

**T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TİCARİ ENZİMLER KULLANILARAK FARKLI BALIK
TÜRÜ ATIKLARINDAN HİDROLİZAT ÜRETİMİ VE
KALİTESİNİN BELİRLENMESİ**

KORAY KORKMAZ

DOKTORA TEZİ

ORDU 2018

TEZ ONAY

Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Koray KORKMAZ tarafından hazırlanan ve Prof. Dr. Bahar TOKUR danışmanlığında yürütülen “Ticari Enzimler Kullanılarak Farklı Balık Türü Atıklarından Hidrolizat Üretimi ve Kalitesinin Belirlenmesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 25/12/2017 tarihinde oy birliği ile Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Bahar TOKUR

Başkan : Prof. Dr. Şükran ÇAKLI
Avlama ve İşleme Teknolojisi,
Ege Üniversitesi
Prof. Dr. Bahar TOKUR

Üye : Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği,
Ordu Üniversitesi
Doç.Dr.Ash CADUN YÜNLÜ

Üye : Avlama ve İşleme Teknolojisi,
Ege Üniversitesi
Yrd. Doç. Dr. Hasan TÜRE

Üye : Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Mühendisliği,
Ordu Üniversitesi
Yrd. Doç. Dr. Cem Tolga GÜRKANLI

Üye : Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği,
Ordu Üniversitesi

İmza : 

İmza : 

İmza : 

ONAY:

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 24/01/2018 tarih ve 2018.../39 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Enstitü Müdürü
Yrd.Doç.Dr.Mehmet Sami GÜLER

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.


Koray KORKMAZ

ÖZET

Ticari Enzimler Kullanılarak Farklı Balık Türü Atıklarından Hidrolizat Üretimi ve Kalitesinin Belirlenmesi

Koray KORKMAZ

Ordu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı, 2018
Doktora Tezi, 127s.

Danışman: Prof. Dr. Bahar TOKUR

Bu çalışmada, alabalık (*Onchoryncus mykiss*), hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve mezgıt (*Merlangius merlangus*) atıkları, alkali proteaz (pH 8), protameks (pH 7.0) ve flavourenzim (pH 7.0) kullanılarak üç farklı enzim oranı (%1, %1.5 ve %2), üç farklı süre (1, 4.5 ve 8 saat) ve üç farklı sıcaklık (40 °C, 50 °C ve 60 °C) uygulanarak hidroliz edilmiştir. Optimum hidroliz prosesinde en uygun süre, sıcaklık ve enzim oranı hidroliz derecesine göre (%HD) alkali proteaz enzimi için alabalık atığında 60 °C, 1.0 saat ve %1.0 enzim oranı, mezgıt atığında 60°C, 1.0 saat ve %1.27 enzim oranı, hamsi atığında 44.06°C, 1.0 saat ve %1.05 enzim oranı; protameks için alabalık atığında 50 °C, 1.0 saat ve %1,0 enzim oranı, mezgıt atığında 50 °C, 1.0 saat ve %1.0 enzim oranı ve hamsi atığında 50 °C, 1.37 saat ve %1.01 enzim oranı; flavourenzim için alabalık atığında 50 °C, 1.30 saat ve %1.00 enzim oranı, mezgıt atığında 50 °C, 1.03 saat ve %1.0 enzim oranı ve hamsi atığında 50 °C, 1.48 saat ve %1.00 enzim oranı saptanmıştır. Farklı süre, sıcaklık ve enzim oranı ile hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının moleküler ağırlıklarının (sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile karakterizasyonu sonucunda, hidroliz süresi arttıkça büyük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin yoğunluklarında azalma buna karşılık küçük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin yoğunlukların da ise artış görülmüştür. Bu çalışmada, balık atığı türü ve enzim türüne göre hidroliz derecesi (% HD)' nin %50.92 ile % 74.30 arasında değiştiği belirlenmiştir. Gruplar içinde en yüksek protein geri kazanımı mezgıt ve hamsi atığının protameks ile ve mezgıt atığının alkali proteaz ile hidrolizatından elde edilirken ($p<0.05$), en düşük protein geri kazanımı %73.54 ile mezgıt atığının flavourenzim ile hidrolizinden elde edilmiştir ($p<0.05$). Alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının toplam amino asit içerikleri incelendiğinde (g/100 g), en yüksek miktarda bulunan amino asitin tüm balık ve enzim gruplarında aspartik asit ve glutamik asit olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

Anahtar Kelimeler: Balık atığı, protein hidrolizatı, optimizasyon, besinsel kompozisyon

ABSTRACT

Production and Quality Control of Hydrolysates from the Wastes of Different Fish Types Using Commercial Enzymes

Koray KORKMAZ

University of Ordu
Institute for Graduate Studies in Science ve Technology
Department of Fisheries Technology Engineering, 2018
MSc. Thesis, 127p.

Supervisor: Prof. Dr. Bahar TOKUR

In this study, the wastes of trout (*Onchoryncus mykiss*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and whiting fish (*Merlangius merlangus*) has hydrolysed by using alkali protease (pH 8), protameks (pH 7.0) ve flavourenzim (pH 7.0) ve applying 3 different enzyme rates (1%, 1.5% ve 2%), 3 different time periods (1, 4.5 ve 8 hours) and 3 different temprature rates (40 °C, 50 °C ve 60 °C). According to the most optimal time, temperature and enzyme rate hydrolysate degree (HD%) during the optimum hydrolyses process, for alkali protease enzyme in trout waste 60°C, 1.0 hour and 1.0% enzyme rate, in whiting fish waste 60 °C, 1.0 hours and 1.27% enzyme rate and in anchovy waste 44.06 °C, 1.0 hours and 1.05% enzyme rate; for protamex in trout waste 50°C, 1.0 hour and 1.00% enzyme rate, in whiting fish waste 50 °C, 1.0 hours and 1.0% enzyme rate and in anchovy waste 50 °C, 1.37 hours and 1.01% enzyme rate; for flavor enzyme in trout waste 50°C, 1.30 hours and 1.00% enzyme rate, in whiting fish 50°C, 1.03 hours and 1.0% enzyme rate, in anchovy waste 50°C, 1.48 hours and 1.00% enzyme rate have been detected. As a result of characterization by sodium dodecylsulphate- polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of protein hydrolysate molecular weights obtained from trout, anchovy and whiting fish wastes which were hydrolyzed with different time period, temperature and enzyme rates, while duration of hydrolysis increases more, the density of peptides which have low molecular weight decreases, in response to this, there is an increase of the density of peptides which has high molecular weight. As a result of optimization, significant differences in the amino acid and mineral contents of all produced fish groups protein hydrolysis, have been detected according to fish species and enzyme types. In this study it was determined that the rate of hydrolyses (%HD) changes between 50.92% and 74.30% in accordance with the types of fish waste and the enzyme. While the highest protein recovery among the groups was achieved with the hydrolysate of whiting and anchovy waste with protamex and the hydrolysate of whiting waste with alkali protease (p<0.05), the lowest protein recovery rate of 73.54% was obtained by the hydrolysate whiting waste with flavour enzyme (p<0.05). When the total acid contents of the protein hydrolysates derived from trout, anchovy and whiting wastes were studied (g/100g), the highest amino acid was observed to e aspartic acid and glutamic acid in all fish and enzyme groups (p<0.05).

