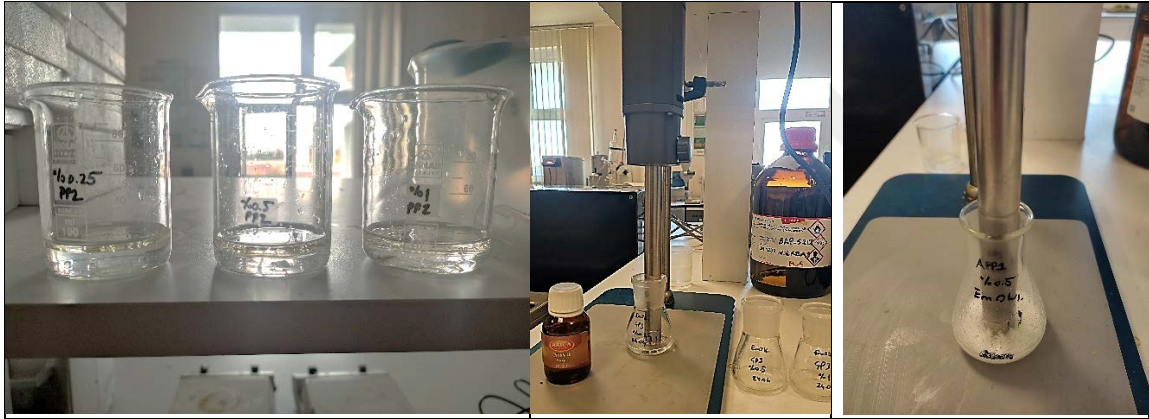
AÇK ve HKP’lerin emülsiyon oluşturma özelliklerinin belirlenmesi için Emülsiyon Aktivite İndeksi (EAI) ve Emülsiyon Stabilité İndeksi (ESI) değerleri tayin edilmiş olup bu testler için Thiansilakul vd. (2007)’nin metodundan yararlanılmıştır. Yapılan uygulama, %0,25, %0,5 ve %1,0 konsantrasyonlarında hazırlanan numunelerin soya yağı ile birlikte Ultraturrax cihazı aracılığıyla karıştırılması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Söz konusu konsantrasyonlardaki numunelerden 6 ml alınmış ve 2 ml soya yağı (Sigma-Aldrich S7381) ile karıştırılmıştır. Karışım Ultraturrax cihazı ile 20.000 devir/dakika (rpm) hızda, 1 dakika boyunca emülsifiye edilmiştir. Bu işlemin bitimini takiben oluşan emülsiyonun dip kısmından 50 µL alınmış ve 100 kat %0.1 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi ile seyreltilmiştir. Seyreltilen bu numunenin 500 nm dalga boyuna ayarlanmış olan bir spektrofotometre cihazında absorbans değeri (A_0) ölçülmüştür. Aynı emülsiyonun dip kısmından 10 dakika sonra tekrar 50 µL numune alınmış, 100 kat %0.1 SDS çözeltisi ile seyreltilmiş ve 500 nm dalga boyundaki absorbans değeri (A_{10}) ölçülmüştür. Absorbans ölçümleri üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen değerler Denklem 3.4 ve Denklem 3.5’deki ilgili yerlere yazılarak sonuç hesaplanmıştır.

$$\text{Emülsiyon Aktivite İndeksi (EAI)} (\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2,303 \times A_0}{0,25 \times \text{protein konsantrasyonu}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\text{Emülsiyon Stabilite İndeksi (ESI)} (\text{dakika}) = \frac{A_0 \times 10}{A_0 - A_{10}} \times 100 \quad (3.5)$$

Şekil 3.10’da AÇK ve HKP numunelerinin emülsiyon oluşturma özelliklerinin tayin edilmesi aşamalarına dair örnek görseller sunulmuştur.



Şekil 3.10. AÇK ve HKP numunelerinin emülsiyon oluşturma özelliğinin tayin edilmesi aşamaları

3.2.7.3. Köpük Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

AÇK ve HKP’lerin köpük oluşturma özelliklerinin değerlendirilmesinde Nalınan vd. (2011)’nin referansı ile Koç (2016)’un uyguladığına benzer şekilde KG ve KS değerleri belirlenmiştir. %0,25, %0,5 ve %1,0 konsantrasyonlarında hazırlanan numunelerin her birinden 20 ml (V_{ilk}) alınarak 13.400 devir/dakika hızdaki bir Ultraturrax cihazı aracılığıyla 1 dakika boyunca karıştırılmıştır. Karıştırmanın hemen sonrasında oluşan köpüğün hacmi (V_0) ölçülmüş ve not edilmiştir. Karıştırılmış olan numuneler, ölçümün ardından 10 dakika boyunca kendi haline bırakılmıştır. 10.dakikanın sonunda numunelerde bulunan köpüğün hacmi (V_{10}) tekrar ölçülmüştür. Elde edilen değerler aşağıdaki formüllerde yerlerine yazılarak numunelerdeki KG (Denklem 3.6) ve KS (Denklem 3.7) değerleri belirlenmiştir.

$$\text{Köpük Genişlemesi (KG)} = \frac{V_0 - V_{\text{ilk}} (\text{mL})}{V_{\text{ilk}} (\text{mL})} \times 100 \quad (3.6)$$

$$\text{Köpük Stabilitesi (KS)} = \frac{V_{10} - V_{\text{ilk}} (\text{mL})}{V_{\text{ilk}} (\text{mL})} \times 100 \quad (3.7)$$

Şekil 3.11’de AÇK ve HKP numunelerinin köpük oluşturma özelliklerinin tayin edilmesi aşamalarına dair örnek görseller sunulmuştur.



Şekil 3.11. AÇK ve HKP numunelerinin köpük oluşturma özelliğinin tayin edilmesi aşamaları

3.2.8. İstatistiksel Yöntemler

Çalışmada paralel analiz sonuçları ortalama değerleri alınarak tekerrür analiz sonuçları belirlenmiş; elde edilen analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri $\pm$ standart sapma ($\pm$ SS) şeklinde sunulmuştur. Elde edilmiş olan veriler, SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 22, New York, USA) paket programı kullanılarak tek yönlü ANOVA varyans analizi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel olarak önemli ($p \leq 0,05$) olan verilerde, gruplar arası farkın değerlendirilmesi amacıyla Duncan çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde; tez çalışmasındaki AÇK ve HKP numunelerinin elde edilmesi, verim değerlerinin hesaplanması, numunelerin moleküler ağırlık düzeylerinin hesaplanması, numunelerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve bazı karakteristik özelliklerin (çözünürlük, emülsiyon oluşturma özelliği, köpük oluşturma özelliği) belirlenmesi aşamalarına yönelik olarak bulgular sunulacak ve söz konusu bulgular üzerine çeşitli değerlendirmeler yapılacaktır.

4.1. Balık kolajeni ve hidrolizatlarının elde edilmesi

Bu doktora tezinin “3. Materyal ve Metot” başlığı altında detayları açıklandığı üzere palamut ve çipura balık atıklarından asidik ve enzimatik yöntemlerle 2 adet AÇK ve 24 adet hidrolizat numunesi elde edilmiştir.

4.2. Verim Değerinin Hesaplanması

Paralel şekilde yürütülen iki ekstraksiyon işlemi sonunda, palamut kaynak materyalinden elde edilen AÇK verim değerinin ortalama $10,50 \pm 0,217$; çipura kaynak materyalinden elde edilen AÇK verim değerinin ise ortalama $14,51 \pm 0,306$ olduğu tespit edilmiştir.

Söz konusu sonuçlar literatür verileri ile kıyaslandığında verim açısından tatmin edici sonuçların ortaya çıkmış olduğu görülmektedir. Bununla birlikte; ayrıca çalışılmış olan mezgıt kaynak materyali ile elde edilen AÇK'nin, hedeflenen değerlere kıyasla oldukça düşük oranda ekstrakte edilebildiği gözlemlenmiştir. Bu açıdan mezgıt kaynak materyali ile ekstraksiyon işlemleri tekrarlanmıştır. Paralel şekilde yürütülen iki ekstraksiyon işlemi sonunda mezgıt kaynak materyalinden, önceki analiz sonuçları ile de uyumlu olarak ortalama $0,21$ şeklinde verim elde edildiği tespit edilmiştir. Ciddi oranda düşük olan bu verim değerinin ortaya çıkmasının neticesinde, çalışmanın efektif olarak yürütülebilmesi açısından mezgıt kaynak materyali, palamut ve çipura balıklarının yanı sıra üçüncü bir kaynak materyal olarak çalışma kapsamına dahil edilmemiştir.

Çipura kaynak materyali ile elde edilen yaş ağırlık bazındaki hidrolizat veriminin, literatür verileri (Li vd. 2013a; Chi vd., 2014; Jongjareonrak vd., 2005a ve Jongjareonrak vd. 2005b) ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde geçen çalışmalarda çoğunlukla balıkların deri kısımlarında verim hesabı yapıldığı görülmüştür. Deri haricinde balık pulu ve balık kılçığında da verim hesabı yapıldığı tespit edilmiştir. Deri, pul ve kılçık için kullanılan balık türleri Çar balığı (Hou vd. 2023), tilapia balığı (Chen vd. 2016), İspanyol uskumrusu (Chi vd. 2014) ve çizgili yayın balığı (Singh vd. 2011) olmuştur.

Verim hesabına katılan AÇK'nin kuru veya yaş olmasına göre literatürde farklı hesaplamalar yoluna gidilmiş olduğu “2.4 Verim” başlığı altında belirtilmişti. Bu başlık altındaki literatür verileri doğrultusunda, yaş deriden ekstrakte edilen AÇK için verim değerlerinin $4,13$ ile $13,68$ değerleri arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Hou vd. 2023, Li vd. 2013a). Bu tez çalışmasında elde edilen AÇK'nin liyofilize

edilerek hesaplama dahil edildiğini düşündüğümüzde çipura ve palamut ile yüksek bir verim değerinin elde edilmiş olduğu tespit edilmiştir.

Ekstrakte edilen AÇK için kuru deriden hesaplama yoluna gidildiğinde ise verim değerlerinin %16,90 ile %58,62 arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Hou vd. 2023, Chi vd. 2014). Kurutulmuş balık pulundan hesaplanan AÇK veriminin %3,2 olduğu ifade edilmiştir (Chen vd. 2016). Kurutulmuş balık kılçığından hesaplanan AÇK değerinin %26,50 olduğu ve yaş haldeki balık kılçığından AÇK değerinin ise %12,54 olduğu bildirilmiştir (Chi vd. 2014). Bu tez çalışmasında AÇK, liyofilize halde yaş balık atığına oranlandığından; kuru materyalden hesaplanarak gerçekleştirilen verim çalışmaları ile kıyaslama yapmak zorlaşmaktadır. Fakat Chi vd. 2014'ün yaş balık kılçığından elde ettiği verim değeri ile kıyasladığımızda bu tez çalışmasındaki her iki balık atığından da verimi yüksek sonuçlar alındığı tespit edilmiştir. Hatta çipura atıklarının İspanyol uskumru (*Scomberomorus niphonius*) derisine göre daha verimli olduğu tespit edilmiştir.

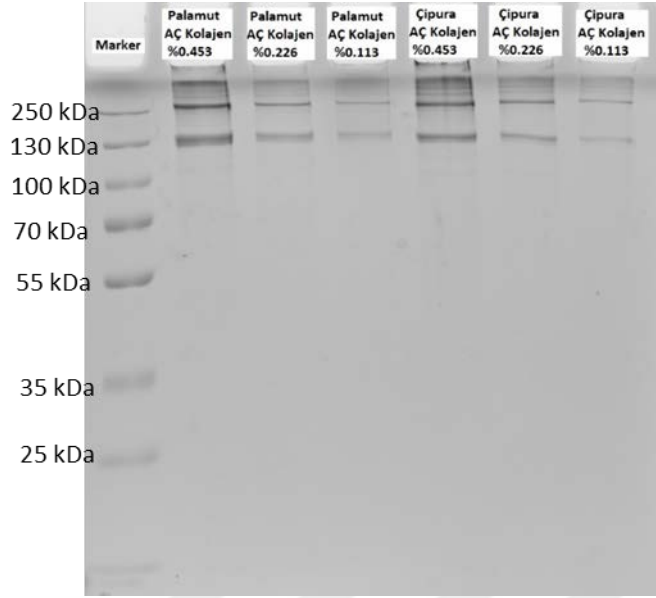
Fangri balığı (*Dentex tumifrons*) pullarından ekstrakte edilerek hesaplanan (Thuy vd. 2014) verim değerinin haricinde, literatürde palamut ve çipura balıklarının başka herhangi bir atık kısmından hesaplanmış verim değeri tespit edilmemiştir. Tespit edilen söz konusu değer ise hesaplama yöntemi itibarıyla bu tezdeki yöntemden farklıdır. Söz konusu hesaplama yöntemi bu tezin “3. Materyal ve Metot” başlığı altında açıklandığı üzere ekstrakttaki hidroksprolin miktarının, kurutulmuş balık pulunda bulunan hidroksprolin miktarına oranlanmasıyla gerçekleştirilmiş ve AÇK ekstraktı için verim değeri %0,90 olarak hesaplanmıştır. Bilgiler dahilinde anlaşılmaktadır ki, bu tezin kapsamında yer alan palamut ve çipura balıklarında AÇK verim hesabının ortaya konması, alanında bir ilktir.

Verim değerindeki farklılıkların; çalışmada kullanılan balık türlerinden, balıkların ekstraksiyon için kullanılan kısımlarından, ekstraksiyon parametrelerindeki farklılıklardan ve hesaplama dahil edilen parametrelerin farklılığından ortaya çıktığı ifade edilebilir.

4.3. Moleküler Ağırlık Düzeyinin Hesaplanması

AÇK numunelerinin, enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin ve asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin; SDS-PAGE analizi ile moleküler ağırlıkları tespit edilmiştir. Elektroforetik olarak yürütülen parçacıklar, moleküler ağırlıklarına göre jel üzerinde gruplara ayrılmışlardır. Jel üzerinde meydana gelen bantlar, “marker” olarak isimlendirilen ve üzerinde moleküler ağırlıklara göre sıralanmış bantlar bulunduran bir standart ile kıyaslanmıştır.

AÇK numunelerinin moleküler ağırlık düzeylerinin belirlenmesi amacıyla palamut ve çipura balık atıklarından elde edilmiş olan AÇK'lerin 3 farklı konsantrasyonu hazırlanmıştır. Bu konsantrasyon değerleri; %0,543, %0,226 ve %0,113 olup konsantrasyon değerleri yapılan ön denemelerle belirlenmiştir. Söz konusu 3 farklı konsantrasyondaki AÇK numuneleri, SDS-PAGE analizine tabi tutularak Şekil 4.3'teki bantlar elde edilmiştir.



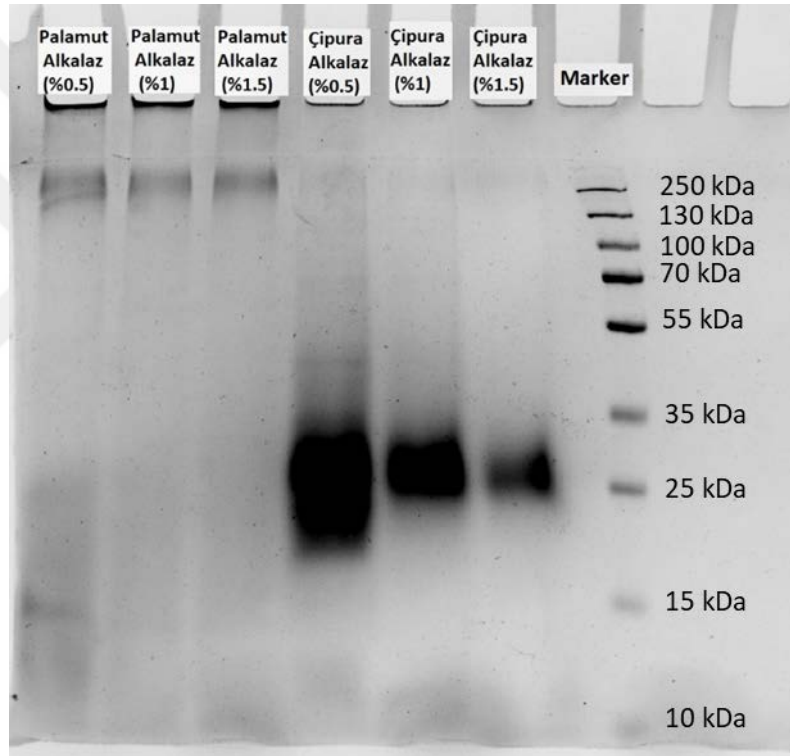
Şekil 4.1. Palamut ve çipura balık atıklarından elde edilmiş olan AÇK moleküler ağırlıklarının gösteren SDS-PAGE görüntüsü (AÇ: Asitte Çözünen)

SDS-PAGE analizi sonucunda her bir konsantrasyon değerine karşılık AÇK’lerden 3 farklı bant elde edildiği tespit edilmiştir. Bunun sebebi; kolajen yapısının temel olarak 3 farklı alt ünitelerden oluşuyor olmasıdır (Zhang, 2009). Bu alt üniteler; genel anlamda α zinciri, β zinciri ve γ zinciridir. Literatür bilgilerinden yola çıkarak ifade edildiğinde; Şekil 4.3’e göre α zincirinin 130 kDa civarında moleküler ağırlığa sahip olduğu (Azizah vd. 2020), β zincirinin 250 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu ve γ zincirinin 250 kDa’dan daha büyük moleküler ağırlığa sahip olduğu tespit edilmiştir. Kolajen kitlesinin alt ünite kompozisyonlarının daha detaylı incelenebilmesi için kolajenin denatüre edici koşullarda daha ileri düzeyde parçalanması gerektiği bildirilmiştir (Zhang, 2009). Buradan anlaşılmaktadır ki, hangi balık kaynağının kullanıldığı fark etmeksizin hem palamut numunesinde hem de çipura numunesinde AÇK yaklaşık 130 kDa ve üzerinde moleküler ağırlıklara sahip alt üniteler içermektedir. Çalışmamızda tespit edilen değerler; “3. Materyal ve Metot” bölümünde açıklanan Hacisa & Baygar (2023), Nurilmala vd. (2020) ve Wei vd. (2019)’in çalışmalarındaki verileri ile uyumludur.

Tip I kolajen, kolajen türleri içerisinde ana kolajen yapıdır. Tespit edilen yapıda, hangi tip kolajenin bulunduğunu belirlemek için alfa zincirleri değerlendirilmektedir. Yapıda alfa-1 ve alfa-2 zincirleri varsa ve alfa-1 zinciri, alfa-2’nin üzerinde bir konumda daha geniş bir bant şeklinde oluşmuşsa; o zaman bu yapının Tip-I kolajen olduğuna karar verilmektedir (Kittiphattanabawon vd. 2005). Çalışmamızda sadece alfa-1 zincirinin tespit edildiği bir sonuç alınmıştır. Uygulanan koşullar altında alfa-2 zinciri jel üzerinde gözlenmemiştir. Bu durum Thuy vd. (2014)’ün belirttiği gibi alfa-1 zincirinin yoğunluğunun alfa-2 zincirinin yoğunluğundan daha yüksek olması ile açıklanabilir. Bununla birlikte moleküler yapının belirlenmesine yönelik olarak uygulanan işlemler, literatürde halihazırda yer alan standart prosedürlerdir. Dolayısıyla bu tez çalışmasındaki AÇK numuneleri, standart referans metotlar kullanılarak ortaya

çıkarılmış olup uygulanan işlemler sonucunda elde edilen yapının sadece AÇK olduğu bilinmektedir.

Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te enzimatik yöntem ile elde edilmiş HKP numunelerinin, SDS-PAGE analizi sonucu ortaya çıkan moleküler ağırlıkları sunulmuştur. Elde edilen bu verilere göre; enzimatik yöntemde palamut balığının alkalaz enzimi ile muamele edilmesi (Şekil 4.4) sonucu moleküler ağırlıkların yaklaşık 130 kDa ile 250 kDa aralığında dağılım gösterdiği, 10 kDa ile 30 kDa arasında ise belli belirsiz bantlaşma eğiliminin olduğu tespit edilmiştir. Bu durum enzimatik yöntemde palamut balığının alkalaz enzimi ile muamele edilmesi sonucunda; AÇK'nin çeşitli yerlerinden parçalanması suretiyle yeni peptitler açığa çıktığını, fakat AÇK'nin parçalanması için alkalaz enziminin söz konusu şartlarda yeteri kadar redüksiyon sağlamadığını göstermiştir.

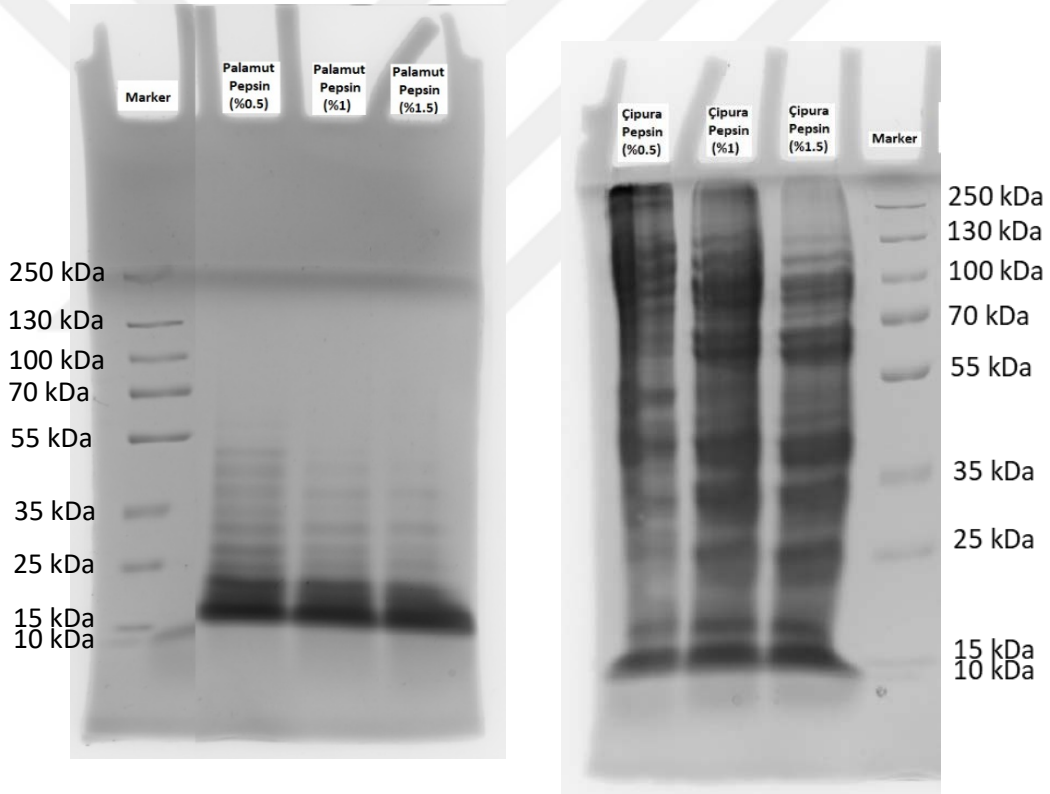


Şekil 4.2. Palamut ve çipuranın enzimatik (alkalaz) ekstraksiyonu ile elde edilen hidrolizatlarının SDS-PAGE jel görüntüsü

Enzimatik yöntemde çipura balığının alkalaz enzimi ile muamelesi sonucunda; HKP numunelerinin moleküler ağırlıklarının yaklaşık 19 kDa ile 55 kDa aralığında ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Bu durum; çipuradaki AÇK numunesinin söz konusu şartlarda alkalaz enzimi ile etkili bir şekilde parçalandığını göstermiştir. AÇK çeşitli yerlerden parçalanmak suretiyle düşük moleküler ağırlıklara sahip HKP numunelerini meydana getirmiştir ve böylece moleküler ağırlık jel üzerinde yaklaşık 19 kDa ile 55 kDa aralığında şekillenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar Chi vd. (2014)'ün İspanyol uskumrusu (*Scomberomorous niphonius*) derisi hidrolizatlarında 5,04 kDa ile 47,82 kDa arasında moleküler ağırlık değerleri elde etmesi ile uyumludur.