Keywords: Fish waste, protein hydrolysis, optimization, food composition

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanma, çalışmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında büyük emeği geçen, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli bilim insanı Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. Bahar TOKUR'a,

Çalışmalarım boyunca desteklerini benden esirgemeyen değerli arkadaşlarım Ozan ŞEN, Arş. Gör. Dr. Mustafa DURMUŞ, ve Öğr. Gör. Mehmet Letif BAYRAM'a,

Desteklerini sürekli hissettiğim ailem ve dostlara,

Bu zorlu süreçte, sabır, anlayış, ilgi ve sevgisi ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Nalan ve bize hayat enerjisi veren oğlum Burak'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (ODÜ/BAP) tarafından BD-1701 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
ÇİZELGELER LİSTESİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Balık Atıklarının Kimyasal Kompozisyonu.....	5
2.2. Balık Atığı Proteinleri.....	8
2.3. Balık Protein Hidrolizat Üretimi.....	10
2.4. Enzimatik Hidroliz.....	12
2.4.1. Enzimatik Hidrolizin Üretim Basamakları.....	14
2.4.1.1. Ön Hidroliz	15
2.4.1.2. Hidrolizasyon.....	16
2.4.1.3. Geri kazanım.....	18
2.4.1.4. Cevap Yüzeyi Yöntemi (Responce Surface Methodology)	23
2.4.1.4.1. Balık Protein Hidrolizatlarının CevapYüzey Yöntemi ile Optimizasyonu	25
2.4.1.4.2. Box Behnken Dizaynı	299
2.5. Protein Hidrolizatının Besinsel Kompozisyonu.....	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM	37
3.1. Materyal	37
3.2. Yöntem.....	37
3.2.1. Enzimatik Hidroliz.....	37
3.2.2. Hidroliz Derecesi (%HD) Tespiti	41
3.2.3. Protein Geri Kazanımı	41
3.2.4. Besin Kompozisyonu Analizleri	41
3.2.4.1. Lipid Analizi	42
3.2.4.2. Kül Analizi.....	42
3.2.4.3. Nem Analizi	43
3.2.4.4. Protein Analizi	43
3.2.4.5. Sodyum Dedosil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi Analizi	43

3.2.4.6.	Hidroliz Derecesi için Araştırma Modeli ve İstatistiksel Analiz	44
3.2.4.7.	Aminoasit Analizi	51
3.2.4.7.1.	Toplam Amino Asit Analizi.....	51
3.2.4.8.	İz Element Analizi	51
3.2.5.	İstatistiksel Analizler.....	52
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	53
4.1.	Balık Atıklarının Kimyasal Kompozisyonu.....	53
4.2.	Cevap Yüzey Yöntemi ile Hidroliz Parametrelerinin Optimizasyonu.....	54
4.2.1.	Alabalık Atıklarının Alkali Proteaz Enzimi ile Optimizasyonu.....	54
4.2.2.	Mezgit Atıklarının Alkali Proteaz Enzimi ile Optimizasyonu	58
4.2.3.	Hamsi Atıklarının Alkali Proteaz Enzimi ile Optimizasyonu.....	63
4.2.4.	Alabalık Atıklarının Protameks Enzimi ile Optimizasyonu.....	64
4.2.5.	Mezgit Atıklarının Protameks Enzimi ile Optimizasyonu	68
4.2.6.	Hamsi Atıklarının Protameks Enzimi ile Optimizasyonu	72
4.2.7.	Alabalık Atıklarının Flavourenzim ile Optimizasyonu.....	74
4.2.8.	Mezgit Atıklarının Flavourenzim ile Optimizasyonu	78
4.2.9.	Hamsi Atıklarının Flavourenzim ile Optimizasyonu	82
4.3.	Optimize Edilen Hidrolizatların Hidroliz Derecesi (%HD).....	84
4.4.	Optimize Edilen Hidrolizatların Protein Geri Kazanımları.....	87
4.5.	Hidrolizatların Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi	
	Profilleri	90
4.5.1.	Alkali Proteaz Enziminin Alabalık, Hamsi ve Mezgit Atığı.....	
	Hidrolizatlarına Etkisi.....	90
4.5.2.	Protameks Enziminin Alabalık, Hamsi ve Mezgit Atığı Hidrolizatlarına	
	Etkisi	94
4.5.3.	Flavourenzimin Alabalık, Hamsi Ve Mezgit Atığı Hidrolizatlarına Etkisi..	95
4.5.4.	Optimizasyon Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının SDS-PAGE	
	Profilleri	97
4.6.	Protein Hidrolizatlarının Besinsel Kalitesi.....	99
4.6.1.	Protein Hidrolizatlarının Kimyasal Kompozisyonu.....	99
4.6.2.	Optimizasyon Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Aminoasit	
	Kompozisyonu	102
4.6.3.	Optimizasyon Sonucu Protein Hidrolizatlarının İz Element İçerikleri	107
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	111
6.	KAYNAKLAR	115
	ÖZGEÇMİŞ.....	125

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Başlıca balık atığı bileşenleri	4
Şekil 2.2.	Balık atıklarının bileşenleri	5
Şekil 2.3.	Hamsi etinde ve atıklarında makro besin bileşenlerinin dağılımı	8
Şekil 2.4.	Myosinin (A) ve aktinin (B) yapısal şekli	9
Şekil 2.5.	Bir dipeptitin iki serbest amino aside hidrolizi	10
Şekil 2.6.	Enzimatik yöntemle balık protein hidrolizatı üretmek için kullanılan akış diyagramı	15
Şekil 2.7.	Sıvı protein hidrolizatı elde edildildiğinde ortaya çıkan fazlar	19
Şekil 2.8.	Hidrolizat SDS–PAGE.	21
Şekil 2.9.	TBHP'nin moleküler ağırlıklarının SDS-PAGE ile karakterizasyonu....	22
Şekil 2.10.	Hidrolizatların hidroliz süreleri bazında hidroliz dereceleri(%).....	23
Şekil 2.11.	İçorgan atığının alkalaz ile hidrolize edilmesi sırasında HD'nin tepki yüzeyi grafiği	27
Şekil 2.12.	Box-Behnken dizayn sınırları	30
Şekil 2.13.	Sıvı ve kurutulmuş hidrolizatların % kuru madde (%KM) değerleri	33
Şekil 3.1.	Balık atıklarının protameks ve flavourenzim ile optimizasyonunda hidrolizat üretim akış şeması.....	39
Şekil 3.2.	Balık atıklarının alkali proteaz enzimi ile optimizasyonunda hidrolizat üretim akış şeması	40
Şekil 3.3.	Alkali proteaz enzimi kullanılarak CYY Box-Benkhen modeli ile optimize edilerek üretilen hidrolizat sıvısı ve fazları.....	45
Şekil 3.4.	Flavourenzim kullanılarak CYY Merkezi Birleşik Tasarım modeli ile optimize edilerek üretilen üretilen hidrolizat sıvısı ve fazları	46
Şekil 3.5.	Alkali proteaz enzimi kullanılarak CYY Box-Benkhen modeli ile optimize edilerek üretilen a)Alabalık, mezgıt hamsi atığı hidrolizatları	49
Şekil 3.6.	Alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatı üretimine ait fotoğraflar	50
Şekil 4.1.	CYY ile alabalık atıklarında alkali poteaz enzimi ile sıcaklık ve zamana göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b)kontür grafik.....	57
Şekil 4.2.	CYY ile alabalık atıklarında alkali poteaz enzimi ile sıcaklık ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik....	57
Şekil 4.3.	CYY ile mezgıt atıklarında alkali poteaz enzimi ile sıcaklık ve zamana göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik....	62
Şekil 4.4.	CYY ile mezgıt atıklarında alkali poteaz enzimi ile sıcaklık ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik....	62
Şekil 4.5.	CYY ile mezgıt atıklarında alkali poteaz enzimi ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik....	63
Şekil 4.6.	CYY ile alabalık atıklarında protameks enzimi ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik....	67
Şekil 4.7.	CYY ile mezgıt protameks enzimi ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik.....	71
Şekil 4.8.	CYY ile hamsi protameks enzimi ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik.....	73

Şekil 4.9.	CYY ile alabalık atıklarında flavourenzim ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik.....	77
Şekil 4.10.	CYY ile mezgıt atıklarında flavourenzim ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik.....	81
Şekil 4.11.	CYY ile hamsi atıklarında flavourenzim ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik.....	84
Şekil 4.12.	Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının hidroliz dereceleri (%).....	85
Şekil 4.13.	Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının protein geri kazanımları(%)	87
Şekil 4.14.	Farklı sürelerde hidrolize edilen alabalık atığı protein hidrolizatlarına moleküler ağırlığına Alkali proteaz enziminin etkisi.....	90
Şekil 4.15.	Farklı sürelerde hidrolize edilen mezgıt atığı protein hidrolizatlarının moleküler ağırlığına Alkali proteaz enziminin etkisi.....	91
Şekil 4.16.	Farklı sürelerde hidrolize edilen hamsi atığı protein hidrolizatlarına moleküler ağırlığına Alkali proteaz enziminin etkisi.....	93
Şekil 4.17.	Farklı süre, sıcaklık ve enzim oranı ile hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının molekül ağırlıklarına protameks enziminin etkisi.....	94
Şekil 4.18.	Farklı süre, sıcaklık ve enzim oranı ile hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının molekül ağırlıklarına flavourenzim enziminin etkisi	96
Şekil 4.19.	Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılarak optimize edilen alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının SDS-PAGE profilleri	97