HKP numunelerinin moleküler ağırlıklarına yönelik olarak literatürde yeteri kadar kıyaslanabilir veri bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar genellikle AÇK numunelerinin moleküler ağırlığının tespit edilmesi, ardından çeşitli enzimlerle AÇK hidrolizi ve hidrolizatların çeşitli fonksiyonel özelliklerinin ortaya konması şeklindedir. Farklı balık türlerinden elde edilen karışık atık ürünlerin (deri, kafa ve kılçık) kullanıldığı bir çalışmada (Zamorano-Apodaca vd. 2020) elde edilen hidrolizatların 1 ile 27 kDa aralığında olacak şekilde moleküler ağırlık dağılımı gösterdiği bildirilmiştir. Bu açıdan tez çalışmamızdan elde edilen değerlerin Zamorano-Apodaca vd. (2020) ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Enzimatik yöntemde palamut AÇK numunesinin pepsin enzimi ile muamele edilmesi sonucu, HKP numunelerinin moleküler ağırlıklarının yaklaşık 15 kDa ile 55 kDa aralığında yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Bu uygulama sırasında; palamut AÇK numunesinde yer alan uzun peptit zincirleri, çeşitli yerlerinden parçalanarak farklı moleküler ağırlıklar halinde sayıca artış göstermiştir ve daha düşük moleküler ağırlıktaki peptitleri ortaya çıkarmıştır.

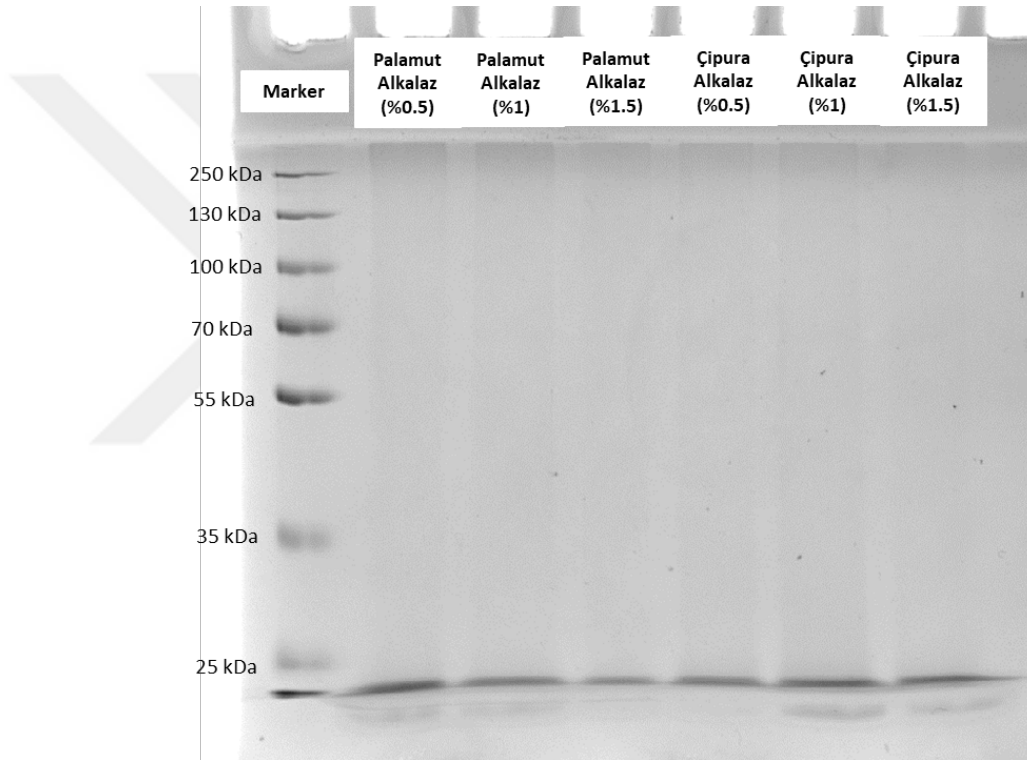


Şekil 4.3. Palamut ve çipuranın enzimatik (pepsin) ekstraksiyonu ile elde edilen hidrolizatlarının SDS-PAGE jel görüntüsü

Enzimatik yöntemde çipura AÇK numunesinin pepsin enzimi ile muamele edilmesi neticesinde; HKP numunelerinin moleküler ağırlıklarının yaklaşık 10 kDa ile yaklaşık 300 kDa aralığında bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Bu işlem sırasında; çipura AÇK numunesinde yer alan peptit zincirleri, çeşitli yerlerinden parçalanarak hem farklı moleküler ağırlıklar halinde dikkate değer ölçüde sayıca artmıştır; hem de bazı peptitlerin moleküler ağırlık düzeylerinde düşüş yaşanmıştır.

Şekil 4.5'e göre aynı konsantrasyondaki pepsin enzimleri; palamut AÇK numunesinde çipuranın AÇK numunesine kıyasla daha küçük moleküler ağırlıklarda HKP numuneleri açığa çıkarmıştır. Çünkü palamut AÇK numunesinde gözlenen en yüksek moleküler ağırlık 55 kDa bantı iken çipura balık atıklarında 250 kDa ve üzerindeki seviyelere kadar SDS-PAGE bantları gözlenmiştir. Çipura AÇK numunesinden; geniş bir skalada çok çeşitli moleküler ağırlıklara sahip bantlar elde edilmesinden ötürü, pepsin enziminin Çipura AÇK numunesini çok çeşitli kısımlardan hidrolitik parçalamaya maruz bıraktığı anlaşılmıştır.

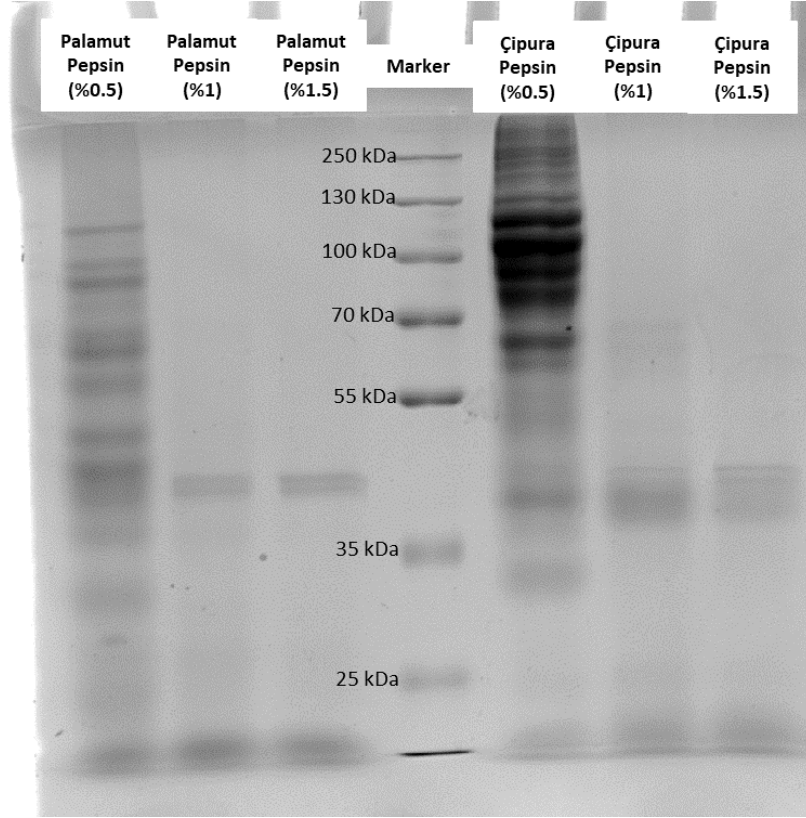
Enzimatik yöntemle alakalı olarak çipura kolajeninde alkalaz enziminin daha etkili bir şekilde hidroliz gerçekleştirdiği (19 kDa ile 55 kDa arası), palamut kolajeninde ise pepsin enziminin daha etkili bir şekilde hidroliz gerçekleştirdiği (15 kDa ile 55 kDa arası) tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Palamut ve çipuradan asidik yöntem (alkalaz) aracılığıyla elde edilmiş olan hidrolizatlarının SDS-PAGE jel görüntüsü

Asidik yöntemde palamut ve çipura balık atıklarının alkalaz enzimi ile muamele edilmesi sonucu elde edilen HKP numunelerinin tamamının moleküler ağırlıklarının yaklaşık olarak 10 kDa ve altında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Buradan anlaşılmaktadır ki; asidik yöntemde asit ekstraksiyonu ve arkasından gelen enzim (alkalaz) uygulaması ile hidrolize peptitlerin moleküler ağırlıklarında oldukça önemli oranda azalma meydana gelmektedir. Asidik yöntemde ortaya çıkan bu avantajlı durumdaki etkili faktörün; AÇK numunesi ile alkalaz enziminin asidik yöntemde daha kolay interaksyona girme imkanı bulması olduğu ifade edilebilir.

Bununla birlikte; bu çalışma kapsamında 10 kDa moleküler ağırlığının altına indirgenen HKP numunelerinin moleküler ağırlıkları tayin edilmemiştir. 10 kDa altındaki moleküler ağırlıkların tayin edilmesi başka bir çalışmanın konusu olup bu tezin devamındaki süreçte konuyla ilgili başka çalışmaların da gerçekleştirilmesi planlanmaktadır.



Şekil 4.5. Palamut ve çipuradan asidik yöntem (pepsin) aracılığıyla elde edilmiş olan hidrolizatlarının SDS-PAGE jel görüntüsü

Asidik yöntemdeki palamut balık atıklarından %0,5 konsantrasyonundaki pepsin enzimi kullanılarak yapılan hidroliz işlemi sonucunda; HKP numunelerinin moleküler ağırlıklarının yaklaşık 10 kDa ile 115 kDa aralığında yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Aynı şartlarda enzim konsantrasyonu artırılarak %1 pepsin ve %1,5 pepsin konsantrasyonlarında yaklaşık 10 kDa ve yaklaşık 45 kDa düzeylerinde bantlar elde edildiği gözlenmiştir. Buradan anlaşılmaktadır ki; enzim konsantrasyonu arttıkça, farklı moleküler ağırlığa sahip peptitler daha küçük moleküler ağırlıklara parçalanarak daha düşük düzeydeki bantları oluşturma eğilimine girmektedirler. Burada mevzu bahis olan durumda; 10 kDa ile 115 kDa arasında olmak üzere geniş bir aralıkta yayılma gösteren peptitler; parçalandıkça yaklaşık 10 kDa ve 45 kDa düzeylerindeki 2 farklı alanda bantlaşarak toplanma özelliği göstermişlerdir.

Asidik yöntemde çipura balığının %0,5 konsantrasyonundaki pepsin enzimi ile hidrolizi sonucunda ise; HKP numunelerinin moleküler ağırlıklarının yaklaşık 10 kDa ile >250 kDa aralığında dağılım gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Aynı bant daha detaylı incelendiğinde; HKP numunelerinin özellikle yaklaşık 65 kDa ile 130 kDa

aralığında daha yoğun bantlaşmalar gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer şartlar aynı tutularak sadece pepsin konsantrasyonu %1 ve %1,5'e çıkarıldığında; HKP numunelerinin yaklaşık 10 kDa ve 40 kDa düzeylerinde bantlaşmalar gösterdiği tespit edilmiştir. Buradan anlaşılmaktadır ki; enzim konsantrasyonu arttıkça farklı moleküler ağırlığa sahip peptitler daha küçük moleküler ağırlıklara parçalanarak belli bantları oluşturma eğilimine girmektedirler. Burada mevzubahis olan durumda; 10 kDa ile >250 kDa arasında olmak üzere geniş bir aralıkta yayılma gösteren peptitler; parçalandıkça yaklaşık 10 kDa ve 40 kDa düzeylerindeki 2 farklı alanda bantlaşarak toplanma özelliği göstermişlerdir.

Asidik yöntemde alkalaz enziminin AÇK ile daha kolay interaksiyona girebilme imkanı bulunduğu (Şekil 4.6) ifade edilmişti. Aynı durumun; alkalaz enzimi kadar bariz olmasa da pepsin enzimi için de söz konusu olduğu Şekil 4.7'den anlaşılmaktadır. Daha açık bir ifade ile; asidik yöntemde pepsin enzimi (özellikle %1 ve %1,5 oranlarındaki pepsin enzimi), enzimatik yöntemle göre numune ile daha iyi interaksiyona girerek moleküler yapıyı daha çok indirgeme imkanı bulmaktadır.

Moleküler ağırlıkların tespit edilmesi analizi doğrultusunda şu tespitler yapılmıştır:

-Enzimatik yöntemde alkalaz enzimi, çipura kolajen hidrolizi açısından daha etkili olmuştur. Çünkü HKP'ler alkalaz enzimi ile daha küçük moleküler ağırlıklara kadar indirgenebilmiştir. Palamut için ise enzimatik yöntemde pepsin enzimi, kolajen hidrolizi açısından daha etkili olmuştur. Çünkü burada da aynı şekilde HKP'ler pepsin enzimi ile daha küçük moleküler ağırlıklara kadar indirgenebilmiştir.

-Asidik yöntemde AÇK numunelerinin hidrolize edilmesi açısından alkalaz daha etkili olmuştur. Çünkü alkalaz HKP numunelerinde, moleküler ağırlıkların 10 kDa ve altına ineceği düzeyde bir indirgeme gerçekleştirmiştir.

-Asidik yöntemde AÇK numunelerinin hidrolize edilmesi açısından pepsin ile ilgili palamut ve çipuradan benzer sonuçlar alındığı tespit edilmiştir. Çünkü her iki balık için de moleküler ağırlıklar yaklaşık olarak aynı düzeylere kadar düşürülebilmektedir.

-Asidik yöntem ile elde edilen HKP moleküler ağırlıklarının, enzimatik yöntemdekine kıyasla daha düşük düzeylere indirgenebildiği tespit edilmiştir.

Yöntemler arası etkililik açısından kıyas yapmak gerekirse şunlar söylenebilir: Enzimatik yöntemin uygulama kolaylığı göz önünde bulundurularak sonuçlar değerlendirildiğinde; enzimatik yöntemde moleküler ağırlık açısından oldukça tatmin edici sonuçlar ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Direkt sonuç odaklı bir değerlendirme yapıldığında ise benzer şartlarda asidik yöntemin daha etkili olduğu ifade edilebilmektedir. Enzimatik yöntemin SDS-PAGE jellerindeki belli belirsiz bantlaşmalar, palamut atıklarının alkalaz enzimi ile yeterince interaksiyona giremediğini ve bu yüzden yeterince redüksiyon sağlanamadığını göstermiştir. Buna karşın; palamut atıklarının, asidik yöntemde olduğu üzere ekstraksiyon ve hidroliz aşamalarını sırayla geçirmesi neticesinde, indirgenme düzeyi açısından daha etkili sonuçlar alınabildiği ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlarda etkili faktörlerden iki

tanisinin burada görüldüğü üzere kaynak materyal ve enzim tipinin olduğu ifade edilebilmektedir.

4.4. Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi

Literatürde birden fazla antioksidan analiz yöntemi ile optimizasyon çalışmaları yapılarak farklı yöntemlerle sonuç bildiriminin bilimsel açıdan daha sağlıklı bir yol olduğu ifade edilmiştir (Ardağ, 2008). Bu açıdan bu projede çeşitli antioksidan analiz yöntemleriyle birtakım denemeler gerçekleştirilmiştir. En sağlıklı sonuçların alınabildiği DPPH ve ABTS radikal süpürücü yöntemlerinin sonuçlarına dayanarak numunelerdeki antioksidan aktivitelerin değerlendirilmesine karar verilmiştir.

2 adet AÇK ve 24 adet HKP numunesinin antioksidan aktivitesinin tespitine yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Sulu faz içeren numunelerin RSA oranlarının belirlenmesinde ABTS analizinin mükemmel bir araç olduğu ifade edilmiştir (Kusumaningtyas vd. 2019). Bu yüzden en çok tercih edilen antioksidan analiz yöntemi olan DDPH radikal süpürücü yönteminin haricinde ayrıca ABTS radikali süpürücü etki numuneler üzerinde araştırılmıştır. Elde edilen veriler, çalışmanın kendi içerisinde ve literatür bilgileri ile kıyaslanarak değerlendirmelerde bulunulmuştur.

Optimizasyon çalışmaları sırasında; bazı numunelerinin sahip olduğu bulanıklık özelliklerinin hidrolizatların antioksidan aktivitesinin tayinini zorlaştırdığı tespit edilmiş olup hidrolizat numunelerinin hepsinin 0.45 µm düzeyindeki filtrelerden geçirildikten sonra kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.6. Hidrolizatların 0.45 µm filtrelerden geçirilmesi işlemi

AÇK numunelerinin ve filtrelenen HKP numunelerinin antioksidan aktivitesi kapsamında gerçekleştirilen DPPH yöntemi ve ABTS yönteminin her ikisindeki radikal süpürücü etkiler; TE, IC₅₀ ve %RSA olmak üzere 3 farklı şekilde ifade edilerek Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.1. AÇK numunelerinin DPPH ve ABTS radikali süpürme etkinlikleri

Numune	DPPH		
	TE ($\mu\text{mol/g}$ hidrolizat)	IC ₅₀ (mg)	% RSA
Palamut AÇK	0,230 $\pm$ 0,008	30,081 $\pm$ 0,452	10,560 $\pm$ 0,072
Çipura AÇK	0,171 $\pm$ 0,007	42,286 $\pm$ 0,596	4,470 $\pm$ 0,024
Numune	ABTS		
	TE ($\mu\text{mol/g}$ hidrolizat)	IC ₅₀ (mg)	% RSA
Palamut AÇK	16,902 $\pm$ 0,141	16,284 $\pm$ 0,107	15,140 $\pm$ 0,170
Çipura AÇK	16,818 $\pm$ 0,159	19,000 $\pm$ 0,153	14,213 $\pm$ 0,118

TE: Trolox Eşdeğeri, IC₅₀: %50 inhibisyon konsantrasyonu, RSA: Radikal Süpürme Aktivitesi, AÇK: Asitte Çözünür Kolajen, Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Gerek DPPH analizinde gerek ABTS analizinde AÇK numunelerinden elde edilen radikal süpürme aktivitesi değerlerinin literatür değerlerinden daha düşük olarak ortaya çıkmış olduğu görülmüştür. Buradan anlaşılmaktadır ki; palamut ve çipuradan elde edilen asidik karakterdeki kolajenlerin antioksidan kapasiteleri sınırlıdır. Palamut AÇK numunesi için antioksidan kapasite %10-%15 RSA arasında yer almaktadır. Çipura AÇK numunesi için ise antioksidan kapasite %5-15 RSA arasında yer almaktadır.

RSA değerleri ile TE değerleri ekseriyetle birbirleriyle orantılı sonuçlar verdiğinden antioksidan kapasitesi değerlendirmeleri, TE değerlerinden daha çok RSA değerleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. IC₅₀ değerleri ile alakalı olarak da çeşitli değerlendirmeler yapılmıştır.

Bu tez çalışmasındaki AÇK numunelerine ait antioksidan kapasitelerinin, %5 ile %15 aralığında değiştiği göz önünde bulundurulduğunda söz konusu AÇK numunelerinin; kırmızı tilapia (*Oreochromis* sp.) balığı derisinden elde edilen AÇK'den (Medina-Medrano vd. 2019) ve *Miichthys miiuy* balığı pullarından elde edilen AÇK'den (Li vd. 2018) daha düşük oranda RSA meydana getirdiği tespit edilmiştir (Bknz. 2.6 *Antioksidan Kapasite*).

IC₅₀ değeri açısından değerlendirildiğinde kırmızı tilapia balığı iç organlarından elde edilen AÇK'nin IC₅₀ değeri (2,22 mg ABTS), bu çalışmadaki palamut (16,284 mg) ve çipuradan (19,000 mg) elde edilenlere göre daha düşüktür. Fakat daha düşük IC₅₀ değeri, daha fazla antioksidan kapasitesi anlamı taşımaktadır. Bu açıdan palamut ve çipura AÇK numunelerinin antioksidatif kapasitelerinin, kırmızı tilapia balığına kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Verilen değerler ABTS analiz yöntemi kullanarak ortaya konmuş değerler olup DPPH analiz yöntemine göre de benzer sonuçların alındığı; yani DPPH analiz yöntemine göre de palamut ve çipura balıklarının antioksidatif kapasitelerinin kırmızı tilapia balığına göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte bu tez çalışmasında palamut balığından elde edilen AÇK numunesine dair ABTS analizindeki IC₅₀ değerinin; kaptan ton balığı AÇK

numunesinden elde edilen IC₅₀ değeri (Chanmangkang vd. 2022) ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. incelendiğinde; DPPH analizinde alınan sonuçlar ile ABTS analizinden alınan sonuçların birebir örtüşmediği görülmektedir. Bir numunenin, DPPH ve ABTS analizlerinden elde edilen sonuçlarının aynı olmaması olağan bir durum olup literatürde de örneklerine rastlanmaktadır (Chanmangkang vd. 2022). Antioksidatif etki açısından DPPH radikalini süpürmenin ABTS radikale göre biraz daha zor olduğu ve bu yüzden DPPH analizi ile ABTS analizinden farklı sonuçlar alındığı ifade edilmektedir. Örneğin; Nurilmala vd. (2020)'nin çalışmasında kolajen ve fraksiyonlarının ABTS analizindeki temizleme aktiviteleri, DPPH analizine kıyasla çok daha yüksek olarak bulunmuştur. Nurilmala vd. (2020) bu duruma neden olarak; ABTS testinin hidrofobik ve hidrofilik bileşikleri saptama eğiliminde olması, DPPH testinin ise daha çok hidrofobik olanlar için uygun olmasını gerekçelendirmiştir. Çalışmada 3–10 kDa moleküler ağırlığındaki peptitlerde DPPH için yaklaşık %50 oranında, ABTS için yaklaşık %90 oranında radikal süpürücü etki elde edilmiştir (Nurilmala vd. 2020).

Analizlerin tamamlanmasından sonra elde edilen verilerin istatistiksel analizleri gerçekleştirilmiştir. Öncelikle verilerin normal dağılıma uyup uymadığı test edilmiştir. Bunun için; gruplar içerisindeki değerler dikkate alınarak grup içi değerler birbirleri ile kıyaslanmıştır. Verilerin normal dağılıma uyduğu görüldükten sonra ise veriler, “bağımsız örneklerde t-testi” ve “tek yönlü varyans analizi (ANOVA)” yöntemleri kullanılarak analiz edilmiş; ortalamalar arasındaki farkların önemli olup olmadığı %5 önem seviyesinde test edilmiştir.

Palamut ve çipura atıkları arasındaki farklılığın değerlendirilmesi amacıyla palamut ve çipura balıkları arasında “bağımsız örneklerde t-testi” uygulanmıştır. Herhangi bir balık atığının farklı enzim konsantrasyonlarının birer grup olarak ele alınması neticesinde; RSA'nın tüm sonuçları üzerinde tek yönlü ANOVA testi uygulanmıştır ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Ayrıca gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi amacıyla da ANOVA testi uygulanmıştır ve ilgili sonuçlar Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5'te sunularak metin içerisinde değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.2. Enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin DPPH radikali üzerindeki antioksidan kapasitesi

Hidrolizat Numunesi	TE ($\mu\text{mol/g}$ hidrolizat)	IC ₅₀ (mg)	% RSA
PA1 (%0,5 enzim)	2,736 $\pm$ 0,078	8,087 $\pm$ 0,096	31,067 $\pm$ 0,743 b
PA2 (%1,0 enzim)	2,519 $\pm$ 0,097	8,950 $\pm$ 0,083	28,933 $\pm$ 0,665 c
PA3 (%1,5 enzim)	3,440 $\pm$ 0,081	6,698 $\pm$ 0,077	38,000 $\pm$ 0,758 a
ÇA1 (%0,5 enzim)	0,853 $\pm$ 0,008	22,563 $\pm$ 0,512	12,533 $\pm$ 0,360 f
ÇA2 (%1,0 enzim)	0,745 $\pm$ 0,009	20,211 $\pm$ 0,468	11,467 $\pm$ 0,354 g
ÇA3 (%1,5 enzim)	1,083 $\pm$ 0,017	17,000 $\pm$ 0,244	14,800 $\pm$ 0,246 d
PP1 (%0,5 enzim)	0,676 $\pm$ 0,007	21,500 $\pm$ 0,460	13,333 $\pm$ 0,278 e
PP2 (%1,0 enzim)	0,455 $\pm$ 0,050	29,231 $\pm$ 0,641	11,111 $\pm$ 0,185 g
PP3 (%1,5 enzim)	0,565 $\pm$ 0,006	30,500 $\pm$ 0,627	12,222 $\pm$ 0,250 f
ÇP1 (%0,5 enzim)	2,773 $\pm$ 0,064	39,000 $\pm$ 0,684	8,537 $\pm$ 0,074 h
ÇP2 (%1,0 enzim)	1,175 $\pm$ 0,045	46,556 $\pm$ 0,731	4,390 $\pm$ 0,047 i
ÇP3 (%1,5 enzim)	1,410 $\pm$ 0,036	41,900 $\pm$ 0,716	5,000 $\pm$ 0,031 i

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (TE: Trolox Eşdeğeri, IC₅₀: %50 inhibisyon konsantrasyonu, RSA: Radikal Süpürme Aktivitesi, PA: Enzimatik yöntemde palamut atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, ÇA: Enzimatik yöntemde çipura atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, PP: Enzimatik yöntemde palamut atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, ÇP: Enzimatik yöntemde çipura atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz), Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.2 doğrultusunda; enzimatik yöntemde alkalaz enziminin DPPH radikali kullanılarak elde edilen antioksidan değerleri açısından “bağımsız örneklerde t-testi”ne göre palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda farklılık bulunmaktadır ($p < 0,05$). Aynı şekilde Çizelge 4.2 doğrultusunda; pepsin enziminin elde edilen antioksidan değerleri açısından da “bağımsız örneklerde t-testi”ne göre palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda farklılık bulunmaktadır ($p < 0,05$).

Çizelge 4.2’nin %RSA değerlerinde gruplar arasındaki ortalama değerlerin farkları incelendiği zaman şunlar ifade edilebilmektedir: Palamut atıklarından %1,5 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (PP3) ile çipura atıklarından %0,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (ÇA1) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Çipura atıklarından %1 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (ÇA2) ile palamut atıklarından %1 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (PP2) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Çipura atıklarından %1 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (ÇP2) ile çipura atıklarından %1,5 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (ÇP3) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Sayılan numuneler haricinde Çizelge 4.2’de yer alan diğer numunelerde enzimatik yöntemle tespit edilen DPPH RSA oranları açısından istatistiksel anlamda önemli farklar olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.3. Enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin ABTS radikali üzerindeki antioksidan kapasitesi

Hidrolizat Numunesi	TE (µmol/g hidrolizat)	IC ₅₀ (mg)	% RSA
PA1 (%0,5 enzim)	24,323±0,390	2,454±0,083	99,404±0,445 a
PA2 (%1,0 enzim)	23,531±0,362	2,578±0,040	96,177±0,610 d
PA3 (%1,5 enzim)	23,382±0,356	2,807±0,068	95,570±0,599 d
ÇA1 (%0,5 enzim)	24,131±0,434	2,568±0,097	98,623±0,430 b
ÇA2 (%1,0 enzim)	23,844±0,383	2,635±0,090	97,451±0,574 c
ÇA3 (%1,5 enzim)	24,141±0,403	2,544±0,012	98,664±0,499 b
PP1 (%0,5 enzim)	4,792±0,090	13,033±0,381	19,908±0,295 j
PP2 (%1,0 enzim)	5,031±0,097	12,370±0,225	20,880±0,309 i
PP3 (%1,5 enzim)	5,366±0,093	11,472±0,284	22,241±0,256 h
ÇP1 (%0,5 enzim)	13,241±0,328	4,606±0,091	54,217±0,117 e
ÇP2 (%1,0 enzim)	12,467±0,294	4,893±0,093	51,075±0,150 g
ÇP3 (%1,5 enzim)	12,777±0,274	4,774±0,089	52,333±0,318 f

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (TE: Trolox Eşdeğeri, IC₅₀: %50 inhibisyon konsantrasyonu, RSA: Radikal Süpürme Aktivitesi, PA: Enzimatik yöntemde palamut atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, ÇA: Enzimatik yöntemde çipura atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, PP: Enzimatik yöntemde palamut atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, ÇP: Enzimatik yöntemde çipura atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz), Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.3 doğrultusunda; enzimatik yöntemde alkalaz enziminden ABTS radikali kullanılarak elde edilen antioksidan değerleri açısından “bağımsız örneklerde t-testi”ne göre palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda farklılık bulunmaktadır ($p < 0,05$). Bununla birlikte; Çizelge 4.3 doğrultusunda pepsin enziminden elde edilen antioksidan değerleri açısından “bağımsız örneklerde t-testi”ne göre palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda fark bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Çizelge 4.3’teki verilerin grup içi ANOVA testinin sonuçlarına göre şunlar tespit edilmiştir: Enzimatik yöntemde palamut atıklarının alkalaz ile hidrolize edilmesinden elde edilen HKP numunelerinde (PA1, PA2 ve PA3), alkalaz konsantrasyonu artışı, antioksidan aktivitenin grup içinde düşmesine neden olmuştur. PA1, PA2 ve PA3 arasında grup içi en yüksek antioksidan aktivite %0,5 enzim konsantrasyonu (PA1) ile ortaya çıkmıştır. Palamut atıklarının pepsin ile hidrolize edilmesinden elde edilen HKP numunelerinde (PP1, PP2 ve PP3), enzim konsantrasyonu arttıkça giderek artan bir antioksidan aktivite meydana gelmiştir. PP1, PP2 ve PP3 arasında, grup içi en yüksek antioksidan aktivite %1,5 pepsin konsantrasyonu (PP3) ile ortaya çıkmıştır. Çipura atıklarında alkalaz enzimi ile elde edilen HKP numunelerinde (ÇA1, ÇA2, ÇA3) ve pepsin enzimi ile elde edilen HKP numunelerinde (ÇP1, ÇP2, ÇP3), grup içi en yüksek antioksidan aktiviteler %0,5 enzim konsantrasyonlarında ortaya çıkmıştır. Çipura atıklarında hem alkalaz hem pepsin enzimi için enzim konsantrasyonunun artışı antioksidan aktiviteyi düşürmüştür.

Gruplar arası ANOVA testinin sonuçları doğrultusunda; Çizelge 4.3'te de görüleceği üzere çipura atıklarından %0,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (ÇA1) ve çipura atıklarından %1,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (ÇA3) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Palamut atıklarından %1 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (PA2) ve palamut atıklarından %1,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (PA3) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Sayılan numuneler haricinde Çizelge 4.3'teki diğer numunelerde enzimatik yöntemle tespit edilen ABTS RSA oranları açısından istatistiksel anlamda önemli farklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.4. Asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin DPPH radikali üzerindeki antioksidan kapasitesi

Hidrolizat Numunesi	TE ($\mu\text{mol/g}$ hidrolizat)	IC ₅₀ (mg)	% RSA
APA1 (%0,5 enzim)	2,343 $\pm$ 0,034	10,896 $\pm$ 0,218	27,200 $\pm$ 0,456 a
APA2 (%1,0 enzim)	2,099 $\pm$ 0,022	12,000 $\pm$ 0,356	24,800 $\pm$ 0,569 b
APA3 (%1,5 enzim)	1,259 $\pm$ 0,015	18,211 $\pm$ 0,302	16,533 $\pm$ 0,345 f
AÇA1 (%0,5 enzim)	1,258 $\pm$ 0,056	19,141 $\pm$ 0,294	16,884 $\pm$ 0,336 f
AÇA2 (%1,0 enzim)	1,381 $\pm$ 0,068	18,444 $\pm$ 0,267	17,773 $\pm$ 0,382 e
AÇA3 (%1,5 enzim)	1,368 $\pm$ 0,043	17,789 $\pm$ 0,289	17,600 $\pm$ 0,314 e
APP1 (%0,5 enzim)	1,693 $\pm$ 0,049	21,846 $\pm$ 0,326	20,800 $\pm$ 0,381 c
APP2 (%1,0 enzim)	1,503 $\pm$ 0,076	26,182 $\pm$ 0,347	18,933 $\pm$ 0,368 d
APP3 (%1,5 enzim)	1,490 $\pm$ 0,075	26,273 $\pm$ 0,396	18,800 $\pm$ 0,309 d
AÇP1 (%0,5 enzim)	1,016 $\pm$ 0,034	43,429 $\pm$ 0,473	14,133 $\pm$ 0,265 h
AÇP2 (%1,0 enzim)	1,138 $\pm$ 0,016	37,375 $\pm$ 0,449	15,333 $\pm$ 0,255 g
AÇP3 (%1,5 enzim)	1,083 $\pm$ 0,049	37,500 $\pm$ 0,361	14,800 $\pm$ 0,217 g

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (TE: Trolox Eşdeğeri, IC₅₀: %50 inhibisyon konsantrasyonu, RSA: Radikal Süpürme Aktivitesi, APA: Asidik yöntemde palamut atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, AÇA: Asidik yöntemde çipura atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, APP: Asidik yöntemde palamut atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, AÇP: Asidik yöntemde çipura atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz), Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.4 doğrultusunda; asidik yöntemde alkalaz enziminin DPPH radikali kullanılarak elde edilen antioksidan değerleri açısından “bağımsız örneklerde t-testi”ne göre palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda farklılık bulunduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Aynı şekilde asidik yöntemde pepsin enziminin DPPH radikali kullanılarak elde edilen antioksidan değerleri açısından “bağımsız örneklerde t-testi”ne göre palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda farklılık bulunduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.4'te yer aldığı üzere; ANOVA testinin sonuçlarına göre çipura atıklarından %1 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (AÇP2) ile çipura atıklarından %1,5 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (AÇP3) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Palamut atıklarından %1,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (APA3) ile çipura atıklarından %0,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (AÇA1) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır

($p>0,05$). Çipura atıklarından %1,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (AÇA3) ile çipura atıklarından %1 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (AÇA2) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Palamut atıklarından %1,5 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (APP3) ile palamut atıklarından %1 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (APP2) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Sayılan numuneler haricinde Çizelge 4.4'te yer alan diğer numunelerde enzimatik yöntemle tespit edilen DPPH RSA oranları açısından istatistiksel anlamda önemli farklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.5. Asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin ABTS radikali üzerindeki antioksidan kapasitesi

Hidrolizat Numunesi	TE ($\mu\text{mol/g}$ hidrolizat)	IC ₅₀ (mg)	% RSA
APA1 (%0,5 enzim)	14,486 $\pm$ 0,372	5,855 $\pm$ 0,060	42,171 $\pm$ 0,532 d
APA2 (%1,0 enzim)	11,689 $\pm$ 0,210	7,162 $\pm$ 0,092	33,518 $\pm$ 0,457 e
APA3 (%1,5 enzim)	14,250 $\pm$ 0,327	5,918 $\pm$ 0,075	41,442 $\pm$ 0,542 d
AÇA1 (%0,5 enzim)	15,741 $\pm$ 0,312	5,414 $\pm$ 0,083	46,054 $\pm$ 0,644 c
AÇA2 (%1,0 enzim)	15,106 $\pm$ 0,345	5,420 $\pm$ 0,074	56,466 $\pm$ 0,711 a
AÇA3 (%1,5 enzim)	15,649 $\pm$ 0,318	5,332 $\pm$ 0,081	48,146 $\pm$ 0,628 b
APP1 (%0,5 enzim)	3,891 $\pm$ 0,078	9,687 $\pm$ 0,291	26,885 $\pm$ 0,446 h
APP2 (%1,0 enzim)	3,673 $\pm$ 0,058	9,888 $\pm$ 0,285	26,515 $\pm$ 0,492 h
APP3 (%1,5 enzim)	3,995 $\pm$ 0,043	9,562 $\pm$ 0,248	27,360 $\pm$ 0,450 h
AÇP1 (%0,5 enzim)	3,935 $\pm$ 0,019	8,604 $\pm$ 0,184	30,021 $\pm$ 0,456 g
AÇP2 (%1,0 enzim)	3,992 $\pm$ 0,083	8,253 $\pm$ 0,167	31,278 $\pm$ 0,443 f
AÇP3 (%1,5 enzim)	3,987 $\pm$ 0,072	8,777 $\pm$ 0,104	29,620 $\pm$ 0,313 g

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (TE: Trolox Eşdeğeri, IC₅₀: %50 inhibisyon konsantrasyonu, RSA: Radikal Süpürme Aktivitesi, APA: Asidik yöntemde palamut atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, AÇA: Asidik yöntemde çipura atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, APP: Asidik yöntemde palamut atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, AÇP: Asidik yöntemde çipura atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz), Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.5 doğrultusunda; asidik yöntemde alkalaz enziminin ABTS radikali kullanılarak elde edilen antioksidan değerleri açısından “bağımsız örneklerde t-testi”ne göre palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Aynı şekilde Çizelge 4.5 doğrultusunda; pepsin enziminin elde edilen antioksidan değerleri açısından da “bağımsız örneklerde t-testi”ne göre palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Sonuç olarak; enzimatik yöntemde pepsin enzimi ile gerçekleştirilen hidrolizatlarda ve asidik yöntemde hem alkalaz hem pepsin enzimleriyle gerçekleştirilen hidrolizatlarda; ABTS radikali kullanılarak elde edilen antioksidan aktiviteleri için palamut ve çipura atıkları arasında fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bunlar dışında, her iki yöntemde ait palamut ve çipura atıkları arasında antioksidan aktivite yönünden önemli düzeyde farklar bulunmuştur ($p<0,05$).

Çizelge 4.5'teki verilerin grup içi ANOVA testinin sonuçlarına göre şunlar söylenebilmektedir: Asidik yöntemde palamut atıklarının, alkalaz enzimi ile elde edilen

HKP numuneleri (APA1, APA2, APA3) için ve pepsin enzimi ile elde edilen HKP numuneleri (APP1, APP2, APP3) için; %0,5 enzim konsantrasyonunun antioksidan aktivite açısından optimum değer olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte; pepsin enzimi konsantrasyonunun değişiminin antioksidan aktiviteyi önemli düzeyde değiştirmedığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Çipura atıklarının ise alkalaz enzimi ile elde edilen HKP numuneleri (AÇA1, AÇA2, AÇA3) için ve pepsin enzimi ile elde edilen HKP numuneleri (AÇP1, AÇP2, AÇP3) için; %1 enzim konsantrasyonunun antioksidan aktivite açısından optimum değer olduğu görülmüştür. Çipura HKP numunelerinde antioksidan aktivite, %0,5 enzim konsantrasyonundan %1 enzim konsantrasyonuna geçildiğinde yükselmiştir fakat %1 enzim konsantrasyonunun üzerine çıkıldığında düşmüştür.

Gruplar arası ANOVA sonuçlarına göre palamut atıklarından pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizatlar (APP1, APP2 ve APP3) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Çipura atıklarından %0,5 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (AÇP1) ile çipura atıklarından %1,5 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (AÇP3) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Palamut atıklarından %0,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (APA1) ile palamut atıklarından %1,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (APA3) arasında istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Sayılan numuneler haricinde Çizelge 4.5'te yer alan diğer numunelerde enzimatik yöntemle tespit edilen ABTS RSA oranları açısından istatistiksel anlamda önemli farklar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Hidroliz işlemi sayesinde hem ABTS hem de DPPH analizlerinde, numunelerdeki radikal süpürücü etkinin arttığı yani yeni oluşan peptitlerin antioksidan aktiviteyi arttırdığı bildirilmiştir (Nurilmala vd. 2020). AÇK numunelerinin enzimler vasıtasıyla hidrolizatlara dönüştürülmesi sonrasında ortaya çıkan antioksidatif kapasitesinin literatür verilerinde (Khiari vd. 2014; Hong vd. 2019; Zhang vd. 2019; Azizah vd. 2020; Nurilmala vd. 2020) de söz konusu olduğu üzere artmış olduğu tespit edilmiştir. Örneğin; DPPH analizlerindeki palamut AÇK numunesine kıyasla enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinde %5,218 ile %259,848 arasında RSA artışı; asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinde ise %56,563 ile %157,576 arasında RSA artışı gözlenmiştir.

Palamut AÇK numunesine kıyasla palamut HKP numunelerinde RSA artışı, ABTS analizlerinde daha fazla oranda gerçekleşmiştir. Örneğin; ABTS analizlerindeki palamut AÇK numunesine kıyasla enzimatik yöntemle elde edilen palamut HKP numunelerinde %31,493 ile %556,565 arasında RSA artışı; asidik yöntemle elde edilen palamut HKP numunelerinde ise %75,132 ile %178,540 arasında RSA artışı gözlenmiştir.

Enzimatik yöntemle elde edilen çipura HKP numuneleri incelendiğinde; DPPH analizinde hidrolizatların %231,100 oranına kadar RSA artışı gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte sadece bir numunede (ÇP2), AÇK numunesine kıyasla hidrolizatta RSA artışı tespit edilememiştir. Aynı numunelerin ABTS analizi ile sonuçları değerlendirildiğinde ise; %259,354 ile %594,181 aralığında RSA artışının elde edilmiş olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgiden yola çıkarak ve tüm sonuçların genel değerlendirmesi neticesinde HKP numunelerinin, DPPH yöntemine göre ABTS antioksidan aktivite tayini yöntemine daha uygun olduğu yargısına ulaşılmıştır.

Asidik yöntemle elde edilen çipura HKP numunelerinin; DPPH yönteminde AÇK numunesine kıyasla %216,174 ile %297,606 arasında RSA artışı gösterdiği; ABTS yönteminde ise %108,401 ile %297,284 arasında RSA artışı gösterdiği tespit edilmiştir.

En yüksek oranda RSA artışı, tahmin edildiği gibi enzimatik yöntemde görülmüştür. Alkalaz enziminin kullanıldığı enzimatik yöntemde ABTS analizi ile AÇK numunesine kıyasla çipura balığı kolajeninde %594,181 oranına kadar antioksidan aktivite artışı tespit edilmiştir. Söz konusu oran, aynı şartlardaki palamut balığı için %556,565 oranına kadar düzeyde tespit edilmiştir.

HKP numunelerinin antioksidan kapasiteleri, IC₅₀ cinsinden de AÇK numunelerine göre artış göstermiştir. Bu durum özellikle; daha tutarlı sonuçların alınabildiği ABTS analizinde daha çok öne çıkmıştır. HKP numunelerinin antioksidan kapasitelerinin AÇK numunelerine göre literatür bilgileri de göz önünde bulundurulduğunda genellikle daha fazla olduğu daha önce ifade edilmişti. Chanmangkang vd. (2022)'nin çalışmasından elde edilen sonuçlar bu açıdan ilginçtir. Çünkü kaptan ton balığı (*Katsuwonus pelamis*) kuyruk kısmından elde edilen AÇK numunesinden hem DPPH analizi ile hem de ABTS analizi ile elde edilen radikal süpürücü etkinin (IC₅₀ cinsinden); hidrolizat numunesinden elde edilenden fazla ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Hidroliz sırasında 0,5 M asetik asit ve %1 pepsin karışım çözeltisinin birlikte kullanılmış olmasına rağmen; ekstraksiyon çözeltisi olarak 0,5 M asetik asitin tek başına kullanılmış olmasına kıyasla numunelerde daha az oranda radikal süpürücü aktivite kazanılmıştır. Çalışmada uygulanan ekstraksiyon ve hidroliz aşamaları bu doktora tez çalışmasındaki uygulamalarla benzerlik göstermektedir. Chanmangkang vd. (2022), asetik çözeltisi kullanarak elde ettiği AÇK için ABTS analizi ile 14,6 mg/mL değerinde bir IC₅₀ değeri; asetik asit ile birlikte %1 pepsin kullanarak elde ettiği hidrolizat için ABTS analizi ile 17,7 mg/mL değerinde bir IC₅₀ değeri tespit etmiştir. IC₅₀ değerinin büyüdükçe etkinin azaldığı göz önünde bulundurulduğunda, hidrolizat numunelerinde antioksidan kapasitenin azalmış olduğu görülmektedir.

Sazan (*Cyprinus carpio*) balığı HKP numunelerinde DPPH radikal temizleme aktivitesinin numune konsantrasyonuna bağlı olduğu ifade edilmiştir (González-Serrano vd. 2022). Fakat bu tez çalışmasından elde edilen HKP numunelerinde hem DPPH hem ABTS radikal temizleme aktivitelerinin konsantrasyon ile orantılı olmadığı tespit edilmiştir. Daha açık bir ifadeyle; HKP numuneleri antioksidan kapasitelerinin, numune konsantrasyonuna bağlı olmadığı belirlenmiştir.

İstatistiksel sonuçlardan elde edilen bilgilere göre; enzimatik yöntemde DPPH radikal süpürme oranının (% RSA) en yüksek olduğu numune, palamut atıklarından %1,5 alkalaz enzimi kullanılarak yapılan hidroliz sonucunda elde edilen hidrolizat (PA3) olmuştur. Bu palamut hidrolizatı, 5 mg/mL konsantrasyonundaki, DPPH radikali üzerinde %38 oranında RSA açığa çıkarmıştır. Bu oranın, bazı araştırmacıların (Chi vd. 2014); Baehaki vd. 2015; Erol vd. 2017; Wu vd. 2018; Türkaslan ve Çaklı 2018; Chen vd. 2018; Zamorano-Apodaca vd. 2020 ve González-Serrano vd. 2022) benzer koşullardaki çalışmalarında elde edilen değerlerinden daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte bazı araştırmacıların (Koç 2016; Medina-Medrano vd. 2019; Kusumaningtyas vd. 2019 ve Wang vd. 2020) yine benzer koşullardaki çalışmalarından

elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu anlamda; “2. Kaynak Taraması” kısmında antioksidan kapasite ile ilgili verilen literatür verileri incelendiğinde; enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin DPPH radikali üzerinde önemli ölçüde antioksidan aktivitesi oluşturduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel verilere göre en düşük DPPH radikal süpürme oranı (% RSA) ise, palamut atıklarından %1 pepsin enzimi kullanılarak yapılan hidroliz sonucunda elde edilen hidrolizat (PP2) ile ortaya çıkmıştır.

Enzimatik yöntemde ABTS radikal süpürme oranının (%RSA) en yüksek olduğu numune, palamut atıklarından %0,5 alkalaz enzimi kullanılarak yapılan hidroliz sonucunda elde edilen hidrolizat (PA1) olmuştur. Bu palamut hidrolizatı, 5 mg/mL konsantrasyonundaki, ABTS radikali üzerinde %99,404 oranında RSA açığa çıkarmıştır. Bu oran antioksidan kapasite açısından oldukça önemli bir değerdir ve bu tezin “2. Kaynak Taraması” kısmında ABTS radikal süpürme aktivitesi ile ilgili verilen literatür verilerinin (Li vd. 2018; Chen vd. 2018; Medina-Medrano vd. 2019; Kusumaningtyas vd. 2019) üzerindedir. En düşük ABTS radikal süpürme oranı (%RSA) ise, palamut atıklarından %0,5 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (PP1) ile ortaya çıkmış olup söz konusu değer %19,908 olduğu tespit edilmiştir.

Asidik yöntemde DPPH radikal süpürme oranının (%RSA) en yüksek olduğu numune, palamut atıklarından %0,5 alkalaz enzimi kullanılarak yapılan hidroliz sonucunda elde edilen hidrolizat (APA1) olmuştur. Bu palamut hidrolizatı, 5 mg/mL konsantrasyonundaki, DPPH radikali üzerinde %27,200 oranında RSA açığa çıkarmıştır.