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2.1.	Balık atığının besin ve mineral kompozisyonu.	6
Çizelge 2.2.	Alaska mezzit kası ve iskeletinin kimyasal bileşimleri	6
Çizelge 2.3.	Sarıkuyruk (<i>Thunnus albacares</i>) ve Skip jack Tuna (<i>Katsuwonous pelamis</i>) içorganlarının kimyasal kompozisyon oranları (%).....	7
Çizelge 2.4.	Balık protein hidrolizatı üretiminde kimyasal ve enzimatik hidrolizin karşılaştırılması	12
Çizelge 2.5.	Balık protein hidrolizatı üretmek için kullanılan enzimler.....	14
Çizelge 2.6.	Farklı balıklardan farklı enzimler kullanılarak elde edilen balık protein hidrolizat üretimi.....	16
Çizelge 2.7.	<i>O. keta</i> ve <i>O. gorboscha</i> den elde edilen protein hidrolizatlarının HD(%)	22
Çizelge 2.8.	<i>O. keta</i> ve <i>O. Gorboscha</i> karaciğer verim, protein konsantrasyonu HD(%).....	22
Çizelge 2.9.	Optimizasyon deneylerinde kullanılan faktörler ve koşullar.....	25
Çizelge 2.10.	Yanıt değişkeni olan hidroliz derecesi (HD, Y) için gözlenen değerlerle birlikte bağımsız değişkenlerin gerçek düzeyleri.....	26
Çizelge 2.11.	Hidrolizatların çeşitli proteazlarla hidroliz derecesi.....	28
Çizelge 2.12.	Bağımsız değişkenler ve merkezi kompozit dönebilen tasarım (CCRD)' in içinkullanılan düzeyleri ve enzimatik ön-muamele koşullarının optimizasyonu	28
Çizelge 2.13.	Optimum hidroliz koşulları, RSM için tahmini ve deneysel HD	28
Çizelge 2.14.	Üç Değişkenli Box-Behnken Dizaynı	31
Çizelge 2.15.	Çeşitli balık kaynaklarından üretilen BPH Bileşimleri	31
Çizelge 2.16.	<i>Oncorhynchus keta</i> ve <i>Oncorhynchus gorboscha</i> karaciğer hidrolizatının aktiffraksiyonunun aminoasit kompozisyonu(%w/w)..	35
Çizelge 2.17.	Hamsi eti ve atık hidrolizatlarında toplam a.a değerleri (KM).....	35
Çizelge 2.18.	Balık eti ve atık hidrolizatlarında serbest amino asit değerleri (KM)	36
Çizelge 3.1.	BBD tasarım modelinde bağımsız değişken ve kodlanmış düzeyler...	47
Çizelge 3.2.	Bağımsız değişkenler ve kodlu değişkenler için box-benken dizayn	48
Çizelge 4.1.	Alabalık, mezzit ve hamsi atıklarının kimyasal kompozisyonu (%)... 53	
Çizelge 4.2.	Alabalık, mezzit ve hamsi atıklarının kimyasal kompozisyonu (KM)	54
Çizelge 4.3.	Alabalık atıklarında alkali proteaz enzimi ile gerçek bağımsız değişken seviyeleri ile gözlemlenen değerler tepki değişkeni	54
Çizelge 4.4.	CYY ile alabalık atıklarında alkali proteaz enzimi ile hidroliz	55
Çizelge 4.5.	Alkali proteaz enzimi kullanılarak alabalık atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin RSM lineer model	55
Çizelge 4.6.	Alabalık atıklarında alkali proteaz enzimi kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regresyon katsayıları ve bunların etkileşimleri	57
Çizelge 4.7.	Alabalık atıklarında alkali proteaz enzimi ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen hidroliz derecesi (HD %).....	58

Çizelge 4.8.	Mezgit atıklarında alkali proteaz enzimi ile gerçek bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler tepki değişkeni,	58
Çizelge 4.9.	CYY ile mezgit atıklarında alkali proteaz enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller.....	59
Çizelge 4.10.	Mezgit atıklarında alkali proteaz kullanarak, optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri.....	60
Çizelge 4.11.	Alkali proteaz enzimi kullanılarak mezgit atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu.....	60
Çizelge 4.12.	Mezgit atıklarında alkali proteaz ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen HD (%)	62
Çizelge 4.13.	Hamsi atıklarında alkali proteaz enzimi ile gerçek bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler tepki değişkeni hidroliz derecesi (HD, Y).....	63
Çizelge 4.14.	CYY ile hamsi atıklarında alkali proteaz enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller.....	64
Çizelge 4.15.	Alkali proteaz enzimi kullanılarak hamsi atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD (%)' nin ANOVA tablosu.....	64
Çizelge 4.16.	Alabalık atıklarında protameks enzimi ile gerçek bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler tepki değişkeni (HD, Y)	65
Çizelge 4.17.	CYY ile alabalık atıklarında protameks enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller.....	65
Çizelge 4.18.	Alabalık atıklarında protameks enzimi kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri	66
Çizelge 4.19.	Protameks enzimi kullanılarak alabalık atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında zaman ve enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu.....	66
Çizelge 4.20.	Alabalık atıklarında protameks ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneylerinde gözlemlenen HD (%)	68
Çizelge 4.21.	Mezgit atıklarında protameks enzimi ile gerçek bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler tepki değişkeni, hidroliz derecesi (HD, Y).....	68
Çizelge 4.22.	CYY ile mezgit atıklarında protameks enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller.....	69
Çizelge 4.23.	Mezgit atıklarında protameks enzimi kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri.....	69
Çizelge 4.24.	Protameks enzimi kullanılarak mezgit atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu.....	70
Çizelge 4.25.	Mezgit atıklarında protameks ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen hidroliz derecesi (HD%).....	71

Çizelge 4.26.	Hamsi atıklarında protameks kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri.....	72
Çizelge 4.27.	CYY ile hamsi atıklarında protameks enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller.....	72
Çizelge 4.28.	Protameks enzimi kullanılarak hamsi atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu.....	73
Çizelge 4.29.	Alabalık atıklarında flavourenzim kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri.....	74
Çizelge 4.30.	CYY ile alabalık atıklarında flavourenzim ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller	74
Çizelge 4.31.	Alabalık atıklarında flavourenzim kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri.....	75
Çizelge 4.32.	Flavourenzim kullanılarak alabalık atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu	76
Çizelge 4.33.	Alabalık atıklarında flavourenzim ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen hidroliz derecesi (HD%)	77
Çizelge 4.34.	Mezgit atıklarında flavourenzim kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri	78
Çizelge 4.35.	CYY ile mezgit atıklarında flavourenzim ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller.....	78
Çizelge 4.36.	Mezgit atıklarında flavourenzim kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri.....	79
Çizelge 4.37.	Flavourenzim kullanılarak mezgit atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu	80
Çizelge 4.38.	Mezgit atıklarında flavourenzim ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen hidroliz derecesi(HD%)	81
Çizelge 4.39.	Hamsi atıklarında flavourenzim kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri	82
Çizelge 4.40.	CYY ile hamsi atıklarında flavourenzim ile hidroliz parametrelerinin .. optimizasyonunda önerilen modeller	82
Çizelge 4.41.	Flavourenzim kullanılarak hamsi atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu	83
Çizelge 4.42.	Hamsi atıklarında flavourenzim ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlen HD	84
Çizelge 4.43.	Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezgit ve hamsi atığı hidrolizatlarının hidroliz dereceleri (%).....	85
Çizelge 4.44.	Balık atığı türleri için hidroliz derecelerine göre alkali proteaz, protameks ve flavourenzim' in etkisi (%).....	86