Asidik yöntemde çipura atıklarının DPPH radikal süpürme oranının (%RSA) en yüksek olduğu numune ise %1 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat olup çipuradan %17,773 oranında aktivite sağlanmıştır. Bu değer; Türkaslan ve Çaklı (2018)’nin belirlediği değere kıyasla düşük kalmıştır. Türkaslan ve Çaklı (2018), çipura balığının omurga üzerine bağlı olarak bulunan kas doku atıklarında çalışmıştır. Alkalaz ile elde edilen hidrolizatlardan %90,58 oranında DPPH radikal süpürme etkinliği tespit edilmiştir. Bununla birlikte Erol vd. (2017)’nin çalışmasında çipuradan elde edilen DPPH radikal süpürme oranı, çalışmadaki diğer balıklar olan alabalık ve levrek balıklarına göre oldukça düşük oranda kalmıştır. Söz konusu değer %12,85 olup bu tez çalışmasında çipuradan elde edilen değerden düşüktür. Bunlar haricinde; bu tez çalışmasındaki en yüksek DPPH radikal süpürme oranının, bazı literatür verilerinin (Koç 2016; Medina-Medrano vd. 2019; Kusumaningtyas vd. 2019) üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bütüncül bir yaklaşımla literatür verileri değerlendirildiğinde ise; diğer araştırmacıların elde ettikleri değerlere göre çipura atıklarının DPPH radikal süpürme oranının daha düşük kaldığı tespit edilmiştir. Buradaki daha düşük olarak ifade edilen değer; tespit edilen aktivitenin önemsiz olduğu anlamını taşımamakta olup yapılan değerlendirme kıyaslama amacı içermektedir. Çizelge 4.4’e göre asidik yöntemde en düşük DPPH radikal süpürme oranı (%RSA), çipura atıklarından %0,5 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (AÇP1) ile %14,133 şeklinde ortaya çıkmıştır.

Asidik yöntemde ABTS radikal süpürme oranının (%RSA) en yüksek olduğu numune, çipura atıklarından %1 alkalaz enzimi kullanılarak yapılan hidroliz sonucunda elde edilen hidrolizat (AÇA2) olmuştur. Bu çipura hidrolizatı, 5 mg/mL konsantrasyonundaki, ABTS radikali üzerinde %56,466 oranında RSA açığa

çıkarmıştır. Bu oran; detayları “2. *Kaynak Taraması*” kısmında verilen Li vd. (2018) ve Medina-Medrano vd. (2019) gibi araştırmacıların buldukları değerlerden daha yüksek olup Chen vd. (2018) ve Kusumaningtyas vd. (2019) gibi araştırmacıların buldukları değerlere kıyasla daha düşüktür. Değerlerdeki farklılar diğer kıyaslamalarda da söz konusu olduğu gibi; çalışmada kullanılan balık türü, balığın çalışmada yararlanılan kısmı, enzim türü ve hidroliz şartları gibi parametre farklılıklarından ileri gelmektedir. Asidik yöntemdeki en düşük ABTS radikal süpürme oranı (%RSA), palamut atıklarından %1 pepsin enzimi ile elde edilen hidrolizat (APP2) ile %26,515 şeklinde ortaya çıkmıştır.

Hidrolizatlardaki antioksidan aktivite sonuçları, çalışmada kullanılan kaynak materyaller açısından değerlendirildiğinde; palamut ve çipura balıklarından elde edilen antioksidan kapasitelerinin toplam ortalama değerlerinin birbirlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir. İstatistik sonuçlarına göre; ABTS radikali ile gerçekleştirilen antioksidan analizinde palamut ve çipura atıkları arasında fark bulunmadığı ($p>0,05$) tespitinin dışında, palamut ve çipura atıkları HKP numuneleri arasında antioksidan aktivite yönünden anlamlı düzeyde farklar bulunmuştur ($p<0,05$). HKP elde etme yöntemleri ve antioksidan analiz türleri içerisinde, en yüksek radikal süpürme kapasitesi gösteren değerler incelendiğinde; palamut balık atıklarının çipura atıklarına kıyasla daha fazla antioksidatif özellik gösterdiği tespit edilmiştir. AÇK numunelerinin hidrolizatlara dönüştüklerinde ortaya çıkardıkları antioksidan kapasitesindeki artış açısından değerlendirme yapıldığı durumda ise; çipura balığından elde edilen sonuçların palamut balığına kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Hidrolizatlardaki antioksidan aktivite sonuçları, enzimler açısından bir değerlendirmeye tabi tutulduğunda alkalaz enzimi ile elde edilen aktivite değerlerinin pepsin enzimine kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Alkalaz genel anlamda, antioksidan analiz yönteminin DPPH veya ABTS olmasından bağımsız olarak pepsin enzimine göre daha etkili sonuçlar vermiştir. Enzim konsantrasyonu artışlarının, antioksidatif kapasiteler üzerinde önemli düzeyde artırıcı bir etkiye sebep olmadığı; çoğunlukla %0,5 oranındaki bir enzim konsantrasyonunun antioksidatif etkinin ortaya çıkması açısından yeterli geldiği tespit edilmiştir. Numune konsantrasyonu artışının antioksidan kapasite üzerinde önemli bir etkisi olmaması Chen vd. (2018)’nin çalışmasından ABTS ile elde edilen tespitlere uygundur.

4.5. Bazı Karakteristik Özelliklerin Belirlenmesi

Karakteristik özelliklerinin belirlenmesi kapsamında balık kolajen hidrolizatlarının çözünürlük özelliği, emülsiyon oluşturma ve köpük oluşturma özellikleri çalışılmıştır.

4.5.1. Çözünürlük Özelliğinin Belirlenmesi

Çözünürlük, proteinler ve protein hidrolizatlarındaki en önemli özelliklerden birisidir. Çünkü çözünürlük; bir maddenin gıda, ilaç, tıp ve diğer alanlardaki çeşitli uygulamalarının ortaya çıkarılmasında etkide bulunmaktadır (Zamorano-Apodaca vd. 2020).

Çözünürlük, köpürme ve emülsifiye etme gibi diğer fonksiyonel özelliklerde önemli bir rol oynar çünkü peptitlerin arayüzde hızlı göçü ve adsorpsiyonu kritik öneme sahiptir (Chi vd. 2016).

AÇK numuneleri, yapıları gereği asit çözünür özellik göstermektedir. Bu açıdan AÇK numunelerinin asidik pH değerlerinde daha fazla çözünürlük özellik göstermesi beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte HKP numunelerinin alkali bir değer olan pH 10 değerinde ölçülenmesinin daha uygun olacağına çalışmanın başında karar verilmiştir. Çünkü literatür verileri incelendiğinde HKP numunelerinin çözünürlüğünün düşük pH değerlerinde azaldığını fakat yüksek pH değerlerinde daha yüksek çözünürlük gösterdiği tespit edilmiştir. Bu açıdan González-Serrano vd. 2022 ve Koç 2016, örnek olarak gösterilebilecek çalışmalardandır. İlgili çalışmalara ait çeşitli bilgiler bu tez çalışmasının “2. Kaynak Taraması” başlığı altında sunulmuştur. Koç (2016)’un çalışmasında çeşitli kaynaklardan yola çıkılarak, pH 4 düzeyinde çözünürlüğün daha düşük olduğu, pH 6 ve üzerindeki değerlerde çözünürlüğün nispeten arttığı ve çözünürlük değerinin %90’a kadar elde edilebildiği bildirilmiştir. Başka bir husus olarak; Lowry vd. (1951)’in referansı ile gerçekleştirilen protein çözünürlüğü analizi, ortamın alkali özellikte olmasını gerektirmektedir. Çünkü analizin ilkesi, peptit bağları ile indirgenen bakırın alkali ortamda folin reaktifi ile renk oluşturmaya dayanır. Bu tez çalışmasında, HKP numunelerinin çözünürlükleri açısından optimum pH değerlerine uygun olarak alkali koşullarda çözünürlük tayini yapılmıştır.

AÇK ve HKP numuneleri arasında kıyaslama yapılabilmesi için AÇK numuneleri, hem asidik bir pH değerinde (pH:3) hem de alkali bir pH değerinde (pH:10) ölçümlenmiştir. Buradaki asidik pH değeri (pH:3), AÇK numunelerinin değeri değiştirilmeksizin kendi sahip oldukları pH değeridir. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin çözünürlük değerleri Çizelge 4.6’da sunulmuştur.

Çizelge 4.6. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin çözünürlük değerleri (%)

Numune	Çözünürlük Değeri (%)	Numune	Çözünürlük Değeri (%)
Palamut AÇK- pH 3	75,060 ±0,352	Çipura AÇK- pH 3	84,857 ±0,454
Palamut AÇK- pH 10	1,795 ±0,087	Çipura AÇK- pH 10	6,977 ±0,163

AÇK: Asit Çözünür Kolajen; Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.6’ya göre beklendiği üzere AÇK numunelerinin, düşük pH değerinde (pH:3), alkali pH değerine (pH:10) kıyasla daha yüksek çözünürlük özelliği gösterdiği ve pH değeri artınca AÇK çözünürlüklerinde düşüş ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Bu durum, Kittiphattanabawon vd. (2005)’in deri ve kılçık kolajenlerinin en yüksek çözünürlük değerlerinin, asidik pH değerlerinden elde edildiği savını desteklemektedir.

Oda sıcaklığında (25°C) pH değeri 10.00±0,5’e ayarlanan 10 000 ppm konsantrasyonundaki HKP numunelerinde gerçekleştirilen çözünürlük değerleri Çizelge 4.7’de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Palamut ve çipura HKP numunelerinin çözünürlük değerleri (%)

Enzimatik Yöntem		Asidik Yöntem	
Hidrolizat Numunesi	Çözünürlük Değeri (%)	Hidrolizat Numunesi	Çözünürlük Değeri (%)
PA1 (%0,5 enzim)	74,904±0,416 j	APA1 (%0,5 enzim)	92,586±0,796 c
PA2 (%1,0 enzim)	86,114±0,598 g	APA2 (%1,0 enzim)	97,570±0,716 ab
PA3 (%1,5 enzim)	79,098±0,589 i	APA3 (%1,5 enzim)	98,351±0,778 a
ÇA1 (%0,5 enzim)	73,362±0,526 k	AÇA1 (%0,5 enzim)	96,872±0,737 b
ÇA2 (%1,0 enzim)	72,751±0,512 k	AÇA2 (%1,0 enzim)	97,345±0,793 ab
ÇA3 (%1,5 enzim)	70,081±0,555 l	AÇA3 (%1,5 enzim)	98,129±0,718 a
PP1 (%0,5 enzim)	23,547±0,170 p	APP1 (%0,5 enzim)	84,619±0,665 h
PP2 (%1,0 enzim)	24,668±0,113 o	APP2 (%1,0 enzim)	87,593±0,636 e
PP3 (%1,5 enzim)	20,100±0,139 r	APP3 (%1,5 enzim)	84,111±0,620 h
ÇP1 (%0,5 enzim)	35,274±0,288 m	AÇP1 (%0,5 enzim)	86,565±0,667 fg
ÇP2 (%1,0 enzim)	32,716±0,202 n	AÇP2 (%1,0 enzim)	87,376±0,615 ef
ÇP3 (%1,5 enzim)	34,497±0,216 m	AÇP3 (%1,5 enzim)	90,558±0,704 d

Tablodaki farklı harfler, ortalama değerler arasında fark olduğunu göstermektedir. (PA: Enzimatik yöntemde palamut atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, ÇA: Enzimatik yöntemde çipura atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, PP: Enzimatik yöntemde palamut atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, ÇP: Enzimatik yöntemde çipura atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, APA: Asidik yöntemde palamut atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, AÇA: Asidik yöntemde çipura atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, APP: Asidik yöntemde palamut atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, AÇP: Asidik yöntemde çipura atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz); Analiz sonuçları, tekrerrü ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çözünürlük analizinden elde edilen değerler ile yapılan istatistiki değerlendirme neticesinde; Shapiro-Wilk homojenlik testine göre $p>0,05$ bulunduğundan verilerin homojen dağıldığı tespit edilmiştir. “Bağımsız örneklerde t-testi” doğrultusunda enzimatik yöntem ile alkalaz enziminden elde edilen çözünürlük değerleri (Çizelge 4.7) açısından palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Aynı şekilde “bağımsız örneklerde t-testi” doğrultusunda enzimatik yöntem ile pepsin enziminden elde edilen çözünürlük değerleri (Çizelge 4.7) açısından da palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

“Bağımsız örneklerde t-testi” doğrultusunda; asidik yöntem ile alkalaz enziminden elde edilen çözünürlük değerleri (Çizelge 4.7) açısından palamut ve çipura balıkları arasındaki farkın önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). “Bağımsız örneklerde t-testi” doğrultusunda; asidik yöntem ile pepsin enziminden elde edilen çözünürlük değerleri (Çizelge 4.7) açısından ise palamut ve çipura balıkları arasında önemli oranda fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Herhangi bir balık atığının farklı enzim konsantrasyonlarının bir grup olarak ele alınması neticesinde, gruplar tek yönlü ANOVA analizi (Duncan testi) ile çözünürlük değerleri açısından kendi içerisinde kıyaslanmıştır. HKP numunelerinin çözünürlük değerleri arasında, elde edilen en yüksek değerlerin %98,351 ve %98,129 olduğu tespit edilmiştir. Bu değerler, palamut atıklarında asidik yöntemdeki %1,5 enzim konsantrasyonu (APA3) ve çipura atıklarında asidik yöntemdeki %1,5 enzim

konsantrasyonu (AÇA3) ile elde edilmiş olup bu değerler, istatistiksel anlamda birbirlerinden farklı değildirler (Çizelge 4.7).

Asidik yöntemde palamut atıklarından %0,5 pepsin enzimi aracılığıyla elde edilen numunenin (APP1) çözünürlük değeri ile %1,5 pepsin enzimi aracılığıyla elde edilen numunenin (APP3) çözünürlük değeri arasında istatistiksel anlamda bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Enzimatik yöntemde ise çipura atıklarından %0,5 alkalaz aracılığıyla elde edilen numune (ÇA1) ile %1 alkalaz aracılığıyla elde edilen numune (ÇA2) arasında istatistiksel anlamda fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Yine enzimatik yöntemde çipura atıklarından %0,5 pepsin aracılığıyla elde edilen numune (ÇP1) ile %1,5 pepsin aracılığıyla elde edilen numune (ÇP3) arasında istatistiksel anlamda fark bulunmadığı tespit edilmiştir.

Asidik yöntemdeki hem palamut atıklarında hem de çipura atıklarında %1 enzim ile elde edilen HKP numunelerinin (APA2 ve AÇA2); çözünürlük değerleri açısından, en yüksek çözünürlük gösteren numunelere (APA3 ve AÇA3) yakınsadığı Çizelge 4.7'den anlaşılmaktadır. Bu bağlamda APA2 numunesini grup içerisinde (APA1, APA2 ve APA3 içerisinde) en yüksek çözünürlük özelliği sağlayan numune olarak kabul ettiğimizde; palamut atıklarında hem alkalaz hem pepsin için %1 enzim konsantrasyonu değerinin, optimum değer olarak ortaya çıktığı görülmektedir. Ayrıca asidik yöntemde çipura atıklarında %0,5 enzim ile elde edilen numunenin (AÇP1) de çözünürlük açısından %1 enzim ile elde edilen numuneye (AÇP2) yakınsadığı görülmektedir.

Enzimatik yöntemde palamut atıklarından pepsin enzimi ile elde edilen HKP numunelerinin (PP1, PP2, PP3) çözünürlük değerleri açısından optimum enzim konsantrasyonu %1 olarak tespit edilmiştir. Enzim konsantrasyonu %0,5 değerinden %1 değerine yükseldiğinde çözünürlük değerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlenmiştir ($p<0,05$). Bununla birlikte; enzim konsantrasyonunda %1 oranı üzerine çıkıldığında çözünürlük değerinin anlamlı bir şekilde düştüğü gözlenmiştir ($p<0,05$).

Enzimatik yöntemde çipura atıklarından pepsin enzimi ile elde edilen ÇP1 ve ÇP3 numunelerinin %0,5 enzim konsantrasyonu ile %1,5 enzim konsantrasyonu arasında önemli seviyede bir fark olmadığı ifade edilmişti. Aynı düzeyde çözünürlük elde edildiği bilinen iki uygulama arasında daha az enzimin kullanıldığı uygulamayı tercih etmek daha mantıklı bir yaklaşım olacaktır. Bu bağlamda; enzimatik yöntemde söz konusu numuneler için %0,5 pepsin konsantrasyonu, mevcut şartlarda optimum sonucu sağlamakta iken; asidik yöntemde ise %1,5 pepsin konsantrasyonu optimum konsantrasyon değerini sağlamaktadır.

AÇK numunelerinin hidrolize edildiklerinde çözünürlük değerlerinde çok büyük oranlarda artış gerçekleştiği tespit edilmiştir. HKP numunelerinin çözünürlük değerleri aynı pH değerleri esas alınarak karşılaştırıldığında; pH 10 değerindeki palamut AÇK numunesinde %1,795 olan çözünürlük değeri, aynı koşuldaki HKP numunelerinde %98,351 değerine kadar yükselmiştir. pH 10 değerindeki çipura AÇK numunesinde %6,977 olan çözünürlük değeri aynı koşuldaki HKP numunelerinde %98,129 değerine kadar yükselmiştir.

Çizelge 4.7'ye göre palamut atıklarının alkalaz ile hidrolize edilmesi sonrasında; uygulanan yöntemle göre (enzimatik yöntem veya asidik yöntem) HKP'lerin %74,904 ile %98,351 arasında çözünürlük sağladığı tespit edilmiştir. Palamut AÇK numunelerinin asidik pH değerindeki (pH:3) çözünürlük değerine kıyasla alkalaz ile elde edilmiş hidrolizatların çözünürlüğünde %31 oranına kadar artış gerçekleşmiştir. HKP numunelerinin pH değeri olan pH:10'daki AÇK numunesinin çözünürlük değerine kıyasla aynı hidrolizatların çözünürlüğünde 54,8 katına kadar artış yaşanmıştır.

Çizelge 4.7'ye göre çipura atıklarının alkalaz ile hidrolize edilmesi sonrasında ise; uygulanan yöntemle göre (enzimatik yöntem veya asidik yöntem) HKP'lerin %70,081 ile %98,129 arasında çözünürlük sağladığı tespit edilmiştir. Çipura AÇK numunelerinin asidik pH değerindeki (pH:3) çözünürlük değerine kıyasla alkalaz ile elde edilmiş hidrolizatların çözünürlüğünde %30,7 oranına kadar artış gerçekleşmiştir. HKP numunelerinin pH değeri olan pH:10'daki AÇK numunesinin çözünürlük değerine kıyasla aynı hidrolizatların çözünürlüğünde yaklaşık 54,7 katına kadar artış yaşanmıştır.

Çizelge 4.7'ye göre pepsin enzimi ile elde edilen çözünürlük değerleri incelendiği zaman; palamut atıklarında uygulanan yöntemle göre %20,100 ile %87,593 arasında çözünürlük elde edildiği; çipura atıklarında ise %32,7 ile %90,6 arasında çözünürlük elde edildiği tespit edilmiştir. Palamut AÇK numunelerinin asidik pH değerindeki (pH:3) çözünürlük değerine kıyasla pepsin ile elde edilmiş hidrolizatların çözünürlüğünde %16,7 oranına kadar artış gerçekleşmiştir. HKP numunelerinin pH değeri olan pH 10'daki AÇK numunesinin çözünürlük değerine kıyasla aynı hidrolizatların çözünürlüğünde; 48,8 katına kadar artış yaşanmıştır. Çipura AÇK numunelerinin asidik pH değerindeki (pH:3) çözünürlük değerine kıyasla pepsin ile elde edilmiş hidrolizatların çözünürlüğünde %20,6 oranına kadar artış gerçekleşmiştir. HKP numunelerinin pH değeri olan pH 10'daki AÇK numunesinin çözünürlük değerine kıyasla aynı hidrolizatların çözünürlüğünde 50,5 katına kadar artış yaşanmıştır.

Proteinlerin hidrolizinden elde edilen küçük molekül ağırlıklı peptitlerin, suyla daha kolay hidrojen bağları oluşturan daha fazla polar gruplara sahip olduğu ve bu durumun protein çözünürlüğünü artırdığı ifade edilmektedir (Nguyen vd. 2021). HKP'lerin daha fazla çözünürlüğe sahip olmaları konusunda González-Serrano vd. (2022), ortaya çıkan amino asitlerin elektrostatik etkileşimleri ve bu amino asitlerin suyla hidrojen bağları oluşturma yeteneklerine işaret etmiştir. Chi vd. (2014) ise tüm bu nedenlerin yanı sıra, aynı zamanda küçük moleküler ağırlıklı yapılarda çözücü maddenin, çözünecek madde moleküllerini kuşatmasının kolaylaşması ve bu sayede daha fazla sayıda hidrojen bağı oluşturulabilmesinin çözünürlüğün artışında etkili olduğunu ifade etmiştir.

Çizelge 4.7'ye göre palamut ve çipura HKP numunelerinden genellikle çok yüksek oranda çözünürlük değerleri elde edilmiştir. Burada özellikle dikkati çeken kısım; pepsin enzimi ile enzimatik yöntemde açığa çıkan çözünürlük değerleridir. Enzimatik yöntemde alkalaz enzimi ile palamut HKP numunelerinde %86,114 oranına kadar ve aynı şartlarda çipura HKP numunelerinde %73,362 oranına kadar çözünürlük elde edilirken; bu durum pepsin enzimi ile en fazla %35,274 oranında ortaya çıkmıştır.

Asidik yöntemde HKP çözünürlüğü en az %84,111 oranında (Çizelge 4.7) elde edilmiş olup bu oran %98,351'e kadar artış göstermiştir. Bu değerlendirmelerle birlikte

asidik yöntemin HKP çözünürlükleri hususunda enzimatik yöntemle göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Chi vd. (2014)'nin pH 10 değerindeki çözünürlük değeri, bu tez çalışmasının asidik yönteminden elde edilen sonuçlarla ve enzimatik yöntemin alkalaz ile elde edilen sonuçları ile tutarlılık göstermiştir.

Enzimatik yöntemde hem alkalaz enzimi ile hem de pepsin enzimi ile elde edilmiş olan çözünürlük değerlerinin, asidik yöntemdekilere kıyasla daha düşük oranda kaldığı tespit edilmiştir. Bu durumun özellikle pepsin enzimi ile gerçekleştirilen enzimatik yöntemde daha çok öne çıktığı görülmüştür. Pepsin enziminin asidik yöntemde kullanılması ile elde edilen çözünürlük değeri ortalama olarak %87 iken; pepsin enziminin enzimatik yöntemde kullanılması ile elde edilen ortalama çözünürlük değeri %28 olmuştur.

Bu tez çalışmasının her iki yönteminden palamut ve çipura ile elde edilen çözünürlük değerleri, Chi vd. (2016)'nin *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* ve *Raja porosa* balıklarının kıkırdaklarından tripsin enzimi elde ettikleri çözünürlük değerlerinden büyüktür. Çünkü Chi vd. (2016)'da hidrolizatların çözünürlüklerinin pH 2,5 değerinde %35 ile %55 aralığında değişiklik gösterdiği; pH 7,8 değerinde %60 ile %75 aralığında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Chi vd. 2016).

Bu tez çalışmasındaki çözünürlük değerlerinin bir kısmı Zamorano-Apodaca vd. (2020)'nin çözünürlük değerleri ile tutarlı sonuç vermiş iken; değerlerinin birçoğunun ise Zamorano-Apodaca vd. (2020)'nin çözünürlük değerlerinin altında ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Söz konusu çalışmada çeşitli balık türlerinin deri, kafa ve kılçık kısımlarının karışımından alkalaz enzimi ile elde edilen HKP numunelerinin pH 7 ve pH 10 değerlerindeki çözünürlüklerinin %95'in üzerinde olduğu bildirilmiştir.

Enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinde; enzim miktarının artışına oranla protein çözünürlüğünde dikkate değer bir artış gözlenmemiştir. Fakat asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinde ise genel olarak enzim konsantrasyonu artışına bağlı olarak protein çözünürlüğünde de artış dikkat çekmiştir.

Asidik yöntemde alkalaz enzimi kullanılarak elde edilen çözünürlük değerlerinin gerek palamut gerek ise çipurada oldukça yüksek oranda ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Söz konusu oranlar birbirlerine oldukça yakın olup bu değerler palamut için ortalama %96,169 ve çipura için ortalama %97,448 olarak bulunmuştur. Asidik yöntemde pepsin enzimi kullanılarak elde edilen çözünürlük değerleri palamutta ortalama %85,441 ve çipurada ortalama %88,166 olarak bulunmuştur.

Koç (2016)'un çalışmasında; Diniz ve Martin (1997)'ne göre pH 3 ila pH 9 arasında hidrolizatların %90 ila %100 arasında çözünürlük gösterdikleri ifade edilmiştir. pH 10 değerindeki HKP çözünürlüklerinin pH 2 ve pH 4 değerlerine göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (Zamorano-Apodaca vd. 2020). pH 10 değerindeki HKP çözünürlük değerlerinin pH 4 değerine göre daha yüksek olduğu ifade edilmiştir (González-Serrano vd. 2022). Bu açıdan ve peptit bağları ile indirgenen bakırın, alkali ortamda folin reaktifi ile renk oluşturmamasından dolayı bu çalışmadaki çözünürlük değerleri, numunelerin pH 10 değerine sabitlenmesi sonrasında tespit edilmiştir. pH 10 değerinde HKP numunelerinden elde edilen çözünürlük değerlerinin %20,100 ile %98,351 arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çözünürlük değeri, emülsiyon oluşturma ve köpük oluşturma gibi diğer fonksiyonel özellikleri de etkilemektedir (Koç, 2016).

4.5.2. Emülsiyon Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

AÇK ve HKP numunelerinin emülsiyon oluşturma özelliklerinin belirlenmesi için EAİ ve ESİ değerleri belirlenmiştir. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin EAİ ile ESİ değerleri Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9’da sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin emülsiyon aktivite indeksi değerleri (EAİ) (%)

Numune	EAİ (m ² /g)		Numune	EAİ (m ² /g)
Palamut AÇK (%0,25 numune)	4,069 ±0,064 c		Çipura AÇK (%0,25 numune)	3,917 ±0,035 b
Palamut AÇK (%0,50 numune)	4,501 ±0,057 b		Çipura AÇK (%0,50 numune)	4,623 ±0,056 a
Palamut AÇK (%1,00 numune)	5,070 ±0,069 a		Çipura AÇK (%1,00 numune)	4,729 ±0,064 a

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (EAİ: Emülsiyon Aktivite İndeksi, AÇK: Asitte Çözünür Kolajen); Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.8’de palamut ve çipura atıklarından elde edilen AÇK numunelerinin farklı numune konsantrasyonlarındaki EAİ değerlerinin ortalamaları yer almaktadır. Bu ortalamalar arasında varyans analizine göre istatistiki olarak önemli düzeyde fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Duncan testinde palamut AÇK numunelerinin %0,25, %0,50 ve %1,00 konsantrasyonlarındaki EAİ değerlerinin her birinin birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Duncan testinde çipura AÇK numunelerinin %0,50 ve %1,00 konsantrasyonlarındaki EAİ değerlerinin aralarında istatistiki açıdan önemli bir fark olmadığı; fakat bu iki değer %0,25 numune kullanılarak elde edilen EAİ değerinden istatistiki açıdan önemli düzeyde daha büyük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.9. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin emülsiyon stabilite indeksi değerleri (ESİ) (%)

Numune	ESİ (dakika)		Numune	ESİ (dakika)
Palamut AÇK (%0,25 numune)	24,246 ±0,306 c		Çipura AÇK (%0,25 numune)	14,235 ±0,289 c
Palamut AÇK (%0,50 numune)	39,870 ±0,464 b		Çipura AÇK (%0,50 numune)	14,798 ±0,257 b
Palamut AÇK (%1,00 numune)	43,936 ±0,516 a		Çipura AÇK (%1,00 numune)	17,232 ±0,240 a

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (ESİ: Emülsiyon Stabilite İndeksi, AÇK: Asitte Çözünür Kolajen), Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.9’da palamut ve çipura atıklarından elde edilen AÇK numunelerinin ESİ değerlerinin ortalamaları yer almaktadır. Bu ortalamalar arasında varyans analizine göre istatistiki olarak önemli düzeyde fark olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Duncan testinde palamut AÇK numunelerinin %0,25, %0,50 ve %1,00 konsantrasyonlarındaki ESİ değerlerinin her birinin önemli oranda birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Duncan testinde çipura AÇK numunelerinin yine aynı şekilde %0,25, %0,50 ve %1,00 konsantrasyonlarındaki ESİ değerlerinin her birinin istatistiki açıdan önemli oranda birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9’a göre; AÇK numunelerinin EAİ ve ESİ değerleri, numune konsantrasyonunun artışına bağlı olarak artış göstermiştir.

Çizelge 4.8’e göre palamut AÇK numunelerinden 4,069 m²/g ile 5,070 m²/g arasında; çipura AÇK numunelerinden 3,917 m²/g ile 4,729 m²/g arasında EAİ değerleri elde edilmiştir. Tilapia balığı (*Oreochromis niloticus*) kılçıklarından elde edilen AÇK numunesinin %1 konsantrasyon değerinde, sıfıra yakın bir emülsiyon aktivitesi açığa çıkardığı bildirilmiştir (Dey vd. 2021). Bu açıdan bu tez çalışmasındaki AÇK numunelerinden önemli oranda emülsiyon aktivitesi elde edilmiştir.

Çizelge 4.9’e göre palamut AÇK numunelerinden 24,246 dakika ile 43,936 dakika arasında; çipura AÇK numunelerinden 14,235 dakika ile 17,232 dakika arasında ESİ değerleri elde edilmiştir. Bununla birlikte; AÇK numunelerinde ESİ değerlerinin belirlenmesine ait bilgimiz dahilinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun yerine çalışmaların daha çok HKP numuneleri üzerine odaklandığı tespit edilmiştir.

Enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin “Emülsiyon Aktivite İndeksi” ve “Emülsiyon Stabilite İndeksi” değerleri Çizelge 4.10’da sunulmuştur. Asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin “Emülsiyon Aktivite İndeksi” ve “Emülsiyon Stabilite İndeksi” değerleri ise Çizelge 4.11’de sunulmuştur.

Çizelge 4.10. Enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin “Emülsiyon Aktivite İndeksi” ve “Emülsiyon Stabilité İndeksi” değerleri

		Emülsiyon Aktivite İndeksi (EAI, m ² /g)	Emülsiyon Stabilité İndeksi (ESI, dakika)
PA1 (%0,50 enzim)	%0,25 numune	3,571 ±0,096 i	28,169 ±0,377 f
	%0,50 numune	3,292 ±0,080 j	28,571 ±0,314 f
	%1,00 numune	0,957 ±0,007 v	20,930 ±0,216 m
PA2 (%1,00 enzim)	%0,25 numune	3,014 ±0,023 l	26,218 ±0,312 g
	%0,50 numune	1,629 ±0,010 t	28,153 ±0,373 f
	%1,00 numune	0,866 ±0,006 w	22,268 ±0,208 k
PA3 (%1,50 enzim)	%0,25 numune	2,520 ±0,028 no	48,571 ±0,446 b
	%0,50 numune	1,670 ±0,029 st	29,565 ±0,364 e
	%1,00 numune	0,497 ±0,008 y	29,375 ±0,372 e
ÇA1 (%0,50 enzim)	%0,25 numune	3,088 ±0,034 l	20,340 ±0,217 no
	%0,50 numune	2,012 ±0,023 q	24,267 ±0,286 i
	%1,00 numune	0,892 ±0,008 w	15,125 ±0,120 u
ÇA2 (%1,00 enzim)	%0,25 numune	2,697 ±0,035 m	19,468 ±0,160 p
	%0,5 numune	1,147 ±0,016 u	21,521 ±0,265 l
	%1,00 numune	0,501 ±0,009 y	17,895 ±0,198 q
ÇA3 (%1,50 enzim)	%0,25 numune	2,479 ±0,036 op	20,634 ±0,203 mn
	%0,5 numune	1,028 ±0,038 v	23,445 ±0,242 j
	%1,00 numune	0,621 ±0,005 x	19,040 ±0,186 p
PP1 (%0,50 enzim)	%0,25 numune	8,697 ±0,054 a	35,714 ±0,395 d
	%0,50 numune	2,417 ±0,045 p	43,444 ±0,449 c
	%1,00 numune	0,875 ±0,006 w	55,882 ±0,497 a
PP2 (%1,00 enzim)	%0,25 numune	6,603 ±0,069 e	14,299 ±0,109 v
	%0,50 numune	1,927 ±0,025 r	17,091 ±0,176 r
	%1,00 numune	1,002 ±0,021 v	21,544 ±0,274 l
PP3 (%1,50 enzim)	%0,25 numune	4,525 ±0,056 g	14,044 ±0,119 v
	%0,50 numune	1,728 ±0,034 s	15,755 ±0,176 t
	%1,00 numune	0,461 ±0,009 y	15,906 ±0,101 t
ÇP1 (%0,50 enzim)	%0,25 numune	6,942 ±0,099 c	24,341 ±0,218 i
	%0,50 numune	4,503 ±0,063 g	15,607 ±0,175 t
	%1,00 numune	3,198 ±0,039 k	16,523 ±0,128 s
ÇP2 (%1,00 enzim)	%0,25 numune	6,864 ±0,090 d	13,059 ±0,108 w
	%0,50 numune	5,328 ±0,078 f	20,028 ±0,234 o
	%1,00 numune	3,510 ±0,034 i	23,203 ±0,255 j
ÇP3 (%1,50 enzim)	%0,25 numune	7,893 ±0,095 b	16,227 ±0,100 st
	%0,50 numune	3,777 ±0,041 h	25,122 ±0,285 h
	%1,00 numune	2,596 ±0,028 n	17,121 ±0,159 r

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (PA: Enzimatik yöntemde palamut atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, ÇA: Enzimatik yöntemde çipura atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, PP: Enzimatik yöntemde palamut atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, ÇP: Enzimatik yöntemde çipura atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz); Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.11. Asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin “Emülsiyon Aktivite İndeksi” ve “Emülsiyon Stabilité İndeksi” değerleri

		Emülsiyon Aktivite İndeksi (EAI, m ² /g)	Emülsiyon Stabilité İndeksi (ESI, dakika)
APA1 (%0,50 enzim)	%0,25 numune	3,294 ±0,037 o	26,607 ±0,239 f
	%0,50 numune	1,822 ±0,022 s	21,809 ±0,237 j
	%1,00 numune	0,936 ±0,011 v	40,000 ±0,374 a
APA2 (%1,00 enzim)	%0,25 numune	2,786 ±0,026 p	27,391 ±0,253 e
	%0,50 numune	1,231 ±0,035 u	35,914 ±0,306 b
	%1,00 numune	0,811 ±0,007 w	28,025 ±0,274 d
APA3 (%1,50 enzim)	%0,25 numune	4,024 ±0,038 n	19,783 ±0,140 l
	%0,50 numune	2,045 ±0,030 r	17,903 ±0,173 p
	%1,00 numune	1,286 ±0,029 u	22,810 ±0,296 hi
AÇA1 (%0,50 enzim)	%0,25 numune	6,264 ±0,102 k	18,021 ±0,102 op
	%0,50 numune	2,211 ±0,049 r	18,518 ±0,165 mn
	%1,00 numune	1,576 ±0,025 t	19,614 ±0,163 l
AÇA2 (%1,00 enzim)	%0,25 numune	6,515 ±0,043 j	18,264 ±0,129 nop
	%0,5 numune	1,772 ±0,027 s	20,913 ±0,190 k
	%1,00 numune	1,032 ±0,023 v	22,581 ±0,201 i
AÇA3 (%1,50 enzim)	%0,25 numune	6,043 ±0,110 l	23,164 ±0,216 h
	%0,5 numune	2,517 ±0,031 q	19,459 ±0,173 l
	%1,00 numune	1,006 ±0,020 v	29,198 ±0,208 c
APP1 (%0,50 enzim)	%0,25 numune	25,498 ±0,308 a	23,062 ±0,272 h
	%0,50 numune	12,333 ±0,129 e	22,521 ±0,285 i
	%1,00 numune	2,435 ±0,026 q	22,824 ±0,203 hi
APP2 (%1,00 enzim)	%0,25 numune	24,364 ±0,383 b	21,952 ±0,252 j
	%0,50 numune	10,391 ±0,105 f	18,774 ±0,178 m
	%1,00 numune	3,305 ±0,026 o	21,819 ±0,198 j
APP3 (%1,50 enzim)	%0,25 numune	17,539 ±0,167 c	15,973 ±0,113 s
	%0,50 numune	8,449 ±0,084 i	16,148 ±0,176 s
	%1,00 numune	2,417 ±0,033 q	16,756 ±0,107 r
AÇP1 (%0,50 enzim)	%0,25 numune	17,510 ±0,172 c	15,515 ±0,181 t
	%0,50 numune	8,810 ±0,089 h	27,511 ±0,263 e
	%1,00 numune	3,357 ±0,035 o	17,390 ±0,165 q
AÇP2 (%1,00 enzim)	%0,25 numune	15,321 ±0,116 d	25,412 ±0,274 g
	%0,50 numune	6,599 ±0,078 j	15,152 ±0,115 u
	%1,00 numune	2,909 ±0,033 p	15,899 ±0,123 s
AÇP3 (%1,50 enzim)	%0,25 numune	9,308 ±0,081 g	18,304 ±0,199 no
	%0,50 numune	4,451 ±0,039 m	21,038 ±0,287 k
	%1,00 numune	1,258 ±0,025 u	17,996 ±0,113 op

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (APA: Asidik yöntemde palamut atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, AÇA: Asidik yöntemde çipura atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, APP: Asidik yöntemde palamut atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, AÇP: Asidik yöntemde çipura atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz); Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

HKP numunelerinin emülsiyon oluşturma özellikleri ile ilgili olarak; herhangi bir balık atığının farklı enzim konsantrasyonları bir grup olarak ele alınmış ve söz konusu gruplar tek yönlü ANOVA analizine (Duncan testi) tabi tutulmuştur. “Emülsiyon Aktivite İndeksi” değerleri kendi içerisinde ve “Emülsiyon Stabilité İndeksi” değerleri kendi içerisinde değerlendirilmek üzere istatistiksel anlamda birbirlerinden farklı çıkan değerler, Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11’de aynı sütunda farklı harflerle gösterilerek sunulmuştur.

Çizelge 4.10’a göre enzimatik yöntemde HKP numunelerinden 8,697 m²/g (PP1) düzeyine kadar ve Çizelge 4.11’e göre asidik yöntemde HKP numunelerinden 25,498 m²/g (APP1) düzeyine kadar EAİ değerleri elde edilmiştir. Asidik yöntem ile elde edilen HKP numunelerinin EAİ değerlerinin (Çizelge 4.11) yaklaşık %39’unun, palamut ve çipura AÇK numunelerinin en yüksek EAİ değerlerinin (5,070 m²/g ve 4,729 m²/g) üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Enzimatik yöntem ile elde edilen HKP numunelerinin EAİ değerlerinin (Çizelge 4.10) ise yaklaşık %17’sinin palamut ve çipura AÇK numunelerinin en yüksek EAİ değerlerinin üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

Literatür verileri değerlendirildiğinde; farklı çalışmalardaki HKP numunelerinin EAİ değerlerinin 5,10 m²/g ile 130 m²/g aralığında ortaya çıkmış olduğu görülmüştür. Literatür EAİ değerlerinin ortalama olarak 30-40 m²/g düzeylerinde olduğu da göz önünde bulundurulduğunda Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11’den elde edilen EAİ değerlerinin (25,498 m²/g düzeyine kadar) literatür verilerine kıyasla düşük kaldığı tespit edilmiştir. EAİ değerinin optimum değeri açısından; palamut atıklarından asidik yöntemde %0,5 pepsin enzimi ile HKP numunelerinin elde edilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

Literatürde ESİ değerleri incelendiğinde, değerlerin 11 dakika civarlarından 90 dakikalara kadar değiştiği tespit edilmiştir. Literatür ESİ değerlerinin ortalama olarak 20-35 dakika düzeylerinde olduğu da göz önünde bulundurulduğunda; Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11’den elde edilen ESİ değerlerinin literatür verilerine kıyasla dikkate değer ölçüde yüksek olduğu söylenebilmektedir. Bu durum özellikle de enzimatik yöntem için geçerlilik kazanmakta olup enzimatik yöntemde ESİ değerleri 55,8 dakikaya kadar çıkmaktadır. Bu tez çalışmasındaki en düşük ESİ değeri 13 dakika olup söz konusu en yüksek ve en düşük iki değer enzimatik yöntemden elde edilmiştir. Asidik yöntemdeki en düşük ESİ değeri ise 15 dakika, en yüksek ESİ değeri 40 dakikadır. ESİ değerinin optimum değeri açısından; palamut atıklarından enzimatik yöntemde %0,5 pepsin enzimi ile HKP numunelerinin elde edilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

Hidrolize kolajenin yüzey aktif bileşik özelliği gösterdiği; içerdiği hidrofilik ve hidrofobik grupları nedeniyle su içinde yağ emülsiyonunu desteklediği bildirilmektedir (Pires ve Batista 2013). Fakat yukarıda bahsedilen sonuçlardan yola çıkarak; HKP numunelerinin emülsiyon oluşturma kabiliyetlerinin düşük olup fakat oluşan emülsiyonu koruma kabiliyetlerinin ise yeterli düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Yüksek çözünürlüğe sahip hidrolizatların arayüzeyde hızla yayılıp adsorbe olabildiği, bu yüzden çözünürlük ile emülsifiye edici etkiler arasında bir ilişki olduğu ifade edilmiştir (Klompong vd. 2007). Bu tez çalışmasında; genel anlamda asidik yöntemden elde edilen HKP numunelerinde ortaya çıkan EAİ değerlerinin, aynı

numunelerin enzimatik yöntemden elde edilmiş olanların EAİ değerlerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. “4.5.1. Çözünürlük Özelliğinin Belirlenmesi” başlığı altında asidik yöntemde HKP numunelerinin daha fazla çözünürlük özelliği gösterdiği ifade edilmişti. Bu tez çalışmasında asidik yöntem ile daha yüksek EAİ değerlerinin elde edilmiş olması Klompong vd. (2007)’nin bildirdiği çözünürlük ile emülsifiye edici etkiler arasında ilişki olduğu savını desteklemektedir.

Hem enzimatik yöntemden elde edilen HKP numuneleri için hem de asidik yöntemden elde edilen HKP numuneleri için numune konsantrasyonları arttıkça EAİ değerlerinin giderek azaldığı tespit edilmiştir. Nalinanon vd. (2011) ve Khaled vd. (2014)’in çalışmalarında da benzer durumlar yaşanmıştır. Söz konusu çalışmalarda hidrolizatların EAİ ve ESİ değerleri, artan konsantrasyonlarla birlikte azalış göstermiştir. Bununla ilgili olarak Nalinanon vd. (2011) tarafından; aşırı hidrolizin HKP numunelerinin emülsiyon oluşturma özelliklerinde kayıplara neden olduğu bildirilmiştir. Bu durumun; hidroliz miktarı arttıkça moleküler ağırlığın giderek düşmesi ve çözünürlük ile emülsiyon oluşturma özelliği arasındaki doğrusallığın belli bir noktadan sonra bozulması ile alakalı olduğu düşünülmektedir. Böyle bir durumda; suda çözünürlük olgusunun daha baskın hale gelerek emülsiyon dengesini su fazı yönüne kaydıracağı ve suda çözünürlüğün yağda çözünürlük üzerinde baskınlık oluşturacağı tahmin edilmektedir. Tüm bu durumların sonucunda ise emülsiyon aktivitesinin azalacağı düşünülmektedir.

4.5.3. Köpük Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

AÇK ve HKP numunelerinin köpük oluşturma özelliklerinin değerlendirilmesinde KG ve KS değerleri belirlenmiştir. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin KG ile KS değerleri, Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13’te sunulmuştur.

Çizelge 4.12. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin KG değerleri (%)

Numune	KG (%)	Numune	KG (%)
Palamut AÇK (%0,25 numune)	9,118 ±0,176 c	Çipura AÇK (%0,25 numune)	17,348 ±0,215 b
Palamut AÇK (%0,50 numune)	17,516 ±0,213 b	Çipura AÇK (%0,50 numune)	17,620 ±0,226 ab
Palamut AÇK (%1,00 numune)	19,389 ±0,257 a	Çipura AÇK (%1,00 numune)	18,029 ±0,287 a

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (KG: Köpük Genişlemesi, AÇK: Asitte Çözünür Kolajen); Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.12’de palamut ve çipura atıklarından elde edilen AÇK numunelerinin farklı numune konsantrasyonlarındaki KG değerlerinin ortalamaları yer almaktadır. Bu ortalamalar arasında varyans analizine göre istatistiki olarak önemli düzeyde farklar olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Duncan testinde palamut AÇK numunelerinin %0,25, %0,50 ve %1,00 konsantrasyonlarındaki KG değerlerinin her birinin, birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Çipura AÇK numunelerinin ise %0,25 ve %1,00 konsantrasyonlarının birbirinden farklı olduğu; fakat %0,50 konsantrasyonundaki KG

değerinin, %0,25 ve %1,00 konsantrasyonundaki değerlerinin her ikisine de yakınsadığı tespit edilmiştir.

Palamut ve çipura AÇK numunelerinin KG değerleri, Ibrahim vd. (2023)'ün tespit etmiş olduğu %42,5 değerinden daha düşük olmasına rağmen Bhuimbar vd. (2019)'un değerleri ile uyumludur. Palamut AÇK numunelerinin %0,25 ile %0,50 numune konsantrasyonları arasında; KG değerlerinin numune konsantrasyonu ile orantılı olarak arttığı fakat palamut %0,50 numune konsantrasyonu sonrasında KG değerinin numune konsantrasyonuna oranla daha az arttığı tespit edilmiştir. Çipura AÇK numunelerinin farklı konsantrasyonlarından elde edilen KG değerleri arasında da artış görülmekle birlikte çipura için KG değerlerinin hiçbirinde numune konsantrasyonu ile orantılı şekilde artış gerçekleştiği gözlenmemiştir. Çipura AÇK numunelerinde KG değerinin ortalama %17,666 olduğu tespit edilmiştir.

Palamut ve çipura AÇK numunelerinin bu tez çalışmasındaki KS değerleri, numune konsantrasyonları da göz önünde bulundurularak değerlendirildiğinde Ibrahim vd. (2023)'ün ve Bhuimbar vd. (2019)'un tespit etmiş olduğu değerler ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.13. Palamut ve çipura AÇK numunelerinin KS değerleri (%)

Numune	KS _{10.dakika} (%)	Numune	KS _{10.dakika} (%)
Palamut AÇK (%0,25 numune)	4,798 ±0,052 c	Çipura AÇK (%0,25 numune)	9,246 ±0,083 b
Palamut AÇK (%0,50 numune)	8,235 ±0,107 b	Çipura AÇK (%0,50 numune)	9,936 ±0,084 a
Palamut AÇK (%1,00 numune)	9,504 ±0,114 a	Çipura AÇK (%1,00 numune)	9,870 ±0,094 a

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (KS: Köpük Stabilitesi, AÇK: Asitte Çözünür Kolajen); Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Palamut AÇK numunelerinin KS değerlerinde; numune konsantrasyonları doğrultusunda elde edilen değerler, KG değerlerinde gözlenen artış trendine uygundu. Daha açık bir şekilde açıklamak gerekirse; palamut AÇK numunelerinin KS değerleri arasında istatistiki olarak anlamlı düzeyde farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Palamut AÇK numunelerinde %0,25 ile %0,50 numune konsantrasyonları arasında KS değerlerinin yaklaşık olarak numune konsantrasyonu ile orantılı arttığı fakat %0,50 numune konsantrasyonu sonrasında KS değerinin numune konsantrasyonuna kıyasla daha az oranda arttığı tespit edilmiştir. Duncan testinde çipura AÇK numunelerinin %0,50 ile %1,00 konsantrasyonlarındaki KS değerlerinin arasında istatistiki açıdan önemli bir fark olmadığı; fakat bu iki değer %0,25 konsantrasyonundaki KS değerinden istatistiki açıdan önemli düzeyde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Çipura AÇK numunelerinde 10. dakikadaki KS değerinin ortalama %9,684 olduğu tespit edilmiştir.

HKP numunelerinin köpük oluşturma özelliğine dair elde edilen sonuçlar Çizelge 4.14'te sunulmuştur.