Çizelge 4.45. Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının protein geri kazanımları (%).....	88
Çizelge 4.46. Balık atığı türleri için protein geri kazanımına göre alkali proteaz, protameks ve flavourenzim' in etkisi	88
Çizelge 4.47. Üç farklı enzimle CYY sonuçlarına göre üretilen alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının kimyasal kompozisyonu.....	101
Çizelge 4.48. Farklı enzimlerle CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının toplam amino asit içerikleri (g/100 g).....	103
Çizelge 4.49. Farklı enzimlerle CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen hidrolizatlarının Referans Protein değerlerine göre kimyasal skorlar	106
Çizelge 4.50. Farklı enzimlerle CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının iz element içerikleri (%).....	108
Çizelge 4.51. Farklı enzimlerle hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının iz element içerikleri (mg/kg).....	109

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Alkalaz
AAH	: Alabalık Atığı Hidrolizati
AAHAP	: Alabalık Atığı Hidrolizati Alkali Proteaz Enzimi
AAHFLV	: Alabalık Atığı Hidrolizati Flavourenzim
AAHPMX	: Alabalık Atığı Hidrolizati Protameks Enzimi
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ANOVA	: Varyans Analizi
AP	: Alkali Proteaz
APA	: Alkali Proteaz Alabalık
APH	: Alkali Proteaz Hamsi
APF	: Alaska Mezgiti ve İskeleti
APM	: Alkali Proteaz Mezgit
BBD	: Box-Behnken Dizayn
BHA	: Butillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	: Butillenmiş Hidroksi Toluen
BPH	: Balık Protein Hidrolizati
CCD	: Merkezi Birleşik Tasarım
CYY	: Cevap Yüzey Yöntemi
DH	: Hidroliz Derecesi
DM	: Çözünebilir Kuru Madde
DPPH	: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
EPH	: Yılan Balığı Protein Hidrolizati
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
FPH	: Balık protein hidrolizati
FID	: Alev İyonizasyon Dedektörlü
FLV	: Flavourenzim
FLVA	: Flavourenzim Alabalık
FLVH	: Flavourenzim Hamsi
FLVM	: Flavourenzim Mezgit
HAH	: Hamsi Atığı Hidrolizati
HAHAP	: Hamsi Atığı Hidrolizati Alkali Proteaz
HAHFLV	: Hamsi Atığı Hidrolizati Flavourenzim

HAHPMX	: Hamsi Atığı Hidrolizati Protameks Enzimi
HBH	: Ringa vucüt hidrolizati
HGH	: Ringa gonad hidrolizati
KM	: Kurumadde
MAH	: Mezgit Atığı Hidrolizati
MAHAP	: Mezgit Atığı Hidrolizati Alkali Proteaz Enzimi
MAHFLV	: Mezgit Atığı Hidrolizati Flavourenzim
MAHPMX	: Mezgit Atığı Hidrolizati Protameksenzimi
P	: Papain
PH	: Yüksek Katma Değerli Protein Hidrolizati
PMX	: Protameks
PMXA	: Protameks Alabalık
PMXM	: Protameks Mezgit
PMXH	: Protameks Hamsi
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TBHP	: Yan Ürünleri Hidrolizat Tozu
TCA	: Triklor Asetik Asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Ülkemizde balık atıklarının bir kısmından genellikle biyolojik değeri ve ekonomik değeri düşük balık unu elde edilmektedir. Geri kalanı da değerlendirilmeden kirlilik etmeni olarak çevreye atılmaktadır. Halbuki bu kaynaklar besinsel açıdan değerli, fonksiyonel özelliklere sahip ve kolay sindirilebilir, ekonomik değeri yüksek proteinli ürünlere dönüştürülebilirler. Genel olarak, fileto olarak değerlendirilen balıkların %60-70' ini balık kafaları, deri, pul, kemik, iç organlar ve işlenemeyen et parçaları oluşturmaktadır. Avrupa Birliği, Altıncı Çevre Eylem Planı'nın dört önceliğinden biri olarak atık yönetimi belirlenmiş ve atığın kaynağında önlenmesinin yanı sıra geri dönüşümün teşvik edilmesi, atığın kaynak olarak kullanımı ve ek doğal kaynakların çıkarılması AB atık yönetimi politikalarının ana unsurlarını teşkil etmektedir. Bu nedenle, bu ülkelerde balık işleme atıklarından kullanılabilir gıda ve biyoaktif bileşiklerin çevrilmesi ile ilgili çalışmalara ve ticari üretime ağırlık verilmiştir. Ülkemizde ise bu atıkların çok az bir kısmı hayvan yeminde kullanılmak üzere düşük bir ücretle balık unu üreten fabrikalara satılmaktadır. Fakat buradan elde edilen balık ununun biyolojik değeri oldukça düşüktür. Geriye kalanı ise değerlendirilmeden direkt kirlilik unsuru olarak çevreye bırakılmaktadır.

Hidrolizat; proteinlerin kimyasal veya enzimatik yollarla çeşitli boyutlarda peptitlere ayrılması olarak tanımlanabilir. Protein hidrolizatlarının halk arasında en çok bilineni sporcuların kullandığı "whey protein hidrolizatı" olarak satışa sunulan kas yapıcı özellikteki peynir altı suyu hidrolizatlarıdır. Ülkemizde protein hidrolizatları gıda, kozmetik ve farmakoloji alanında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Balık protein hidrolizatları (BPH) ticari ürün olarak fonksiyonel gıda, hayvansal yem, organik gübre ve evcil hayvan gıdası olarak kullanıldığı gibi BPH' larının içerdikleri nutrasötik özellikteki biyoaktif peptitler ile antihipertensif, antitrombotik, antikanser, immunomodulatör ve antioksidan aktivitesi gösterdikleri için tıp ve farmakoloji alanında da değerlendirilmektedir. Yurt dışında balık atıklarından protein hidrolizatı üreten birçok firma bulunmasına rağmen ülkemizde henüz böyle bir ticari firma bulunmamaktadır. Yapılan bilimsel araştırmalar balıklardan elde edilen protein

hidrolizatlarının besleyici özelliklerinin diğer protein hidrolizatlarından daha dengeli ve üstün olduğunu göstermektedir. Yurt dışında balık protein hidrolizatları birçok endüstriyel uygulamada kullanıldığı için çok sayıda ve markada marketlerde satışa sunulmaktadır. Fakat ülkemizde ticari olarak balık atıklarından protein hidrolizati üreten bir firma bulunmadığı gibi sanayide balık protein hidrolizatlarının kullanımı ile ilgili bir veriye de ulaşılabilmiştir. Dünyada balık protein hidrolizati Avrupa, Hindistan, Uzak Doğu ülkeleri, Amerika ve Avustralya olmak üzere birçok ülkede üretilmektedir.

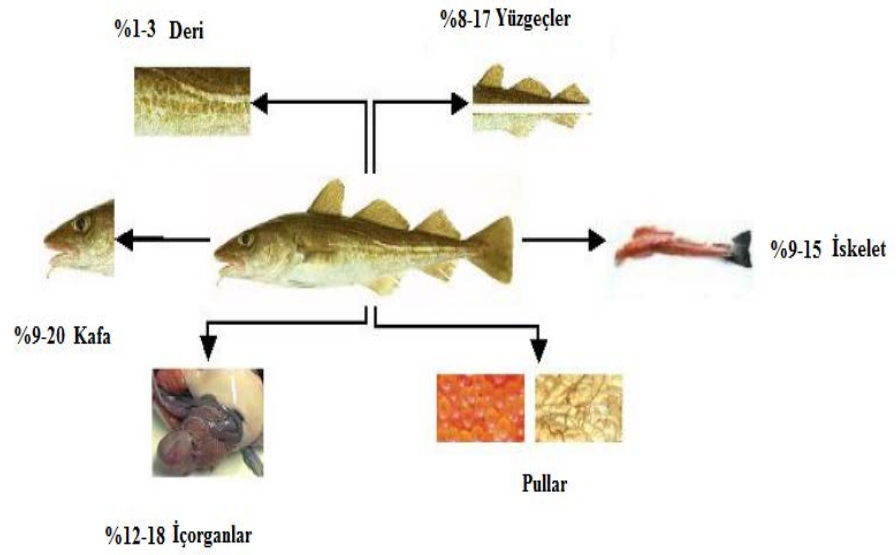
Protein hidrolizi üretmek için kimyasal ve enzimatik olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Kimyasal yöntemde, yüksek sıcaklık (120 °C) ve basınç (100 kPa) altında asit veya alkali koşullar uygulanmaktadır. Bu yöntem daha ekonomik üretim maliyetine sebep olsa da hidrolizatta arzu edilen fonksiyonel özelliklerinin kaybolmasına ve ekipman korozyonuna sebep olduğu için son yıllarda çok tercih edilmemektedir. Enzimatik yöntemde ise, daha düşük sıcaklık, basınç ve 5-8 arası bir pH aralığı kullanıldığı için bu dezavantajların büyük bir çoğunluğu oluşmaz. Bu durum, son zamanlarda enzimatik yöntemle hidrolizat üretimini daha cazip hale getirmiştir (Diniz ve Martin, 1997; Sathivel ve ark., 2005; Slizyte ve ark., 2005). Enzimatik hidroliz ayrıca fizikokimyasal, fonksiyonel ve / veya duyuşsal özellikleri iyileştirmek veya değiştirmek içinde kullanılmaktadır (Althouse ve ark., 1995; Kuipers ve ark., 2005). Balık protein hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri, protein kaynaklarına, kullanılan proteazlara (Sugiyama ve ark., 1991), hidroliz derecesine, reaksiyonun süre ve sıcaklığına (Feng ve Xiong, 2003), ve tampon pH'sına (Doucet ve ark., 2003) göre değişirken, duyuşsal özellikleri ise kullanılan proteolitik enzim türüne ve hidroliz reaksiyon koşullarının etkisine bağılı olarak değişmektedir (Lin ve ark., 1997). Bunlar içerisinde özellikle hidroliz derecesi, bir proteoliz değerlendirme parametresi olarak kullanılmaktadır ve farklı protein hidrolizatlarının karşılaştırılmasında bir gösterge olarak değerlendirilmektedir (Gimenez ve ark., 2009).