Çizelge 4.14. Enzimatik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin KG ve KS değerleri

Yöntem	Numunenin Adı	Numunenin Miktarı	KG (%)	KS _{10.dakika} (%)
ENZİMATİK YÖNTEM (EKSTRAKSİYON İLE EŞ ZAMANLI HİDROLİZ İŞLEMİ)	PA1 (%0,5 enzim)	%0,25 numune	11,111 ±0,369 y	1,852 ±0,089 n
		%0,50 numune	16,071 ±0,375 x	8,929 ±0,104 j
		%1,00 numune	32,075 ±0,442 s	9,434 ±0,127 i
	PA2 (%1,0 enzim)	%0,25 numune	7,547 ±0,076 z	5,660 ±0,078 l
		%0,50 numune	20,370 ±0,390 v	9,259 ±0,100 i
		%1,00 numune	26,415 ±0,419 t	20,755 ±0,313 e
	PA3 (%1,5 enzim)	%0,25 numune	7,273 ±0,081 z	5,455 ±0,085 l
		%0,50 numune	25,926 ±0,496 t	7,407 ±0,126 k
		%1,00 numune	45,455 ±0,576 n	27,273 ±0,367 b
	ÇA1 (%0,5 enzim)	%0,25 numune	18,868 ±0,394 w	3,774 ±0,018 m
		%0,50 numune	18,519 ±0,330 w	5,556 ±0,087 l
		%1,00 numune	55,556 ±0,414 i	3,704 ±0,048 m
	ÇA2 (%1,0 enzim)	%0,25 numune	35,185 ±0,385 r	3,704 ±0,052 m
		%0,50 numune	36,364 ±0,399 q	3,636 ±0,021 m
		%1,00 numune	45,455 ±0,404 n	10,909 ±0,265 h
	ÇA3 (%1,5 enzim)	%0,25 numune	38,889 ±0,378 p	0,000 o
		%0,50 numune	51,852 ±0,516 l	0,000 o
		%1,00 numune	53,571 ±0,535 j	3,571 ±0,049 m
	PP1 (%0,5 enzim)	%0,25 numune	20,370 ±0,389 v	0,000 o
		%0,50 numune	38,889 ±0,416 p	0,000 o
		%1,00 numune	48,148 ±0,424 m	0,000 o
	PP2 (%1,0 enzim)	%0,25 numune	25,000 ±0,317 u	0,000 o
		%0,50 numune	35,849 ±0,367 qr	0,000 o
		%1,00 numune	56,364 ±0,572 h	0,000 o
	PP3 (%1,5 enzim)	%0,25 numune	25,000 ±0,396 u	0,000 o
		%0,50 numune	43,396 ±0,454 o	0,000 o
		%1,00 numune	61,224 ±0,519 g	0,000 o
	ÇP1 (%0,5 enzim)	%0,25 numune	62,162 ±0,576 f	24,324 ±0,393 c
		%0,50 numune	78,378 ±0,502 c	21,622 ±0,336 d
		%1,00 numune	88,571 ±0,656 a	28,571 ±0,350 a
	ÇP2 (%1,0 enzim)	%0,25 numune	52,778 ±0,477 k	5,556 ±0,083 l
		%0,50 numune	71,429 ±0,590 e	20,000 ±0,245 f
		%1,00 numune	86,486 ±0,504 b	10,811 ±0,204 h
	ÇP3 (%1,5 enzim)	%0,25 numune	45,946 ±0,381 n	5,405 ±0,050 l
		%0,50 numune	71,875 ±0,475 e	12,500 ±0,166 g
		%1,00 numune	72,973 ±0,418 d	5,405 ±0,096 l

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (HKP: Hidrolize Kolajen Peptitleri, KG: Köpük Genişlemesi, KS: Köpük Stabilitesi, PA: Enzimatik yöntemde palamut atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, ÇA: Enzimatik yöntemde çipura atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, PP: Enzimatik yöntemde palamut atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, ÇP: Enzimatik yöntemde çipura atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz); Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

Çizelge 4.15. Asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin KG ve KS değerleri

Yöntem	Numunenin Adı	Numunenin Miktarı	KG (%)	KS _{10.dakika} (%)
ASİDİK YÖNTEM (ASİDİK EKSTRAKSİYON VE ARDINDAN HİDROLİZ İŞLEMİ)	APA1 (%0,5 enzim)	%0,25 numune	26,415 ±0,275 r	0,000 c
		%0,50 numune	22,222 ±0,244 t	0,000 c
		%1,00 numune	16,364 ±0,196 v	0,000 c
	APA2 (%1,0 enzim)	%0,25 numune	22,642 ±0,255 t	0,000 c
		%0,50 numune	20,370 ±0,211 u	0,000 c
		%1,00 numune	20,370 ±0,286 u	0,000 c
	APA3 (%1,5 enzim)	%0,25 numune	24,528 ±0,289 s	0,000 c
		%0,50 numune	24,074 ±0,258 s	0,000 c
		%1,00 numune	29,630 ±0,339 a	0,000 c
	AÇA1 (%0,5 enzim)	%0,25 numune	22,642 ±0,279 t	0,000 c
		%0,50 numune	22,642 ±0,201 t	0,000 c
		%1,00 numune	22,642 ±0,288 t	0,000 c
	AÇA2 (%1,0 enzim)	%0,25 numune	22,642 ±0,210 t	0,000 c
		%0,50 numune	22,642 ±0,252 t	0,000 c
		%1,00 numune	22,642 ±0,274 t	0,000 c
	AÇA3 (%1,5 enzim)	%0,25 numune	22,642 ±0,290 t	0,000 c
		%0,50 numune	22,642 ±0,294 t	0,000 c
		%1,00 numune	22,642 ±0,287 t	0,000 c
	APP1 (%0,5 enzim)	%0,25 numune	34,545 ±0,347 p	0,000 c
		%0,50 numune	36,364 ±0,370 o	0,000 c
		%1,00 numune	45,455 ±0,402 k	0,000 c
	APP2 (%1,0 enzim)	%0,25 numune	46,296 ±0,454 j	0,000 c
		%0,50 numune	51,704 ±0,467 g	0,000 c
		%1,00 numune	50,000 ±0,465 h	0,000 c
	APP3 (%1,5 enzim)	%0,25 numune	41,509 ±0,422 m	0,000 c
		%0,50 numune	49,057 ±0,430 i	0,000 c
		%1,00 numune	57,407 ±0,431 f	0,000 c
	AÇP1 (%0,5 enzim)	%0,25 numune	20,370 ±0,133 u	1,852±0,022 b
		%0,50 numune	38,889 ±0,205 n	1,852±0,046 b
		%1,00 numune	44,231 ±0,398 l	1,923±0,045 a
	AÇP2 (%1,0 enzim)	%0,25 numune	62,264 ±0,571 e	0,000 c
		%0,50 numune	79,245 ±0,698 d	0,000 c
		%1,00 numune	98,113 ±0,772 a	0,000 c
	AÇP3 (%1,5 enzim)	%0,25 numune	79,245 ±0,627 d	0,000 c
		%0,50 numune	94,444 ±0,710 b	0,000 c
		%1,00 numune	85,185 ±0,719 c	0,000 c

Aynı sütunda yer alan farklı harfler aynı başlık altındaki ortalamalar arasında fark olduğunu göstermektedir. (HKP: Hidrolize Kolajen Peptitleri, KG: Köpük Genişlemesi, KS: Köpük Stabilitesi, APA: Asidik yöntemde palamut atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, AÇA: Asidik yöntemde çipura atıklarında alkalaz enzimi ile hidroliz, APP: Asidik yöntemde palamut atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz, AÇP: Asidik yöntemde çipura atıklarında pepsin enzimi ile hidroliz); Analiz sonuçları, tekerrür ortalama değeri ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.

HKP numunelerinin köpük oluşturma özellikleri ile ilgili olarak; herhangi bir balık atığının farklı enzim konsantrasyonları bir grup olarak ele alınmış ve söz konusu gruplar tek yönlü ANOVA analizine (Duncan testi) tabi tutulmuştur. “Köpük Genişlemesi” değerleri kendi içerisinde ve “Köpük Stabilitesi” değerleri kendi içerisinde değerlendirilmek üzere istatistiksel anlamda birbirlerinden farklı çıkan değerler, Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15’te aynı sütunda farklı harflerle gösterilerek sunulmuştur.

Palamut AÇK numunelerinin KG değeri Çizelge 4.12’ye göre en fazla %19,398 olarak bulunurken, enzimatik yöntemde alkalaz enzimi ile elde edilen palamut HKP numunelerinde KG değerinin Çizelge 4.14’e göre %45,455 (PA3-%1 numune) oranına kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir. Enzimatik yöntemde pepsin enzimi ile elde edilen palamut HKP numunelerinde ise KG değerinin Çizelge 4.14’e göre %61,224 (PP3-%1 numune) değerine kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Buradan anlaşılmaktadır ki; enzimatik yöntemde (Çizelge 4.14) palamut HKP numunelerinin farklı enzimlerle elde edilen en yüksek KG değerleri (alkalaz için %45,455 ve pepsin için %61,224), her iki enzim uygulamasında da en yüksek numune konsantrasyonu (%1) ve en yüksek enzim konsantrasyonu (%1,5 alkalaz) sonucunda ortaya çıkmıştır.

Palamut AÇK numunelerinin en yüksek KG değerine (%19,389) kıyasla asidik yöntemde alkalaz enzimi ile elde edilen palamut HKP numunelerinde KG değerinin Çizelge 4.15’e göre %29,630 (APA3-%1 numune) oranına kadar artış gösterdiği; asidik yöntemde pepsin enzimi ile elde edilen palamut HKP numunelerinde ise KG değerinin %57,407 (APP3-%1 numune) değerine kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Buradan anlaşılmaktadır ki; asidik yöntemde (Çizelge 4.15) de palamut HKP numunelerinin farklı enzimlerle elde edilen en yüksek KG değerleri (alkalaz için %29,630 ve pepsin için %57,407), her iki enzim uygulamasında da enzimatik yöntemde olduğu gibi en yüksek numune konsantrasyonu (%1) ve en yüksek enzim konsantrasyonu (%1,5 alkalaz) sonucunda ortaya çıkmıştır.

Çipura AÇK numunelerinin KG değeri Çizelge 4.12’ye en fazla %18,029 olarak bulunmuştur. Bu değere kıyasla; enzimatik yöntemde alkalaz enzimi ile elde edilen çipura HKP numunelerinde KG değerinin Çizelge 4.14’e göre %55,571 (ÇA3-%1 numune) oranına kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir. Enzimatik yöntemde pepsin enzimi ile elde edilen çipura HKP numunelerinde ise KG değerinin Çizelge 4.14’e göre %88,571 (ÇP1-%1 numune) oranına kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Çipura AÇK numunelerindeki en yüksek KG değerine (%18,029) kıyasla; asidik yöntemde alkalaz enzimi ile elde edilen çipura HKP numunelerinde KG değerinin Çizelge 4.15’e göre sabit ve %22 civarında ortaya çıktığı; asidik yöntemde pepsin enzimi ile elde edilen çipura HKP numunelerinde ise KG değerinin Çizelge 4.15’e göre %98,113 (AÇP2-%1 numune) değerine kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Çipura HKP numunelerinin KG değerleri arasında; asidik yöntemde alkalaz ile elde edilen değerlerin hepsinin sabit ve %22,642 olarak tespit edildiği görülmüştür. Çizelge 4.15’ten görüleceği üzere; bu numuneler AÇA1, AÇA2 ve AÇA3

numuneleridir. Değerlendirme kolaylığı açısından söz konusu bu numuneleri, “asidik yöntemden çipura atıklarında alkalaz ile elde edilenler” şeklinde bir grup olarak tanımlarsak bu gruptan başka 3 grup daha tanımlayabiliriz. Diğer 3 grup; “enzimatik yöntemden çipura atıklarında alkalaz ile elde edilenler”, “enzimatik yöntemden çipura atıklarında pepsin ile elde edilenler” ve “asidik yöntemden çipura atıklarında pepsin ile elde edilenler” şeklinde olacaktır. Bu diğer 3 grup için şöyle söylenebilir ki; her bir gruptaki en yüksek KG değerleri (%55,556, %88,571 ve %98,113), her seferinde %1 numune miktarının kullanılmasıyla ortaya çıkmıştır. Bu 3 grup içerisinde; enzimatik yöntemde ait olanların en yüksek KG değerleri (alkalaz için %55,556; pepsin için %88,571), numunelerde %0,5 enzim kullanımıyla elde edilebilmiştir. “Asidik yöntemden çipura atıklarında pepsin ile elde edilenler” grubundaki en yüksek KG değeri (%98,113) ise, numunede %1,0 enzim kullanımıyla elde edilmiştir.

Palamut AÇK numunelerinde KS’nin 10.dakikadaki değerinin Çizelge 4.13’e göre en fazla %9,504 olarak ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Bu değere kıyasla, enzimatik yöntemde alkalaz enzimi ile elde edilen palamut HKP numunelerinde 10.dakikada KS değerinin Çizelge 4.14’e göre %27,273 (PA3-%1,5 enzim) oranına kadar artış gösterdiği tespit edilmiştir. Enzimatik yöntemde pepsin enzimi ile elde edilen palamut HKP numunelerinde ise yeteri kadar köpük stabilitesi gözlenmemiştir. Söz konusu numunelerden elde edilen 10.dakikadaki KS değerlerinin Çizelge 4.14’e göre sıfır olduğu tespit edilmiştir. Yani palamut balığında pepsin enzimi ile gerçekleştirilen enzimatik yöntem köpük stabilitesi açısından etkili değildir.

Çipura AÇK numunelerinde 10. dakikada ortaya çıkan KS değerleri arasında en yüksek olanı Çizelge 4.13’e göre %9,870 idi. Bu değerle kıyaslandığı zaman enzimatik yöntemde alkalaz enzimi ile elde edilen çipura HKP numunelerinde 10.dakikadaki KS değerinin Çizelge 4.14’e göre %10,909 (ÇA2-%1 numune) olduğu tespit edilmiştir. Çipura AÇK numunesinin en yüksek değerine (%9,870) kıyasla, enzimatik yöntemde pepsin enzimi ile elde edilen çipura HKP numunelerinde 10.dakikadaki KS değerlerinin Çizelge 4.14’e göre %28,571 (ÇP1-%1 numune) oranına kadar çıktığı tespit edilmiştir.

Asidik yöntemden elde edilen palamut HKP numunelerinde 10.dakikada tespit edilen KS değerleri hem alkalaz enziminde hem pepsin enziminde aynı sonucu vermiş olup bulunan KS değerleri AÇP1 numunesi haricinde Çizelge 4.15’e göre her numune konsantrasyonunda sıfır olarak tespit edilmiştir. Buradan anlaşılmaktadır ki; her iki kaynak materyalde, her iki enzim çeşiti ile gerçekleştirilen uygulamalar etkili bir köpük stabilitesi için uygun şartlar taşımamaktadır. Bu durumun enzimatik yöntemde göre asidik yöntemde ortaya çıkmış olması, köpük stabilitesini sağlayacak olan peptit yapıların asidik yöntem ile değişikliğe uğramış olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.15’e göre asidik yöntemde alkalaz enzimi ile elde edilen çipura HKP numunelerinde (AÇA1, AÇA2 ve AÇA3) köpük stabilitesi söz konusu olmadığı tespit edilmiştir. Bu numunelerde 10.dakikadaki KS değerlerinin sıfır olduğu görülmüştür. Asidik yöntemde pepsin enzimi ile elde edilen çipura HKP numunelerinde (AÇP1, AÇP2 ve AÇP3) ise AÇK numunesine göre daha az oranda KS değerleri elde edilmiş olup en yüksek KS değeri Çizelge 4.15’e göre %1,923 (AÇP1-%1 numune) olarak tespit edilmiştir.

Hem palamut hem çipura HKP numunelerinin en yüksek KS değerleri, KG değerlerinde olduğu gibi yine en yüksek numune konsantrasyonu (%1) sonucunda elde edilmiştir. Enzim açısından ise enzim miktarının artışına paralel olarak KS değerinin arttığı gözlenmemiştir.

Palamut ve çipura atıklarından elde edilen AÇK numunelerine ait KG ve KS değerlerinin, siyah fırır balığı (*Centrolophus niger*) derisi AÇK'larından elde edilen KG ve KS değerlerine (Bhuimbar vd. 2019) kıyasla daha yüksek oranda ortaya çıktığı ifade edilebilmektedir. Baraküda balığı (*Sphyræna sp.*) kılçık ve yüzgeç kısımlarından elde edilen AÇK'de ise KG değerinin (%42,5) ve 1 saat sonra ölçümlenen KS değerinin (%11,81), palamut ve çipuradakinden daha yüksek olduğu (İbrahim vd. 2023) tespit edilmiştir.

Pepsin ile muamele edilen süslü iplik yüzgeçli çipura (*Nemipterus hexodon*) kas hidrolizatlarında %0,5 konsantrasyondaki numune için %122 ile %131 arasında KG değerleri ve %61 ile %78 arasında KS değerleri elde edilmiştir (Nalinanon vd. 2011). Bu doktora tez çalışmasında ise her iki yöntem dahil edilerek ifade edildiğinde; %0,25 ile %1,00 aralığında değişen konsantrasyonlardaki numunelerin %7,273 ile %98,113 arasında değişen KG değerleri ve %28,571'e varan oranda KS değerleri açığa çıkardığı ifade edilebilmektedir. Söz konusu değerler açısından bu tez çalışmasında daha düşük KG ve KS değerleri elde edilmiştir. Bununla birlikte; hamsi (*Engraulis encrasicolus*) balık atıklarının alkalaz HKP'lerinden elde edilen KG ve KS değerlerine (Koç 2016) kıyasla palamut ve çipura ile daha yüksek değerlerin elde edilebildiği görülmüştür. Çünkü Koç (2016), %0,25, %0,5 ve %1,0 protein içeren çözeltilerden %15.8 ile %43.3 arasında KG ve %10.8 ile %30.8 arasında KS elde etmiştir.

Bu tez çalışmasından elde edilen KG ve KS değerleri, sazan (*Cyprinus carpio*) balığı HKP'lerinden elde edilen KG ve KS değerleri ile uyumludur (González-Serrano vd. 2022).

Çeşitli balıkların deri, kafa ve kılçık kısımlarının karışımından elde edilen HKP numunelerinde moleküler ağırlık küçüldükçe KG değerlerinde düşüş gözlemlendiği ifade edilmiştir (Zamorano-Apodaca vd. 2020). Ayrıca sazan (*Cyprinus carpio*) balığı HKP'lerinde moleküler ağırlık küçüldükçe KG ve KS değerlerinde azalma gözlenmiştir (González-Serrano vd. 2022). Bu açıdan bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar incelenmiştir. SDS-PAGE analizi sonuçlarına göre; daha düşük moleküler ağırlıklı HKP numuneleri asidik yöntem ile elde edilenlerin olduğu tespit edilmiştir. Asidik yöntemle elde edilen HKP numunelerinin KG değerleri, Zamorano-Apodaca vd. (2020)'nin bildirdiği daha düşük moleküler ağırlıklarda daha düşük köpürme kapasitesi ortaya çıktığı verisini desteklemektedir. Çünkü en yüksek KG değerlerinin her iki yöntemde mukayesesi yapıldığı zaman asidik yöntemdeki KG değerlerinin (Çizelge 4.15) genel anlamda daha düşük olduğu görülecektir. Bu konuya dair Hajfathalian vd. (2018), düşük moleküler ağırlığa sahip peptit yapıların, hava-su arayüzünde yapılarını yeniden düzenleyememeleri nedeniyle köpük oluşturmak için gerekli kuvveti gösteremediklerini ifade etmiştir.

Numune konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak KG değerlerinde yükselme gerçekleştiği bildirilmiştir (Thiansilakul vd. 2007). Söz konusu durum bu doktora tezindeki KG değerlerinde de tespit edilmiştir. Özellikle enzimatik yöntemin HKP

numuneleri olmak üzere her iki yöntemde de numune konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak KG değerlerinde artış meydana gelmiştir.

KG açısından enzimatik ve asidik yöntemler kıyaslandığında; asidik yöntemde daha yüksek oranlara kadar KG değerleri elde edilebilmiştir. KS açısından ise enzimatik yöntem daha etkili olmuştur. Çünkü asidik yöntemde köpük stabilitesi değerlerinin neredeyse tamamı sıfırdır.

Thiansilakul vd. (2007), köpük stabilitesini değerlendirmek için Japon istavriti (*Decapterus maruadsi*) balığından elde edilen HKP numunelerini 60 dakika boyunca bekletmiştir. Bununla birlikte ilk 10 dakika içerisinde en yüksek KS değerlerini elde edebildiğini görmüştür. Bu tez çalışmasında da aynı şekilde KS değerlendirmesi için 60 dakika boyunca beklenmiştir fakat sonuçlarda dikkate değer bir değişim gözlenmediği için ilk 10 dakika verileri göz önüne alınmış ve 10.dakikadan sonraki veriler paylaşılmamıştır.

Enzimatik yöntemde numune konsantrasyonu arttıkça KS değerlerinde ekseriyetle artış meydana geldiği tespit edilmiştir. Fakat enzimatik yöntemin KS değerleri incelendiğinde; her iki balık türü için alkalaz enzimi ile elde edilmiş numunelerden daha net KS değerleri alınabilirken pepsin enzimi ile elde edilmiş numunelerde KS değerlerinin palamut balığı için sıfır olduğu ve çipura balığı için ise daha az tutarlı KS değerlerinin ortaya çıktığı görülmüştür.

Enzimatik yöntemde alkalaz enzimi ile elde edilen palamut HKP numunelerinin KS değerleri daha yüksektir. Asidik yöntemde ise pepsin enzimi ile elde edilen çipura HKP numunelerinin KS değerleri daha yüksektir. Asidik yöntemdeki KS değerleri incelendiğinde; kaynak materyali açısından ne palamut ne çipura; enzim türü açısından ne alkalaz ne pepsin etkili bir KS oluşturmamıştır.

5. SONUÇLAR

Palamut (*Sarda sarda*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarının kafatası ve iç organlarından oluşan atıklarından fonksiyonel özellikli bileşiklerin elde edilmesi amacıyla ekstraksiyon ve hidroliz işlemleri gerçekleştirilmiştir. Balık atıklarından alkalaz ve pepsin enzimleri vasıtasıyla 2 adet AÇK ve 24 adet HKP numunesi elde edilmiş; bu numunelerin birtakım özellikleri ortaya konmuştur. Çalışma kapsamında öncelikle kolajen verimi AÇK üzerinden tespit edilmiştir. Devamında AÇK ve HKP numunelerinin moleküler ağırlık düzeyleri, antioksidan kapasiteleri, çözünürlük özellikleri, emülsiyon oluşturma ve köpük oluşturma özellikleri araştırılmıştır.

Palamut atıklarından ortalama %10,50 AÇK, çipura atıklarından ise ortalama %14,51 AÇK elde edilmiştir. Elde edilen verim değerleri, literatür verileri ile kıyaslandığında oldukça yüksek değerlerdir. Bununla birlikte; mezgit balığı (*Merlangius euxmus*) ile yapılan denemelerden aynı ölçüde beklenen verim değerleri elde edilememiş olup bu açıdan mezgit balığı çalışma kapsamından çıkarılmıştır. Kolajen ve kolajen hidrolizatlarının verim hesabında farklı çalışmalarda farklı parametrelerin dikkate alınmasından kaynaklı olarak verim değerinin çeşitli şekillerde hesaplanmış olabildiği görülmüştür. Çeşitli balıkların farklı kısımlarında çalışmaların yapıldığı görülmüştür fakat bu tezin kapsamında yer alan palamut ve çipura balıklarında AÇK verim hesabının ortaya konması, alanında bir ilktir.

Moleküler ağırlık analizlerinde AÇK numunelerinin 130 kDa ile 250 kDa aralığında yer aldığı ve AÇK numunelerinin moleküler ağırlıklarının hidroliz işlemi ile 10 kDa ağırlığının altına kadar düşürülebileceği tespit edilmiştir. Meydana gelen hidrolize peptitlerin moleküler ağırlıklarının genel olarak 10 kDa ile 55 kDa aralığında dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Moleküler ağırlık analizinde enzimatik yöntemle kıyasla asidik yöntemin, palamut balığı atıklarına kıyasla çipura balığı atıklarının, asidik yöntem için alkalaz enzimin ve enzimatik yöntem için pepsin enziminin daha etkili olduğu belirlenmiştir. Enzim miktarları açısından ise %1 ve %1,5 oranlarının daha etkili olduğu görülmüştür. Literatür bilgileri doğrultusunda peptitlerdeki moleküler ağırlık düzeylerinde meydana gelen azalmanın, peptitlerin fonksiyonel özelliklerinde genellikle artış meydana getirdiği bilinmektedir. Palamut ve çipura atık hidrolizatlarının daha büyük moleküler ağırlığa sahip olan AÇK numuneleri ile kıyaslandığında; hidrolizatların emülsiyon oluşturma özelliği haricinde; daha fazla antioksidan kapasite, daha fazla çözünürlük ve daha fazla köpük oluşturma özelliği gibi fonksiyonel özellikler sağladığı tespit edilmiştir.

AÇK ve HKP numunelerin antioksidatif kapasitelerinin değerlendirilmesi açısından birden fazla antioksidan analizi ile ön denemeler gerçekleştirilmiş ve yöntemlerden en çok öne çıkan iki tanesi olan DPPH ve ABTS analizleri çalışma için seçilerek numuneler üzerinde uygulanmıştır. Sonuçlar TE ($\mu\text{mol/g}$ hidrolizat), IC₅₀ (mg) ve RSA (%) cinsinden olmak üzere çeşitli şekillerde sunulmuştur. Analiz sonuçlarına göre AÇK numunelerinin antioksidan kapasitelerinin sınırlı olduğu tespit edilmiştir. Fakat AÇK numunelerinin hidrolize olarak ortaya çıkarmış olduğu HKP numunelerinde radikal süpürücü etkinin arttığı tespit edilmiştir. Bu durum, HKP numunelerinin antioksidan kapasitelerinin AÇK numunelerine kıyasla daha fazla olduğu anlamını taşımaktadır. Hidrolizatlardaki antioksidatif etkinin artışı ise önemli düzeyde meydana gelmiş olup AÇK numunesine kıyasla palamut atıkları HKP numunelerinde %556,565

oranına kadar radikal temizleme aktivitesi artışı gerçekleşmiştir. Bu oran çipura AÇK atıkları HKP numunelerinde ise %594,181 oranına kadar yükselmiştir. Söz konusu oranlar ABTS radikalindeki en yüksek radikal giderim etkisidir. Çalışmadaki HKP numunelerinin, DPPH yöntemine göre ABTS antioksidan aktivite tayini yöntemine daha uygun olduğu yargısına ulaşılmıştır. Literatür verileri incelendiğinde; HKP numunelerinin önemli ölçüde antioksidan aktivitesi oluşturduğu tespit edilmiştir. Sonuçlara göre; antioksidan kapasitedeki en yüksek artış enzimatik yöntem ile gerçekleşmiştir. HKP numunelerindeki RSA değerlerinin istatistiksel sonuçları incelendiğinde; bağımsız örneklerde t-testine göre palamut balık atıklarında daha fazla antioksidan kapasitenin ortaya çıkarılabileceği tespit edilmiştir. En yüksek %RSA değerlerinin alkalaz enzimi ile ortaya çıkarılmış olduğu tespit edilmiştir. Hidroliz sırasında kullanılan enzim konsantrasyonlarının artışının, numunelerin antioksidan kapasiteleri üzerine aynı oranda artış sağlamadığı ve enzim konsantrasyonu olarak %0,5 alkalaz enziminin antioksidan kapasitenin açığa çıkması için yeterli olduğu tespit edilmiştir.

HKP numunelerinin çözünürlük değerleri AÇK numunelerine kıyaslandığında önemli oranda artış göstermiştir. En yüksek artış oranı; palamut atıklarından alkalaz enzimi ile elde edilen HKP numunelerinde görülmüş olup hidrolizatlarla aynı alkali pH değerindeki (pH:10) AÇK numunesine göre 54,8 kat artmıştır. Asidik pH değerindeki AÇK numunesine göre ise HKP numunesinin çözünürlük değeri %31 oranında artış göstermiştir. En yüksek çözünürlük özelliği gösteren HKP numunesi, %98,351 oranı ile palamut atıklarından %1,5 alkalaz enzimi ile elde edilen hidrolizat (PA3) olmuştur. HKP çözünürlük özellikleri hususunda asidik yöntemin enzimatik yöntemle göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Palamut ve çipura atıklarından elde edilen HKP numunelerinde 25,498 m²/g düzeyine kadar EAİ değerlerinin elde edildiği tespit edilmiştir. Söz konusu değerlerin, literatür verilerine kıyasla düşük kaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte; özellikle enzimatik yöntemdeki ESI değerleri olmak üzere hidrolizatların ESI değerlerinin literatür verilerine kıyasla dikkate değer ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Enzimatik yöntemde ESI değerlerinin 55,8 dakikaya kadar çıkabildiği belirlenmiştir. Genel anlamda; asidik yöntemden elde edilen HKP numunelerinde ortaya çıkan EAİ değerlerinin, aynı numunelerin enzimatik yöntemden elde edilmiş olanlarının EAİ değerlerine göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu doğrultuda; HKP numunelerinin emülsiyon oluşturma kabiliyetlerinin düşük olup fakat oluşan emülsiyonu koruma kabiliyetlerinin ise yeterli düzeyde olduğu tespit edilmiştir. EAİ ve ESI değerlerinin ikisini birlikte göz önünde bulundurarak emülsiyon oluşturma özelliğini değerlendirmek gerekirse; palamut atık hidrolizatlarında %0,5 oranında pepsin enzimi kullanılarak optimum etkinin elde edilebileceği belirlenmiştir.

HKP numunelerinin köpük oluşturma kabiliyetleri açısından bu çalışmadaki KG ve KS değerlerinin literatür verilerine uygun olduğu ve önemli düzeylerde KG ile KS değerlerinin elde edilmiş olduğu tespit edilmiştir. Enzimatik yöntemde %88,571 düzeyine kadar, asidik yöntemde ise %98,113 düzeyine kadar hidrolizatlardan KG özelliği elde edilmiştir. En yüksek KG değerinin asidik yöntemle çipura atıklarından %1 pepsin enzimi ile ve %1 HKP numunesi kullanılarak elde edildiği tespit edilmiştir. KG açısından enzimatik ve asidik yöntem olarak her iki yöntemden de oldukça yüksek sonuçların açığa çıktığı fakat asidik yöntemde daha yüksek oranlara kadar KG değerleri

elde edilebildiği belirlenmiştir. Her iki yöntemde de numune konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak KG değerlerinde artış meydana gelmiştir.

Palamut balığında pepsin enzimi ile gerçekleştirilen enzimatik yöntemin KS özelliği açısından etkili olmadığı; aynı yöntemde çipuranın pepsin ile enzimi ile elde edilmiş KS değerlerinin ise önemli sonuçlar ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. KS değerlerinin ise %28,571'e varan oranlarda meydana geldiği ve en yüksek KS değerinin çipura balığı atıklarından %0,5 pepsin enzimi ile elde edildiği (ÇP1) tespit edilmiştir. Hem palamut hem çipura HKP numunelerinin en yüksek KS değerleri, KG değerlerinde olduğu gibi yine en yüksek numune konsantrasyonu (%1) sonucunda elde edilmiştir. Enzim açısından ise enzim miktarının artışına paralel olarak KS değerinin arttığı gözlenmemiştir. KS açısından enzimatik yöntemin daha etkili olduğu; asidik yöntemde balık türünün veya kullanılan enzim çeşitinin etkili bir KS oluşturamadığı tespit edilmiştir.

Çipura balık atıklarının veriminin ve köpük oluşturma özelliğinin yüksek; palamut balık atıklarının ise antioksidan kapasitesinin, çözünürlük özelliğinin ve emülsiyon stabilitesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Enzimatik yöntemin; daha yüksek antioksidan kapasitesi, daha yüksek emülsiyon stabilitesi ve daha yüksek köpük stabilitesi sağladığı; asidik yöntemin ise daha çok çözünürlük ve daha çok köpük genişlemesi sağladığı tespit edilmiştir. Daha fazla antioksidan kapasite ve daha çok çözünürlüğün alkalaz enzimi ile, daha fazla emülsiyon oluşturma ve köpük oluşturma özelliğinin ise pepsin enzimi ile elde edilebildiği tespit edilmiştir. Bu sayılan parametreler hidroliz yönteminin, kaynak materyalin veya enzim türünün tek başına ortaya çıkardığı etkiler olmayıp her analiz kendi içinde bu parametrelerin farklı değerleri doğrultusunda şekillenmektedir.

Sonuç olarak, bu doktora tez çalışmasında uygulanan enzimatik ve asidik yöntemlerin her ikisinin de gıda bilimine katkı sağlayacak sonuçlar ortaya çıkardığı ve yöntemlerin birbirlerine karşı üstünlüklerinin HKP'lerden ne yönde yararlanacağımıza bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla beraber; söz konusu şartlar ile bir yöntem tercihinde bulunmak gerektiğinde, yapılan çalışmaların toplamı düşünülerek asidik yöntemden elde edilen olumlu sonuçların daha fazla ortaya çıkmış olduğu söylenebilmektedir.

Çalışmanın bütüncül olarak değerlendirilmesi sonucunda palamut ve çipura atıklarından elde edilen hidrolize kolajen peptitlerinin antioksidan kapasiteleri, çözünürlük özellikleri ve köpük oluşturma özellikleri açısından gıda sistemlerinde doğal bir katkı maddesi olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Çalışma ile elde edilen hidrolize kolajen peptitlerinin, fonksiyonel gıda bileşenleri olarak farklı gıda ürünlerinin kalitesini iyileştirmek için kullanılabilme potansiyeli vardır. Elzem veya elzem olmayan amino asit içeriğinden ve önemli oranda antioksidan kapasitesinden dolayı bu yapılar, gıdaların biyolojik değerini artıracaklardır. Aynı zamanda, kimyasal koruyucuların kullanımını azaltacak ve güvenli ve yeşil gıda ürünleri için tüketici taleplerini karşılayabilecek doğal antioksidanlar ve tekstüre edici maddeler olarak da kullanılabileceklerdir. Örneğin; hidrolize peptitlerin, et ürünleri üretiminde kullanılan nitrat ve nitrit yerine kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi, araştırmaya müsait bir konu olarak ifade

edilebilir. Böylesi olumlu etkilere sahip gıda bileşenlerinin, gerek tek başına besin takviyeleri olarak gerekse gıda formülasyonlarına katılarak gıda endüstrisinde fonksiyonel özellikli yenilikçi ürünlerin ortaya konması mümkündür. Ortaya konabilecek çeşitli ürünlere; tablet formunda gıda takviyeleri, protein tozları, içecek formülasyonları veya uyumlu herhangi bir gıda maddesi formülasyonu örnek verilebilir. Her alanda olduğu gibi gıda bilimi alanında da, ürünlerin kalitesinin korunması ve iyileştirilmesi için yeni nesil uygulamalara her zaman ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmanın, kolajen bazlı başta olmak üzere çeşitli hidrolize peptitlerin fonksiyonel özellikleri konusunda ilgi uyandıracak ve yeni gıda formülasyonlarının geliştirilmesi için ışık tutacağı düşünülmektedir. Çalışmadan elde edilecek bilgi ve bulguların, saygın uluslararası dergilerde makale formatında yayınlanması ve yurt içi ve yurt dışı kongrelerde sözlü sunum olarak takdim edilmesi mümkün olacaktır. Bu çalışma, farklı enzim kombinasyonları denenerek gerçekleştirilebilecek çeşitli enzimatik uygulamaları ve daha düşük moleküler ağırlıklı peptitlerin elde edilmesini içeren bir tasarımın ön çalışması niteliğinde kurgulanmıştır.

Bu doktora tezinin, titiz analizler ve denemeler yoluyla bilimsel bilgiyi iletmeye katkı sağlayacağı, disiplinler arası işbirliğini teşvik edeceğini ve kaynak kullanımı, atık yönetimi konularında sürdürülebilir uygulamalara ilham vereceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Rezaei, M., Jafarpour, A., and Undeland, I. 2018. Sequential extraction of gel-forming proteins, collagen and collagen hydrolysate from gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), a biorefinery approach. *Food Chem.*, 242: 568-578.
- Ahmad, M. and Benjakul, S. 2010. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chem.*, 120(3): 817-824.
- Ahn, C.B., Kim, J.G., and Je, J.Y. 2014. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chem.*, 147: 78-83.
- Akar, Z., Küçük, M. and Doğan, H. 2017. A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 32 (1): 640-7.
- Ardağ, A. 2008. Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması. Yüksek lisans tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 70 s.
- Ardhani, F.A.K., Safithri, M., Tarman, K. and Setyaningsih, I. 2019. Antioxidant activity of collagen from skin of parang-parang fish (*Chirocentrus dorab*) using DPPH and CUPRAC methods. *Earth Environ. Sci.*, 241 (1).
- Azizah, N., Ochiai, Y., and Nurilmala, M. 2020. Collagen peptides from Pangasius fish skin as antioxidants. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 404 (1): 012055.
- Baehaki, A., Nopianti, R., and Anggraeni, S. 2015. Antioxidant activity of skin and bone collagen hydrolyzed from striped catfish (*Pangasius pangasius*) with papain enzyme. *J. Chem. Pharm. Res.*, 7(11): 131-135.
- Benhabiles, M.S., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., Goosen, M.F.A., and Mameri, N. 2012. Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. *Mater. Sci. Eng. A*, 32(4): 922-928.
- Bhagwat, P.K., and Dandge, P.B. 2016. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 7: 234-240.
- Bilgin, G.K. 2021. Farklı tür balık pullarından alkalaz enzimi ile biyomalzeme amaçlı kolajen eldesi ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 52 s.
- Cardoso, V.S., Quelemes, P.V., Amorin, A., Primo, F.L., Gobo, G.G., Tedesco, A.C., Mafud, A.C., Mascarenhas, Y.P., Corrêa, J.R., Kuckelhaus, S.A.S., Eiras, C., Leite, J.R.S.A., Silva, D and dos Santos Júnior, J.R. 2014. Collagen-based silver nanoparticles for biological applications: synthesis and characterization. *J. Nanobiotechnology*, 12: 1-9.

- Centenaro, G. S., Centenaro, M. S., and Hernandez, C. P. 2011. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, 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 Chem.*, 135(4): 3020-3038.
- Chanmangkang, S., Wangtueai, S., Pansawat, N., Tepwong, P., Panya, A., and Maneerote, J. 2022. Characteristics and Properties of Acid-and Pepsin-Solubilized Collagens from the Tail Tendon of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Polymers*, 14(23): 5329.
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R., and Hong, B. 2016. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT- Food Sci. Technol.*, 66: 453-459.
- Chen, Y.P., Liang, C.H., Wu, H.T., Pang, H.Y., Chen, C., Wang, G.H., and Chan, L.P. 2018. Antioxidant and anti-inflammatory capacities of collagen peptides from milkfish (*Chanos chanos*) scales. *J. Food Sci. Technol.*, 55: 2310-2317.
- Chi, C.F., Cao, Z.H., Wang, B., Hu, F.Y., Li, Z.R., and Zhang, B. 2014. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*, 19(8): 11211-11230.
- Chi, C., Hu, F., Li, Z., Wang, B., and Luo, H. 2016. Influence of different hydrolysis processes by trypsin on the physicochemical, antioxidant, and functional properties of collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei*, and *Raja porosa*. *J. Aquat. Food Prod.*, 25(5): 616-632.
- Chotphruethipong, L., Sukketsiri, W., Aluko, R.E., Sae-Leaw, T., and Benjakul, S. 2021. Effect of hydrolyzed collagen from defatted Asian sea bass (*Lates calcarifer*) skin on fibroblast proliferation, migration and antioxidant activities. *J. Food Sci. Technol.*, 58: 541-551.
- Diniz F. M. and Martin A. M., 1997. Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.*, 30: 266-272.
- Erol, N. D., Erdem, Ö. A., ve Çaklı, Ş. 2017. Çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)'ların baş bölgesinden elde edilen protein hidrolizatlarının depolamadaki kararlılığı. *Ege J. Fish. Aquat. Sci.*, 34(3): 327-336.
- Felician, F.F., Xia, C., Qi, W., and Xu, H. 2018. Collagen from marine biological sources and medical applications. *Chem. Biodiversity*, 15(5): 1-18.
- Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., and Chun, O. K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.*, 24(7): 1043-1048.
- 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. *J. Sci. Food Agric.*, 97(1): 299-308.
- Gaspardi, A.L.A., da Silva, D.C., Ponte, L.G.S., Galland, F., da Silva, V.S.N., Simabuco, F.M., and Pacheco, M.T.B. 2022. In vitro inhibition of glucose gastro-intestinal enzymes and antioxidant activity of hydrolyzed collagen peptides from different species. *J. Food Biochem.*, 46(12): 14383.
- Gbogouri, G.A., M. Linder, J. Fanni and M. Parmentier. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *J. Food Sci.* 69(8): 615–622.
- González-Serrano, D. J., Hadidi, M., Varcheh, M., Jelyani, A. Z., Moreno, A., and Lorenzo, J. M. 2022. Bioactive peptide fractions from collagen hydrolysate of common carp fish byproduct: Antioxidant and functional properties. *Antioxidants*, 11(3), 509.
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.A., and Montero, M.P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocoll.*, 25(8): 1813-1827.
- Hacisa, C.M., and Baygar, T. 2023. Extraction and characterization of acid soluble collagen from golden grey mullet (*Chelon auratus*) scale. *COMU J. Mar. Sci. Fish.*, 6(2): 166-177.
- Hajfathalian, M., Ghelichi, S., García-Moreno, P. J., Moltke Sørensen, A. D., and Jacobsen, C. 2018. Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 58(18): 3097-3129.
- Hou, N.T., and Chen, B.H. 2023. Extraction, purification and characterization of collagen peptide prepared from skin hydrolysate of Sturgeon fish. *Food Qual Saf.*, 7: 1-15.
- aJongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., Tanaka, M. 2005. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chem.*, 93(3): 475-484.
- bJongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M. 2005. Isolation and characterization of collagen from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) skin. *J. Sci. Food Agric.*, 85(7): 1203-1210.
- 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. *Poult. Sci.*, 93(9): 2347-2362.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., and Tanaka, M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.*, 89(3): 363-372.
- 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 Chem.* 102: 1317–1327.

- Koç, S. 2016. Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve işleme atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının besleyici, fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerinin araştırılması. Doktora tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, 123 s.
- Korkmaz, K, Tokur, B. ve Uçar, Y. 2021. Enzimatik hidroliz yöntemi kullanılarak balık işleme atıklarından balık protein hidrolizatı üretimi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 31(2): 502-513.
- Kulkarni, P. and Maniyar, M. 2020. Utilization of fish collagen in pharmaceutical and biomedical industries: waste to wealth creation. *Life Sci. Inform. Publications*, 6(3): 11.
- Kusumaningtyas, E., Nurilmala, M., and Sibarani, D. 2019. Antioxidant and antifungal activities of collagen hydrolysates from skin of milkfish (*Chanos chanos*) hydrolyzed using various bacillus proteases. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 278 (1): 012040).
- Lee, J.E., Noh, S.K., and Kim, M.J. 2022. Effects of enzymatic-and ultrasound-assisted extraction on physicochemical and antioxidant properties of collagen hydrolysate fractions from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Antioxidants*, 11(11): 2112.
- León-López, A., Morales-Peñaloza, A., Martínez-Juárez, V. M., Vargas-Torres, A., Zeugolis, D. I., and Aguirre-Álvarez, G. 2019. Hydrolyzed collagen—sources and applications. *Molecules*, 24(22), 4031.
- Li, L. Y., Zhao, Y. Q., He, Y., Chi, C. F., and Wang, B. 2018. Physicochemical and antioxidant properties of acid-and pepsin-soluble collagens from the scales of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). *Mar. Drugs*: 16(10): 394.
- Li, Z.R., Wang, B., Chi, C.F., Zhang, Q.H., Gong, Y.D., Tang, J.J., Ding, G.F. 2013a. Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). *Food Hydrocoll.*, 31(1): 103-113.
- Li, Z., Wang, B., Chi, C., Gong, Y., Luo, H., Ding, G. 2013b. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. *Food Res. Int.*, 51(1): 283-293.
- Liang, J., Pei, X.R., Wang, N., Zhang, Z.F., Wang, J.B., and Li, Y. 2010. Marine collagen peptides prepared from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin extend the life span and inhibit spontaneous tumor incidence in sprague-dawley rats. *J. Med. Food*, 13(4): 757-770.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Mazloomi, S.N., Mahoonak, A.S., Mora, L., Ghorbani, M., Houshmand, G., and Toldrá, F. 2021. Pepsin hydrolysis of orange by-products for the production of bioactive peptides with gastrointestinal resistant properties. *Foods*, 10(3): 679.
- Medina-Medrano, J.R., Quiñones-Muñoz, T.A., Arce-Ortíz, A., Torruco-Uco, J.G., Hernández-Martínez, R., Lizardi-Jiménez, M.A., and Varela-Santos, E. 2019.

- Antioxidant activity of collagen extracts obtained from the skin and gills of *Oreochromis* sp. *J. Med. Food*, 22(7): 722-728.
- Mutilangi, W.A.M., D. Panyam and A. Kilara. 1996. Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *J. Food Sci.* 61: 270–303.
- Nalinanon S., Soottawat B., Hideki K., Fereidoon S., 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem.*, 124: 1354-1362.
- Nguyen, B. C., Kha, T. C., Nguyen, K. H. N., and Nguyen, H. M. X. 2021. Optimization of enzymatic hydrolysis of collagen from yellowfin tuna skin (*Thunnus albacares*) by response surface methodology and properties of hydrolyzed collagen. *J. Food Process. Preserv.*, 45(4): e15319.
- Nurilmala, M., Hizbullah, H.H., Karnia, E., Kusumaningtyas, E. and Ochiai, Y. 2020. Characterization and antioxidant activity of collagen, gelatin, and the derived peptides from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) skin. *Mar. Drugs*, 18(2): 98.
- Polat Köse L. and Gülçin, İ. 2021. Evaluation of the antioxidant and antiradical properties of some phyto and mammalian lignans. *Molecules*, 26(23): 7099.
- Pal G.K. and Suresh P.V. 2016. Sustainable valorisation of seafood by-products: recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.*, 37: 201-215.
- Pires, C., and Batista, I. 2013. Functional properties of fish protein hydrolysates. *Utilization of Fish Waste*, 59–75.
- Rajabimashhadi, Z., Gallo, N., Salvatore, L., and Lionetto, F. 2023. Collagen derived from fish industry waste: progresses and challenges. *Polymers*, 15(3): 544.
- Raman, M, and Gopakumar K. 2018. Fish collagen and its applications in food and pharmaceutical industry: a review. *EC Nutrit.*, 13: 752-767.
- Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., and Kishimura, H. 2011. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chem.*, 124(1), 97-105.
- Sinthusamran, S., Benjakul, S., and Kishimura, H. 2013. Comparative study on molecular characteristics of acid soluble collagens from skin and swim bladder of seabass (*Lates calcarifer*). *Food Chem.*, 138(4): 2435-2441.
- Sugiharta, S., Prihatini, E., and Mursal, I.L.P. 2023. Development of raw collagen from waste milkfish (*Chanos chanos*) scales as a preservative and emulsifying agents. *J. Borneo*, 3(1): 22-33.
- Thiansilakul Y., Benjakul S. and Shahidi F., 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chem.*, 103: 1385-1394.
- Thuy, L.T.M., Okazaki, E., and Osako, K. 2014. Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chem.*, 149: 264-270.