Maksimum hidroliz derecesini elde etmek için en ideal üretim koşulları Cevap Yüzey Yöntemi ile belirlenebilmektedir. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY, Responce Surface Methodology), gıda üretimlerinde verimlilik ve optimizasyonu sağılayan matematiksel ve istatistiksel modelleme tekniğinin kullanıldığı etkili bir yöntemdir

(Wangtueai ve Noomhorm, 2009). Bu yöntemde, hedef parametrelerle, istenilen ürün özelliği arasındaki ilişki regresyon denklemiyle tespit edilerek bir model oluşturulur (Cho ve ark., 2004). Bu yöntemin en büyük avantajı, birçok faktörü ve aralarındaki ilişkiyi değerlendirmek için gerekli olan deneme sayısını en aza indirmesidir. CYY yöntemi içinde, iki faktörlü-üç düzeyli Merkezi Kompozit Dizaynı (CCD) ve 3 faktörlü- 3 düzeyli Box-Bekken Dizaynı, sıklıkla karşılaşılan teknikler arasındadır. Balık ve atıklarından protein hidrolizatı üretmek için ticari olarak kullanılan birçok enzim bulunmaktadır. Bromelain (Aspmo ve ark., 2005) ve papain (Hoyle ve Merritt, 1994) gibi bitkisel kaynaklı, kimotripsin, tripsin (Simpson ve ark., 1998) ve pepsin (Viera ve ark., 1995) gibi hayvansal kaynaklı veya alkalaz, nötraz, flavourenzim, protameks ve proteaz N (Kristinsson ve Rasco, 2000a; Guèrard ve ark., 2001; Liaset ve ark., 2002) gibi mikrobiyolojik kaynaklı enzimler balık protein hidrolizatının üretiminde kullanılmıştır. Bu çalışmada, ülkemizde gıda katkı maddesi satan bir firma tarafından üretilen alkali özellikte proteaz enzimi ile uluslararası ticari hidrolizat üretiminde kullanılan protameks ve flavourenzim, alabalık, mezigit ve hamsi işleme atıklarının hidrolizinde kullanılmış ve hidroliz derecesine göre hidrolizasyon, Cevap Yüzey Yönteminde (CYY) Merkezi Kompozit (CCD) ve Box-Bekken (BBD) modeli kullanılarak optimize edilmiştir. Ayrıca, optimizasyondan elde edilen hidrolizatların kalitesi, kullanılan enzim ve balık atığı türleri arasında karşılaştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

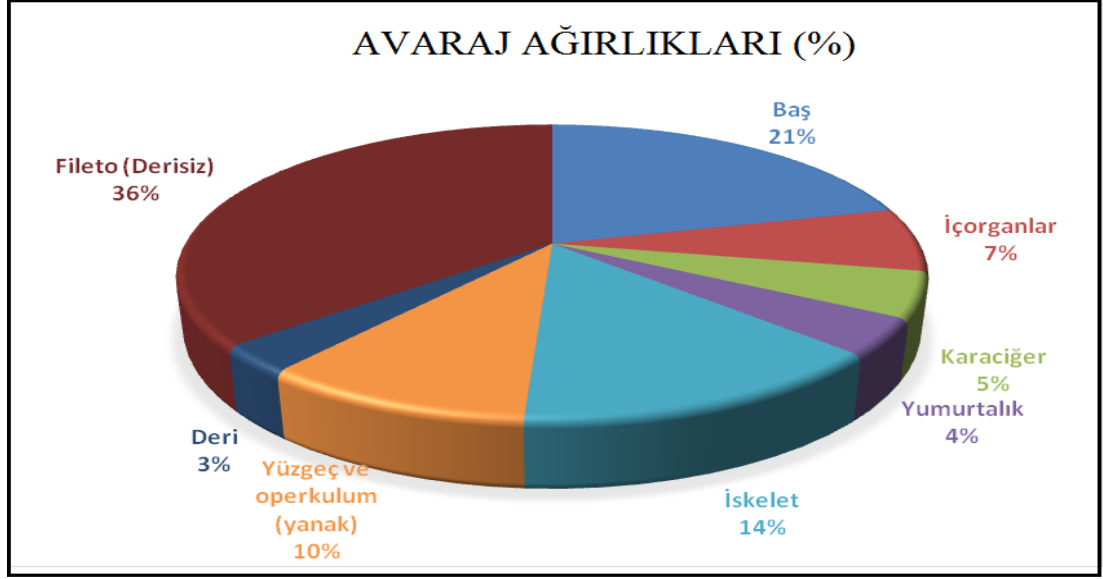
Genel olarak balık atıklarında, değerlendirilemeyen balık ve kabuklu deniz hayvanları, iskelet, yüzgeçler, kafa, deri ve iç organlar bulunmaktadır (Kim ve Mendis, 2006). Bu atıkları oluşturan bileşenlerin miktarı, türü ve oranları yapılan işleme teknolojisi metoduna, balığın türüne ve büyüklüğüne göre değişebilmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Başlıca balık atığı bileşenleri (Dumay, 2006)

Akhtar ve ark. (2017), 400 gr lık tilapianın işlenmesi sonucu elde edilen atığın oluşturduğu bileşenleri %4.42 pul, %1.75 kuyruk, % 7.65 bağırsak, % 3.50 deri, % 19.70 kafa, % 8.68 iskelet ve % 54.34 kasta oluştuğunu bildirmiştir.

Esteban ve ark. (2007) tarafından balık atığının bileşenleri Şekil 2.2’de gösterilmiştir. Buna göre; baş %21, içorganlar %7, karaciğer %5, yumurtalık % 4, iskelet %14, yüzgeç ve operkulum (yanak) %10, deri %3 ve fileto (derisiz) %36 oranında bulunmuştur.



Şekil 2.2. Balık atıklarının bileşenleri (%) (Esteban ve ark. 2007)

2.1. Balık Atıklarının Kimyasal Kompozisyonu

Çoğu balık türü %80 oranında su içermektedir. Bununla birlikte, bazı balık türlerinin su içeriklerinin %30 ile 90 arasında değişmektedir (Murray ve ark., 2001). Balıkların besin kompozisyonu balığın türüne, cinsiyete, yaşa, besinsel statüye, mevsime ve sağlığa göre değişmektedir. Çoğu balık %15-30 protein, %0-25 yağ ve %50-80 nem içerir (Ghaedian ve ark., 1998). Suvanich ve ark. (2006)'na göre kedibalığı, morina, pisi balığı, uskumru ve somon balığının besinsel kompozisyonundaki değişimlerin türlere göre değişiklik gösterdiği ve bu balıklar arasında en yüksek yağ içeriğinin uskumru (%11.7)'da olduğu, en düşük yağ içeriğinin ise morina balığı (%0.1)'nda bulunduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca, yüksek protein içeriğinin 23.5% ile somon balığında tespit edildiği ve en düşük protein içeriğinin ise 14% ile pisi balığında bulunduğunu saptamışlardır. Yine aynı çalışmada, beş farklı balık türünün nem içeriğinin ise %69 ile %84.6 olarak değiştiği bildirilmiştir.