- Türkaslan, K.E. ve Çaklı, Ş. 2018. Kültür çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*) balıklarının fileto edilmesi sonucunda ortaya çıkan atıklardan protein hidrolizat eldesi, fonksiyonel ve antioksidant özellikleri ve depolamadaki kararlılığı. *Ege J. Fish. Aquat. Sci.*, 35(4): 397-406.
- Wang, J., Pei, X., Liu, H., and Zhou, D. 2018. Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Int. J. Biol. Macromol.*, 106: 544-550.
- Wang, W. Y., Zhao, Y. Q., Zhao, G. X., Chi, C. F., and Wang, B. 2020. Antioxidant peptides from collagen hydrolysate of redlip croaker (*Pseudosciaena polyactis*) scales: Preparation, characterization, and cytoprotective effects on H2O2-damaged HepG2 cells. *Mar. drugs*, 18(3): 156.
- Wei, P., Zheng, H., Shi, Z., Li, D., and Xiang, Y. 2019. Isolation and characterization of acid-soluble collagen and pepsin-soluble collagen from the skin of hybrid sturgeon. *J. Wuhan Univ. Technol.-Mater. Sci. Ed.*, 34(4): 950-959.
- Wikipedia, 2022. Collagen. <https://en.wikipedia.org/wiki/Collagen> [Son erişim tarihi: 13.01.2022]
- Wu, R., Wu, C., Liu, D., Yang, X., Huang, J., Zhang, J., and He, H. 2018. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. *Food Chem.*, 248: 346-352.
- 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 Chem.*, 331: 127350.
- Zeugolis, D.I., Li, B., Lareu, R.R., Chan, C.K., Raghunath, M. 2008. Collagen solubility testing, a quality assurance step for reproducible electro-spun nano-fibre fabrication, a technical note. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 19(10): 1307-1317.
- Zhang, J., Duan, R., Tian, Y., and Konno, K. 2009. Characterisation of acid-soluble collagen from skin of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem.*, 116(1): 318-322.
- Zhang, J. B., Zhao, Y. Q., Wang, Y. M., Chi, C. F., and Wang, B. 2019. Eight collagen peptides from hydrolysate fraction of Spanish mackerel skins: Isolation, identification, and in vitro antioxidant activity evaluation. *Mar. Drugs*, 17(4): 224.

7. EKLER

EK-1. Enzimatik Yöntemde Alkalaz Enziminden DPPH Radikali Kullanılarak Elde Edilen Antioksidan Değerleri Açısından Palamut ve Çipura Balıkları Arasındaki T-Testi

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
DEGISKEN	Equal variances assumed	13,604	,002	13,407	16
	Equal variances not assumed			13,407	10,054

EK-2. Enzimatik Yöntemde Pepsin Enziminden DPPH Radikali Kullanılarak Elde Edilen Antioksidan Değerleri Açısından Palamut ve Çipura Balıkları Arasındaki T-Testi

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
DEGISKEN	Equal variances assumed	10,129	,006	8,615	16
	Equal variances not assumed			8,615	11,865

EK-3. Enzimatik Yöntemde Alkalaz Enziminden ABTS Radikali Kullanılarak Elde Edilen Antioksidan Değerleri Açısından Palamut ve Çipura Balıkları Arasındaki T-Testi

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
DEGISKEN	Equal variances assumed	10,893	,005	-1,802	16
	Equal variances not assumed			-1,802	10,496

EK-4. Enzimatik Yöntemde Pepsin Enziminden ABTS Radikali Kullanılarak Elde Edilen Antioksidan Değerleri Açısından Palamut ve Çipura Balıkları Arasındaki T-Testi

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
DEGISKEN	Equal variances assumed	1,006	,331	-54,598	16
	Equal variances not assumed			-54,598	14,894

EK-5. Asidik Yöntemde Alkalaz Enziminden DPPH Radikali Kullanılarak Elde Edilen Antioksidan Değerleri Açısından Palamut ve Çipura Balıkları Arasındaki T-Testi

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
DEGISKEN	Equal variances assumed	34,338	,000	3,329	16
	Equal variances not assumed			3,329	8,173

EK-6. Asidik Yöntemde Pepsin Enziminden DPPH Radikali Kullanılarak Elde Edilen Antioksidan Değerleri Açısından Palamut ve Çipura Balıkları Arasındaki T-Testi

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
DEGISKEN	Equal variances assumed	5,176	,037	12,285	16
	Equal variances not assumed			12,285	12,488

EK-7. Asidik Yöntemde Alkalaz Enziminden ABTS Radikali Kullanılarak Elde Edilen Antioksidan Değerleri Açısından Palamut ve Çipura Balıkları Arasındaki T-Testi

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
DEGISKEN	Equal variances assumed	,356	,559	-5,266	16
	Equal variances not assumed			-5,266	15,700

EK-8. Asidik Yöntemde Pepsin Enziminden ABTS Radikali Kullanılarak Elde Edilen Antioksidan Değerleri Açısından Palamut ve Çipura Balıkları Arasındaki T-Testi

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means	
		F	Sig.	t	df
DEGISKEN	Equal variances assumed	2,627	,125	-10,251	16
	Equal variances not assumed			-10,251	13,808

EK-9. Enzimatik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin DPPH radikali üzerindeki Antioksidan Aktivitesi için Gruplar Arası ANOVA (Duncan) testi

FAKTOR	N	Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
11	3	4,3900								
12	3	5,0000								
10	3		8,5370							
8	3			11,1110						
5	3			11,4670						
9	3				12,2220					
4	3				12,5330					
7	3					13,3330				
6	3						14,8000			
2	3							28,9330		
1	3								31,0670	
3	3									38,0000
Sig.		,084	1,000	,304	,368	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

EK-10. Enzimatik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin ABTS radikali üzerindeki Antioksidan Aktivitesi için Gruplar Arası ANOVA (Duncan) testi

FAKTOR	N	Subset for alpha = 0.05									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
7	3	19,9080									
8	3		20,8800								
9	3			22,2410							
11	3				51,0750						
12	3					52,3330					
10	3						54,2170				
3	3							95,5700			
2	3							96,1770			
5	3								97,4510		
4	3									98,6230	
6	3									98,6640	
1	3										99,4040
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	,087	1,000	,905	1,000

EK-11. Asidik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin DPPH radikali üzerindeki Antioksidan Aktivitesi için Gruplar Arası ANOVA (Duncan) testi

FAKTOR	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
10	3	14,1330							
12	3		14,8000						
11	3		15,3330						
3	3			16,5330					
4	3			16,8840					
6	3				17,6000				
5	3				17,7730				
9	3					18,8000			
8	3					18,9330			
7	3						20,8000		
2	3							24,8000	
1	3								27,2000
Sig.		1,000	,083	,246	,563	,656	1,000	1,000	1,000

EK-12. Asidik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin ABTS radikali üzerindeki Antioksidan Aktivitesi için Gruplar Arası ANOVA (Duncan) testi

FAKTOR	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
8	3	26,5150							
7	3	26,8850							
9	3	27,3600							
12	3		29,6200						
10	3		30,0210						
11	3			31,2780					
2	3				33,5180				
3	3					41,4420			
1	3					42,1710			
4	3						46,0540		
6	3							48,1460	
5	3								56,4660
Sig.		,071	,354	1,000	1,000	,099	1,000	1,000	1,000

EK-13. Hidrolize Kolajen Peptitlerinin Çözünürlük Özelliği için Gruplar Arası ANOVA (Duncan) Testi

TEKERRUR	N	Subset for alpha = 0.05								Subset for alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
9,00	3	20,1000																
7,00	3		23,5470															
8,00	3			24,6680														
11,00	3				32,7160													
12,00	3					34,4970												
10,00	3					35,2740												
6,00	3						70,0810											
5,00	3							72,7510										
4,00	3							73,3620										
1,00	3								74,9040									
3,00	3									79,0980								
21,00	3										84,1110							
19,00	3										84,6190							
2,00	3											86,1140						
22,00	3											86,5650	86,5650					
23,00	3												87,3760	87,3760				
20,00	3													87,5930				
24,00	3														90,5580			
13,00	3															92,5860		
16,00	3																96,8720	
17,00	3																97,3450	97,3450
14,00	3																97,5700	97,5700
18,00	3																	98,1290
15,00	3																	98,3510
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	,105	1,000	,200	1,000	1,000	,285	,342	,091	,646	1,000	1,000	,167	,055

EK-14. Palamut Asit Çözünür Kolajen Numunelerinin Emülsiyon Aktivite İndeksi Değerleri için ANOVA (Duncan) Testi

PALAMUT_ACK_KONS	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
%0,25_NUMUNE	3	4,0690		
%0,50_NUMUNE	3		4,5010	
%1,00_NUMUNE	3			5,0700
Sig.		1,000	1,000	1,000

EK-15. Çipura Asit Çözünür Kolajen Numunelerinin Emülsiyon Aktivite İndeksi Değerleri için ANOVA (Duncan) Testi

CIPURA_ACK_KONS	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
%0,25_NUMUNE	3	3,9170	
%0,50_NUMUNE	3		4,6230
%1,00_NUMUNE	3		4,7290
Sig.		1,000	,050

EK-16. Palamut Asit Çözünür Kolajen Numunelerinin Emülsiyon Stabilite İndeksi Değerleri için ANOVA (Duncan) Testi

PALAMUT_ACK_KONS	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
%0,25_NUMUNE	3	24,2460		
%0,50_NUMUNE	3		39,8700	
%1,00_NUMUNE	3			43,9360
Sig.		1,000	1,000	1,000

EK-17. Çipura Asit Çözünür Kolajen Numunelerinin Emülsiyon Stabilite İndeksi Değerleri için ANOVA (Duncan) Testi

CIPURA_ACK_KONS	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
%0,25_NUMUNE	3	14,2350		
%0,50_NUMUNE	3		14,7980	
%1,00_NUMUNE	3			17,2320
Sig.		1,000	1,000	1,000

EK-18. Enzimatik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin Emülsiyon Aktivite İndeksi Değeri için ANOVA (Duncan) Testi

TEKERRUR	N	Subset for alpha = 0.05							Subset for alpha = 0.05							Subset for alpha = 0.05							Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
27,00	3	,4610																									
9,00	3	,4970																									
15,00	3	,5010																									
18,00	3		,6210																								
6,00	3			,8660																							
21,00	3			,8750																							
12,00	3			,8920																							
3,00	3				,8920																						
24,00	3					,9570																					
17,00	3						1,0020																				
14,00	3						1,0280																				
5,00	3							1,1470																			
8,00	3								1,6290																		
26,00	3							1,6700																			
23,00	3									1,7280																	
11,00	3										1,9270																
20,00	3											2,0120															
16,00	3												2,4170														
7,00	3												2,4790														
36,00	3													2,4790													
13,00	3														2,5200												
4,00	3														2,5960												
10,00	3															2,6970											
30,00	3																3,0140										
2,00	3																3,0880										
33,00	3																	3,1980									
1,00	3																		3,2920								
35,00	3																			3,5100							
29,00	3																			3,5710							
25,00	3																				3,7770						
32,00	3																					4,5030					
22,00	3																					4,5250					
31,00	3																						5,3280				
28,00	3																						6,6030				
34,00	3																							6,8640			
19,00	3																								6,9420		
Sig.		,337	1,000	,533	,098	,088	1,000	,284	,140	1,000	1,000	,115	,284	,054	1,000	,061	1,000	1,000	,121	1,000	,573	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	8,6970

EK-19. Enzimatik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin Emülsiyon Stabilite İndeksi Değeri için ANOVA (Duncan) Testi

TEKERRUR	N	Subset for alpha = 0.05																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
31,00	3	13,0590																							
25,00	3		14,0440																						
22,00	3		14,2990																						
12,00	3			15,1250																					
29,00	3				15,6070																				
26,00	3				15,7550																				
27,00	3				15,9060	15,9060																			
34,00	3				16,2270	16,2270	16,2270																		
30,00	3						16,5230																		
23,00	3							17,0910																	
36,00	3							17,1210																	
15,00	3								17,8950																
18,00	3									19,0400															
13,00	3									19,4680															
32,00	3										20,0280														
10,00	3										20,3400	20,3400													
16,00	3											20,6340	20,6340												
3,00	3											20,9300													
14,00	3												21,5210												
24,00	3												21,5440												
6,00	3														22,2680										
33,00	3															23,2030									
17,00	3															23,4450									
11,00	3																24,2670								
28,00	3																24,3410								
35,00	3																	25,1220							
4,00	3																		26,2180						
5,00	3																			28,1530					
1,00	3																			28,1690					
2,00	3																			28,5710					
9,00	3																				29,3750				
8,00	3																				29,5650				
19,00	3																					35,7140			
20,00	3																						43,4440		
7,00	3																							48,5710	
21,00	3																								55,8820
Sig.		1,000	,246	1,000	,201	,146	,179	,891	1,000	,054	,157	,182	,179	,916	1,000	,271	,735	1,000	1,000	,073	,387	1,000	1,000	1,000	1,000

EK-20. Asidik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin Emülsiyon Aktivite İndeksi Değeri için ANOVA (Duncan) Testi

TEKERRUR	N	Subset for alpha = 0.05																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
6,00	3	.8110																						
3,00	3	.9360	.9360																					
18,00	3		1,0060																					
15,00	3		1,0320																					
5,00	3			1,2310																				
36,00	3			1,2580																				
9,00	3			1,2860																				
12,00	3				1,5760																			
14,00	3					1,7720																		
2,00	3					1,8220																		
8,00	3						2,0450																	
11,00	3						2,2110																	
27,00	3							2,4170																
21,00	3							2,4350																
17,00	3							2,5170																
4,00	3								2,7860															
33,00	3								2,9090															
1,00	3									3,2940														
24,00	3									3,3050														
30,00	3									3,3570														
7,00	3										4,0240													
35,00	3											4,4510												
16,00	3												6,0430											
10,00	3													6,2640										
13,00	3														6,5150									
32,00	3														6,5990									
26,00	3															8,4490								
29,00	3																8,8100							
34,00	3																	9,3080						
23,00	3																		10,3910					
20,00	3																			12,3330				
31,00	3																				15,3210			
28,00	3																					17,5100		
25,00	3																					17,5390		
22,00	3																						24,3640	
19,00	3																							25,4980
Sig.		,157	,305	,558	1,000	,569	,061	,286	,163	,502	1,000	1,000	1,000	1,000	,339	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	,741	1,000	1,000	

EK-21. Asidik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin Emülsiyon Stabilite İndeksi Değeri için ANOVA (Duncan) Testi

		Subset for alpha = 0.05																				
TEKERRUR	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
32,00	3	15,1520																				
28,00	3		15,5150																			
33,00	3			15,8990																		
25,00	3			15,9730																		
26,00	3			16,1480																		
27,00	3				16,7560																	
30,00	3					17,3900																
8,00	3						17,9030															
36,00	3						17,9960	17,9960														
10,00	3						18,0210	18,0210														
13,00	3						18,2640	18,2640	18,2640													
34,00	3							18,3040	18,3040													
11,00	3							18,5180	18,5180													
23,00	3							18,7740														
17,00	3																					
12,00	3										19,4590											
7,00	3										19,6140											
14,00	3										19,7830											
35,00	3											20,9130										
2,00	3											21,0380										
24,00	3												21,8090									
22,00	3												21,8190									
20,00	3												21,9520									
15,00	3													22,5210								
9,00	3													22,5810								
21,00	3													22,8100	22,8100							
19,00	3													22,8240	22,8240							
16,00	3														23,0620							
31,00	3														23,1640							
1,00	3															25,4120						
4,00	3																26,6070					
29,00	3																	27,3910				
6,00	3																	27,5110				
18,00	3																		28,0250			
5,00	3																			29,1980		
3,00	3																				35,9140	
Sig.		1,000	1,000	,184	1,000	1,000	,062	,112	,176	,148	,084	,477	,447	,119	,068	1,000	1,000	,495	1,000	1,000	1,000	1,000

EK-22. Enzimatik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin Köpük Genişlemesi Değeri için ANOVA (Duncan) Testi

TEKERRUR	N	Subset for alpha= 0.05																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
7,00	3	7,2730																									
4,00	3	7,5470																									
1,00	3		11,1110																								
2,00	3			16,0710																							
11,00	3				18,5190																						
10,00	3				18,8680																						
5,00	3					20,3700																					
19,00	3					20,3700																					
22,00	3						25,0000																				
25,00	3						25,0000																				
8,00	3							25,9260																			
6,00	3							26,4150																			
3,00	3								32,0750																		
13,00	3									35,1850																	
23,00	3									35,8490																	
14,00	3										35,8490																
16,00	3										36,3640																
20,00	3											38,8890															
26,00	3											38,8890															
9,00	3												43,3960														
15,00	3													45,4550													
34,00	3													45,4550													
21,00	3													45,9460													
17,00	3														48,1480												
31,00	3															51,8520											
18,00	3																52,7780										
12,00	3																	53,5710									
24,00	3																		55,5560								
27,00	3																			56,3640							
28,00	3																				61,2240						
32,00	3																					62,1620					
35,00	3																						71,4290				
36,00	3																						71,8750				
29,00	3																							72,9730			
33,00	3																								78,3780		
30,00	3																									88,4860	
Sig.		,452	1,000	1,000	,338	1,000	1,000	,181	1,000	,071	,159	1,000	1,000	,206	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	,222	1,000	1,000	1,000	88,5710

EK-23. Enzimatik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin Köpük Stabilitesi Değeri için ANOVA (Duncan) Testi

TEKERRUR	N	Subset for alpha = 0.05														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
16,00	3	,0000														
17,00	3	,0000														
19,00	3	,0000														
20,00	3	,0000														
21,00	3	,0000														
22,00	3	,0000														
23,00	3	,0000														
24,00	3	,0000														
25,00	3	,0000														
26,00	3	,0000														
27,00	3	,0000														
1,00	3		1,8520													
18,00	3			3,5710												
14,00	3			3,6360												
12,00	3			3,7040												
13,00	3			3,7040												
10,00	3			3,7740												
36,00	3				5,4050											
34,00	3				5,4050											
7,00	3				5,4550											
11,00	3				5,5560											
31,00	3				5,5560											
4,00	3				5,6600											
8,00	3					7,4070										
2,00	3						8,9290									
5,00	3							9,2590								
3,00	3							9,4340								
33,00	3								10,8110							
15,00	3								10,9090							
35,00	3									12,5000						
32,00	3										20,0000					
6,00	3											20,7550				
29,00	3												21,6220			
28,00	3													24,3240		
9,00	3														27,2730	
30,00	3															28,5710
Sig.		1,000	1,000	,175	,093	1,000	1,000	,187	,458	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

EK-24. Asidik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin Köpük Genişlemesi Değeri için ANOVA (Duncan) Testi

		Subset for alpha = 0.05																					
TEKERRUR	N	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
3,00	3	16,3640	20,3700 20,3700 20,3700	22,2220 22,6420 22,6420 22,6420 22,6420 22,6420 22,6420 22,6420 22,6420 22,6420 22,6420	24,0740 24,5280	26,4150	29,6300	34,5450	36,3640	38,8890	41,5090	44,2310	45,4550	46,2960	49,0570	50,0000	51,7040	57,4070	62,2640	79,2450 79,2450	85,1850	94,4440	98,1130
5,00	3																						
6,00	3																						
28,00	3																						
2,00	3																						
4,00	3																						
10,00	3																						
12,00	3																						
14,00	3																						
17,00	3																						
11,00	3																						
13,00	3																						
15,00	3																						
16,00	3																						
18,00	3																						
8,00	3																						
7,00	3																						
1,00	3																						
9,00	3																						
19,00	3																						
20,00	3																						
29,00	3																						
25,00	3																						
30,00	3																						
21,00	3																						
22,00	3																						
26,00	3																						
24,00	3																						
23,00	3																						
27,00	3																						
31,00	3																						
32,00	3																						
34,00	3																						
36,00	3																						
35,00	3																						
33,00	3																						
Sig.		1,000	1,000	,298	,174	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	

EK-25. Asidik Yöntemle Elde Edilen Hidrolize Kolajen Peptitlerinin Köpük Stabilitesi Değeri için ANOVA (Duncan) Testi

TEKERRUR	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1,00	3	,0000		
2,00	3	,0000		
3,00	3	,0000		
4,00	3	,0000		
5,00	3	,0000		
6,00	3	,0000		
7,00	3	,0000		
8,00	3	,0000		
9,00	3	,0000		
10,00	3	,0000		
11,00	3	,0000		
12,00	3	,0000		
13,00	3	,0000		
14,00	3	,0000		
15,00	3	,0000		
16,00	3	,0000		
17,00	3	,0000		
18,00	3	,0000		
19,00	3	,0000		
20,00	3	,0000		
21,00	3	,0000		
22,00	3	,0000		
23,00	3	,0000		
24,00	3	,0000		
25,00	3	,0000		
26,00	3	,0000		
27,00	3	,0000		
31,00	3	,0000		
32,00	3	,0000		
33,00	3	,0000		
34,00	3	,0000		
35,00	3	,0000		
36,00	3	,0000		
29,00	3		1,8520	
28,00	3		1,8520	
30,00	3			1,9230
Sig.		1,000	1,000	1,000

ÖZGEÇMİŞ

ONUR BASANÇELEBİ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2017-2024	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2014-2017	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2007-2011	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Bölüm Başkan Yardımcısı 2018-2024	Giresun Üniversitesi Şebinkarahisar Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, Giresun
Öğretim Görevlisi 2018-Devam Ediyor	Giresun Üniversitesi Şebinkarahisar Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi Bölümü, Giresun

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Cengiz, M. F., **Basançelebi, O.**, Kitis, Y. E. (2017). Glyphosate residues in drinking waters and adverse health effects. The Turkish Journal of Occupational/Environmental Medicine and Safety, 2(1(3)), 247-258.
- 2- Cengiz M.F., Başlar M., **Basançelebi O.**, Kılıçlı M., (2018). Reduction of pesticide residues from tomatoes by low intensity electrical current and ultrasound applications, Food Chemistry, vol.267, pp.60-66, 2018.
- 3- Cengiz M.F., **Basançelebi O.**, Başlar M., Certel M., (2021). "A novel technique for the reduction of pesticide residues by a combination of low-intensity electrical current and ultrasound applications: A study on lettuce samples", Food Chemistry, vol.354, 129360.
- 4- Cüce, M., **Basançelebi, O.** (2021). Comparison of volatile constituents, antioxidant and antimicrobial activities of *Thymus leucotrichus* (Lamiaceae) stem and leaves essential oils from both natural resources and in vitro derived shoots. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 24(5), 1097-1112.
- 5- Bilgin, A. K., Cengiz, M. F., Karakaş-Budak, B., Gümüş, C., Kılıç, S. A., Perinçek, F., **Basançelebi O.**, Certel, M. (2023). Elemental compositions and stable isotope signatures for determining the geographical origin of salep orchids collected from different regions of Turkey. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 37, 100505.

Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- 1- Cengiz, M. F., **Basançelebi, O.**, Kitis, Y. E. "Glyphosate residues in drinking waters and adverse health effects", The Turkish Journal of Occupational/Environmental Medicine and Safety, 2(1 (3)), 247-258, 2017.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1- Cengiz M.F., Bilgin A.K., **Basançelebi O.**, Gümüş C., Karakaş Budak B., "Glucomannan Compositions of Salep Powder for the Determination of Salep and Its Adulteration", International Conference on Raw Materials to Processed Foods, ANTALYA, TÜRKİYE, 11-13 Nisan 2018, pp.64-64.
- 2- Cengiz M.F., Ersoy N., Tongur T., Eraymaz T., **Basançelebi O.**, "Amino Acid Compositions of Some Important Aromatic Plants", 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, KONYA, TÜRKİYE, 9-12 Mayıs 2017, pp.189-189.

3- Cengiz M.F., **Basançelebi O.**, Kitiş Y.E., "Glyphosate Residues in Drinking Waters and Adverse Health Effects", 2nd International Water and Health Congress,, ANTALYA, TÜRKIYE, 13 şubat 2017, pp.407-409.

4- Cengiz M.F., Gmş C., Tongur T., ErKaymaz T., **Basançelebi O.**, "Compositions of Amino Acids in Different Varieties of Salep Tubers", 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, KONYA, TÜRKIYE, 9-12 Mayıs 2017, pp.1704-1704.

5- Cengiz M.F., **Basançelebi O.**, Başlar M., "Reduction of Pesticide Residues from Tomatoes by Low Intensity Electrical Current and Ultrasound Applications", First Food Chemistry Conference, AMSTERDAM, HOLLANDA, 29 Ekim - 2 Kasım 2016, pp.07-07.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Cengiz M.F., **Basançelebi O.**, "Tarım İlacı Kalıntılarının Mevsimsel Sıcaklık ve Nem Etkileriyle Değişimi", Türkiye Doğal Beslenme ve Yaşam Boyu Sağlık Zirvesi '2015, SAKARYA, TÜRKIYE, 3-5 Mayıs 2015, ss.345-345.

2- Cengiz M.F., **Basançelebi O.**, "Pestisit Kalıntılarının Uzaklaştırılmasında Yenilikçi Yöntemler", Türkiye Doğal Beslenme ve Yaşam Boyu Sağlık Zirvesi '2015, ANTALYA, TÜRKIYE, 3-5 Mayıs 2015, ss.346-346.