Katı atıklar baş, kuyruk, deri, içorganlar, yüzgeçler ve kemikten oluşurlar. Balık işleme tesislerinden elde edilen atıklar, protein, amino asit, kollajen, jelatin ve yağ gibi katma değeri yüksek ürünler elde etmek için önemli bir kaynak olabilirler (Disney ve ark., 1977).

Estaban ve ark., (2007), balık satışı yapan işletmelerden elde ettiği atıkların besin kompozisyonunu incelemiştir. Buna göre, atıkların besin kompozisyonu protein için

%58, eter ekstraktı veya yağ için %19 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2.1) ve atıkların önemli bir mineral kaynağı olduğunu bildirilmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, balık atıklarında tek doymamış yağ asitleri, palmitik asit ve oleik asit miktarlarının (%22) oldukça yüksek olduğunu bulunmuşlardır.

Çizelge 2.1. Balık atığının besin ve mineral kompozisyonu (Esteban ve ark., 2007).

Besin ögesi	Balık Atığı(%)
Ham protein	57.92
Eter ekstraktı	19.10
Ham Lif	1.19
Kül	21.79
Kalsiyum	5.80
Fosfor	2.04
Potasyum	0.68
Sodyum	0.61
Magnezyum	0.17
Demir	100
Çinko	6
Mangan	1

Roslan ve ark. (2015), tilapia (*Oreochromis niloticus*) atığında %14.60 ham protein, %66.57 nem, 5.50 yağ ve %8.93 kül içerdiğini bulmuşlardır.

Hou ve ark. (2011) tarafından tespit edilen Alaska mezgiti kası ve iskeleti (APF) 'nin kimyasal bileşimleri Çizelge 2.2 'de sunulmuştur. Çalışmada, APF' nin 18.36 g / 100 g protein, 14.89 g / 100 g kül ile zengin bir içeriğe sahip olduğu ve APF'nin kimyasal bileşimlerinin kül içeriği dışında, mezgit kas içeriğine benzer olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 2.2. Alaska mezgit kası ve iskeleti (APF) 'nin kimyasal bileşimleri (g/100 g) (Hou ve ark. 2011)

Bileşenler	İskelet	Kas
Nem	64.0±2.9	76.8±0.3
Ham protein	18.4±0.8	18.8±0.7
Ham yağ	0.7±0.2	0.6±0.05
Kül	14.9±0.07	3.8±0.3
Karbonhidrat	0.2±0.02	0.2±0.01

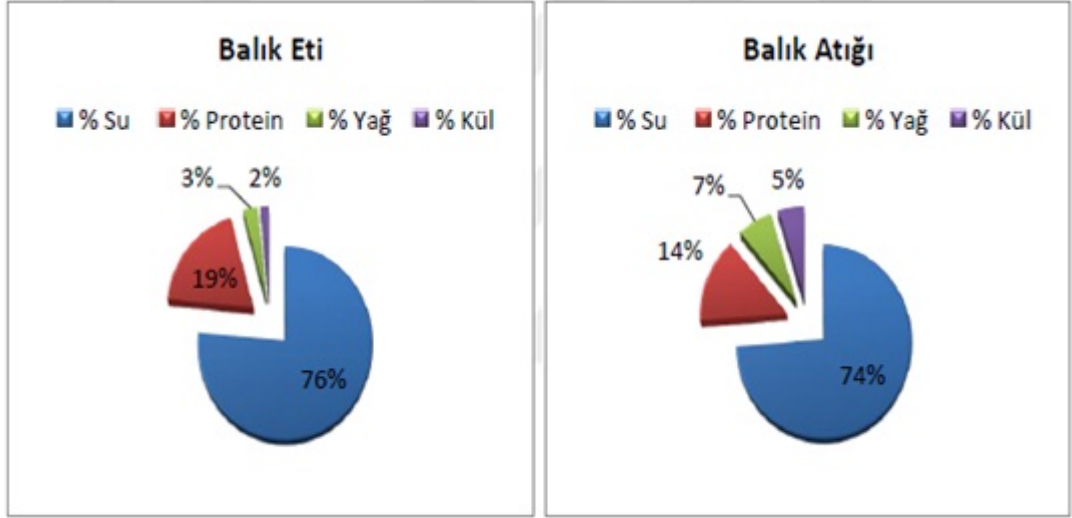
Detkamhaeng ve ark (2016), sarıkuyruk (*Thunnus albacares*) ve Skipjack ton balığı (*Katsuwonous pelamis*)' nin kimyasal kompozisyon oranlarını belirledikleri çalışmada iç organlarının yüksek oranda protein içerdiğini bulmuşlardır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Sarıkuyruk (*Thunnus albacares*) ve Skip jack Tuna (*Katsuwonous pelamis*) İç organlarının kimyasal kompozisyon oranları (%) (Detkamhaeng ve ark 2016)

Bileşenler	Sarıkuyruk	Skipjack
Nem	73.17±0.22	74.51±0.13
Ham protein	10.91±1.10	17.51±0.30
Ham yağ	4.42±0.02	2.60±0.37
Kül	1.8±0.07	1.90±0.20
Tuz	2.18±0.12	2.14±0.07

Nguyen ve ark. (2011) tarafından, sarıkuyruk (*Thunnus albacares*)' un işleme atıklardan baş, kuyruk ve iç organlarının ortalama kimyasal kompozisyon bileşimleri incelenmiştir. Tüm yan ürünlerin önemli oranda su (%58-77) ve protein (%15-17)' den oluştuğu bulunmuştur. Çalışmada en önemli farklılıkların, lipit ve kül içeriği bakımından olduğu saptanmıştır. Buna göre, lipit içeriği iç organ ve kuyruklarda %3.73 olarak bulunurken kafa bölgesindeki lipit oranının en az 3 kat daha zengin (%13) olduğu saptanmıştır. Minerallerin ise iç organlarda %1.9 oranında iken kuyruk bölgesinde %11.8 oranında olduğu belirlenmiştir.

Koç (2016), hamsi etinin makro besin bileşenleri olan su, protein, yağ ve kül değerlerini sırasıyla; %76.35±0.04, %19.20±0.07, %2.82±0.06, %1.60±0.02 olarak tespit etmiştir. Hamsiden et ayrıldıktan sonra kalan ve atık olarak nitelendirilen baş, iç organlar ve omurgadan oluşan kısımda ise besin bileşenlerini, %73.85±0.14 su, %14.54±0.05 protein, %6.60±0.05 yağ ve %5.00±0.07 kül olarak saptamıştır (Şekil 2.3).

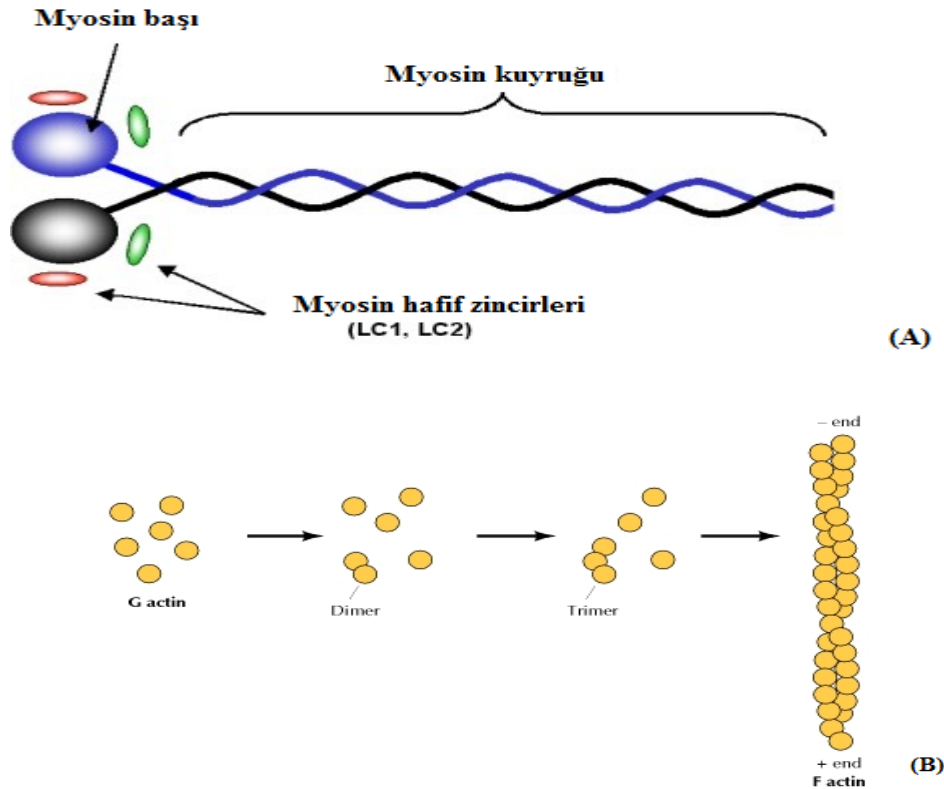


Şekil 2.3. Hamsi etinde ve atıklarında makro besin bileşenlerinin dağılımı

2.2. Balık Atığı Proteinleri

Balık atıklarında önemli miktarda protein bulunduğu bildirilmektedir. Raghavan (2008), balık atığındaki protein miktarının balıktaki toplam proteinin %10-20'sine kadar (ağırlık / ağırlık) bulunabileceğini bildirmiştir. Balıktaki pullar ve deriye ek olarak balık kemiği çok iyi bir kolajen ve jelatin kaynağıdır (Venugopal, 2009b). Balık ve kabuklu deniz hayvanları kas proteinleri sarkoplazmik, miyofibriler ve stroma proteinleri olmak üzere üç ana gruptan oluşur. Sarkoplazmik proteinler (su veya düşük tamponlu çözeltilerde çözülebilir), sarkoplazmada mevcut olan, yaklaşık olarak toplam kas dokusu proteininin %15-35'ini kapsar. Bu proteinler esasen enerji ile ilişkili kreatin kinaz, aldolaz, gliseraldehit ve 3 fosfat dehidrojenaz gibi enzimlerden oluşur (Ladrat ve ark., 2003; Varelziz, 2000). Türlerle bağlı olarak miyoglobin ve hemoglobin gibi pigmentli proteinler suda çözünür protein sınıfında bulunabilirler. Sarkoplazmik proteinlerin içeriği ve bileşimi türler arasında değişiklik gösterebilir. Örneğin bazı yumuşakçalarda hemoglobin yoktur (Belitz ve ark., 2004). Ayrıca, balıklar ve memeli sarkoplazmik proteinleri arasında kompozisyon içerikleri bakımından da farklılıklar görülebileceği bildirilmiştir (Belitz ve ark., 2004). Örneğin balık miyoglobini sistein amino asitini içerirken, buna karşılık memeli miyoglobini bu aminoasiti içermemektedir.

Myofibriller proteinler, yüksek tuzlu çözeltilerde çözünen yapısal proteinlerdir. Bu proteinlerin oranı balık kaslarındaki toplam proteininin %65-75'ini kapsar (Venugopal, 2009b). Yapısal proteinler içerisinde en çok orana sahip olan aktin ve miyozin, kasların kasılmasından sorumlu iki kas proteindir. Myosin yapısal proteinlerin %50 ile %58 arasında kapsarken aktin %15-20 arasında kapsamaktadır (Vareltzis, 2000). Myosin iki ağır (223 kDa) ve iki hafif zincir (22 ve 18 kDa) içeren büyük bir moleküldür. Molekül hafif zincirleri içeren bölgeler ve ağır zincirlerin önemli bir kısmı iki tane aynı küresel kafa yapısına sahiptir. Kuyruklar, ağır zincirlerin çok uzun α -heliks oluşturduğu birbirini saran sarmallar oluştururlar (Şekil 2.4.A). Aktin iki şekilde oluşur: küresel monomer G-aktin ve miyozine bağlanan büyük bir polimer olan F-aktin dir. İnce filamentler kas kasılmasını düzenleyerek çok önemli bir rol oynar (Şekil 2.4.B). Diğer kasılma ile ilişkili yapısal ve düzenleyici proteinler ve miyofibriller proteinleri, tropomyozin, troponin, aktinin, desmin, nebülün ve C ve M proteinleridir.



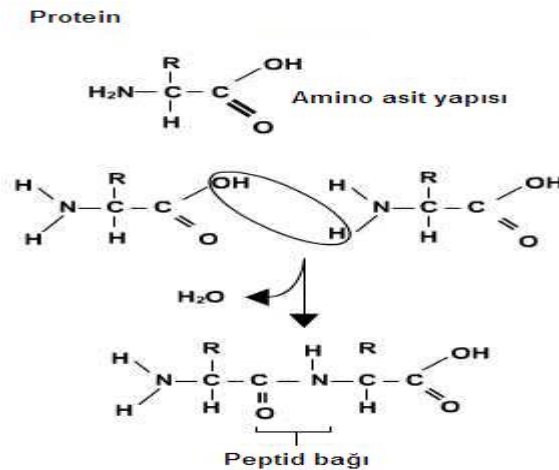
Şekil 2.4. Myosinin (A) (Blaber, M., 2001) ve aktinin (B) yapısal şekli (Anonim, (2006).)

Ağırlıklı olarak kolajen, geri kalan kısmı elastin ve jelatinden oluşan bağ dokusu veya stroma proteinleri, ortalama olarak toplam kas proteininin %3'ünü oluşturur

(Belitz ve ark., 2004; Venugopal, 2009b). Ancak, köpekbalığı, ışın ve kaykay gibi kıkırdaklı balıklar, %10'a varan oranlarda bağ doku proteinlerini içerebilirler. Balık derisi, kemikler ve pullardaki kollajen, kas dokuda da, önemli bir yapısal proteindir (Kim ve Mendis, 2006). Bu üçlü sarmal protein ve kısmen hidrolize edilen sargılı form olan jelatin, polar olmayan glisin, valin, alanin, prolin ve hidroksiprolin amino asitleri açısından zengindir (Kim ve Mendis, 2006; Vercruyssen ve ark., 2005). Hidrofobik amino asitlerinden prolin, lipid peroksidasyonunun ve anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE)' in önlenmesinde önemli rol oynar (Byun ve Kim, 2001; Mendis ve ark., 2005).

2.3. Balık Protein Hidrolizat Üretimi

Hidroliz, su kullanılarak iki molekül arasındaki bağlantının kopduğu bir işlemdir. Proteinler, hidrolize edilirken daha küçük peptitlere ve serbest amino asitlere hidroliz olurlar. Şekil 2.5'de bir dipeptitin iki serbest amino aside hidrolizi gösterilmiştir (Anonim, 2009). Hidroliz işlemine hammaddenin kompozisyonu, enzim tipi, su, endojen enzimlerin inaktivasyonu, pH, sıcaklık ve zamanın etkili olabileceği öne sürülmektedir (Kristinsson ve Rosco, 2000; He ve ark., 2003; Chalamioh ve ark., 2012).



Şekil 2.5. Bir dipeptitin iki serbest amino aside hidrolizi (Anonim, 2009)

Hidroliz hem kimyasal hem de enzimatik olarak gerçekleştirilebilir. Kimyasal hidroliz için asit veya baz kullanırken, enzimatik hidroliz enzimler tarafından

katalizlenir. Kimyasal hidroliz, basit ve nispeten ucuz bir metot olduğu için yaygın olarak gıda endüstrisinde uygulanmaktadır. Öte yandan, enzimatik hidroliz ile karşılaştırıldığında prosesi kontrol etmek genellikle zordur ve ayrıca aşırı pH, basınç ve sıcaklık kullanıldığı için besinsel kalite azalmakta ve tutarsız fonksiyonel özelliklere sebep olabilmektedir (Slizyte, 2004). Diğer dezavantajları ise; sindirimin ardından nötralizasyon için aşırı miktarda NaCl kullanımı, esansiyel amino asit triptofanın tahribatı ve lezzet arttırıcılar olarak hidrolizatların kısıtlı kullanımına sebep olması sayılabilir (Hordur ve ark., 2000). Asit hidrolizi alkaliden daha popülerdir. Çünkü alkali hidroliz için kullanılan kimyasallar, çoğunlukla hidrolizin besleyici değerine ve fonksiyonel özelliklerine olumsuz etki ederler. Enzimatik hidroliz, hidrolizin besinsel kalitesi ve fonksiyonel özellikleri bakımından daha iyi kaliteye sahip olduğu için gelecekte daha popüler olacağı düşünülmektedir (Slizyte, 2004; Hordur ve ark., 2000).

İlk ticari balık protein hidrolizatları, 1940' larda İsveç'te kimyasal yöntem kullanılarak üretilmiştir (Kristinsson ve Rasco, 2000). Bu yöntemde, balık proteini, yüksek sıcaklıkta (121 °C) ve yüksek basınç (100 kPa) altında asidik veya alkali muamele ile değişken moleküller ağırlıklarına sahip peptitlere bölünmüştür (Sanmartin ve ark., 2009). Kimyasal hidroliz, yüksek protein geri kazanımı, hızlı işleme ve düşük maliyet nedeniyle her ne kadar daha popüler olsada, bahsedilen fizikokimyasal ve biyoaktif işlevselliklerinde zayıflığa neden olduğu için hidrolizat kalitesini kontrol etmek oldukça zordur. Bu dezavantajlar, kimyasal yöntemle elde edilen protein hidrolizatlarının yiyecek, içecek ve ilaç sektöründe kullanımını önemli derecede sınırlandırmaktadır. Günümüzde kimyasal yöntemle elde edilen hidrolizatlar, sadece gübre (Kristinsson ve Rasco, 2000) ya da laktik asit bakterilerinin gelişimi için azot kaynağı gibi düşük değerli ürünler için kullanılmaktadırlar (Gao ve ark., 2006).

Balık işleme atıkları uygun şekilde ele alındığında, yüksek kaliteli balık unu, balık yağı ve ensilaj yapılabilir. Balık protein hidrolizat üretimi (FPH) ile elde edilen hidrolizat geleneksel balık unu üretimi ile karşılaştırıldığında, birçok farklı amaçla kullanılacak özelliklere sahip bir ürün elde edildiği için katma değeri yüksek bir ürün haline dönüştürülür (Hordur ve ark., 2000).

Yüksek katma değerli protein hidrolizatlarını (PH) üretmek için iyi tanımlanmış protein hidrolizatları enzimatik yöntemle üretilmiştir. Proteinler kolaylıkla hafif sıcaklık ve pH koşullarında deaktive edilir. Üreticinin arzu edilen nihai ürüne dayalı en iyi ürünü elde etmek için farklı kaynaklardan gelen çeşitli enzimlerin kullanımına olanak sağlanmaktadır (Pasupuleti ve Braun, 2010). Örneğin, enzimler sistematik olarak amino asitleri N- veya C- ucundan çıkarmak için kullanılabilir (Sanmartin ve ark., 2009). Çizelge 2.4’ de kimyasal ve enzimatik hidrolizin karşılaştırılması verilmiştir.

Çizelge 2.4. Balık protein hidrolizatı üretiminde kimyasal ve enzimatik hidrolizin karşılaştırılması (Kristinsson ve Rasco, 2000; Sanmartin ve ark., 2009).

Hidrolizat Yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Kimyasal Yöntem (asit ve alkali)	Yüksek protein geri kazanım Kısa işlem süresi Düşük işleme maliyeti	Acılık Kötü fonksiyonel özellikler Yüksek tuz içeriği Metallerin metal aşındırması Tepkimenin zor kontrolü lysino-alanin gibi toksik maddeler oluşturması İnsanlar tarafından emilmeyen D-amino asitlerin oluşumu
Enzimatik Yöntem	Daha az acı hidrolizat üretimi Fonksiyonların ve besleyici değerlerin korunması Son üründe düşük tuz içeriği Homojen hidrolizat üretimi	Yüksek işleme maliyeti Uzun işlem süresi

2.4. Enzimatik Hidroliz

Enzimler, aktivasyon enerjisini düşürerek hücre içindeki kimyasal reaksiyonları hızlandıran biyokimyasal katalizörlerdir. Enzimler oldukça spesifik aktif bölgeler ile substrat arasında kompleks oluştururlar. Enzim olmadan, reaksiyonun tamamlanması çok uzun zaman alabilir ya da hiç yer almaz. Enzimler, gıda endüstrisinde istenilen reaksiyonun katalizlenmesinde ve yüksek değerli ürünlere dönüştürülmesinde büyük oranlarda kullanılmaktadır (Hordur ve ark., 2000). Örneğin rennin enzimi süttten peynir yapmak için kullanılır. Proteolitik enzimler, ekonomik olarak en önemli enzim gruplarıdır (Hordur ve ark., 2000). Proteolitik enzimlere proteazlar, proteinazlar ve peptitazlar da denir (Neil ve ark., 2013). Özelliklerine bağlı olarak proteolitik enzimler, değişen sekanslar ve uzunluklardaki peptitleri veren iki amino asit arasındaki peptit bağıını koparırlar. Endopeptitazlar, peptit zincirindeki peptit

bağlarını parçalayıp büyük peptitler üretirken, ekzopeptitazlar zincirin sonundaki peptit bağlarını parçalayarak dipeptitler ve serbest amino asitler oluşturular (Neil ve ark., 2013). Enzimler, aynı zamanda aktif bağlantı bölgelerine görede sınıflandırılabilirler. Örneğin sistein endopeptitazları, aktif bölgelerinde oldukça reaktif bir sistein kalıntısı içerirler (Neil ve ark., 2013). Proteinlerin enzimatik hidrolizi, zaten hammadde içinde mevcut olan endojen enzimlerle veya ticari enzimlerin eklenmesiyle gerçekleştirilebilir. Endojen enzimler, proteini çözüdürmeye ve hidrolizatı arttırmaya yönelik ticari enzimlere göre daha fazla hidroliz işlemi verimli olabilirler (Pastoriza ve ark., 2003). Karaciğer ve bağırsak gibi hammadde fraksiyonları yüksek endojen proteolitik aktiviteye sahiptirler (Hultman, 2004). Endojen ve ticari enzimlerin eşzamanlı kullanımı, daha yüksek hidrolizat verimlerinde tek başına ticari enzim kullanmasından daha yüksek verim alınmasına sebep olabilirler (Slizyte ve ark. 2005). Bununla birlikte, ticari enzimlerin tek başına kullanılması, elde edilecek ürünün özelliklerini kontrol etmede daha etkili olacaktır (Mohr, 1977). Kontrollü ve yeniden üretilebilir işlemler son derece önemlidir ve bu nedenle hammadde türüne göre endojen enzimler önce etkisiz hale getirilir ve ticari enzimlerin eklenmesi bundan sonra gerçekleştirilir.

Proteazlar hayvan, bitki ve mikrobiyolojik kaynaklardan türetilmektedir. Bazı bitki kaynaklarından ekstrakte edilen enzimler arasında papain, bromelain ve keratinaz sayılabilir. Hayvanlardan ekstrakte edilen enzimler arasında ise tripsin, kimotripsin, pepsin ve renin sayılabilir. Bitki ve hayvan proteazlarının pazardaki mevcut talebi karşılayamaması nedeniyle, mikrobiyal proteazlara olan talebin artması da söz konusudur (Rao ve ark, 1998; Kristinsson ve ark., 2000). Bakteriyel proteazlar sıklıkla protein hidrolizatının üretiminde kullanılır. Bunlar esasen nötr veya alkalidir ve *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilirler. Nötr proteazlar, 5-8 pH aralığında aktiftir ve düşük sıcaklık toleransına sahiptir. Alkali proteazlar, 7-10 pH aralığında aktiftir ve geniş özgüllüğe sahiptir (Rao ve ark., 1998).

Protein hidrolizatları üretmek için çok çeşitli ticari enzimler kullanılmıştır ve bunlar alkalaz (subtilisin), bromelain, kimotripsin, katapsin, Corolaz 7089, Korolaz PP, Denazyme AP, fisain (ficin), Flavourenzim, pankreatin, papain, pepsin, plazmin, Protameks R, Proteinaz K, Proteks 6L, Nötraz, Seabzyme, termolizin, tripsin ve birkaç diğer proteaz bitkilerden, mikroorganizmalardan ve hayvan dokularından

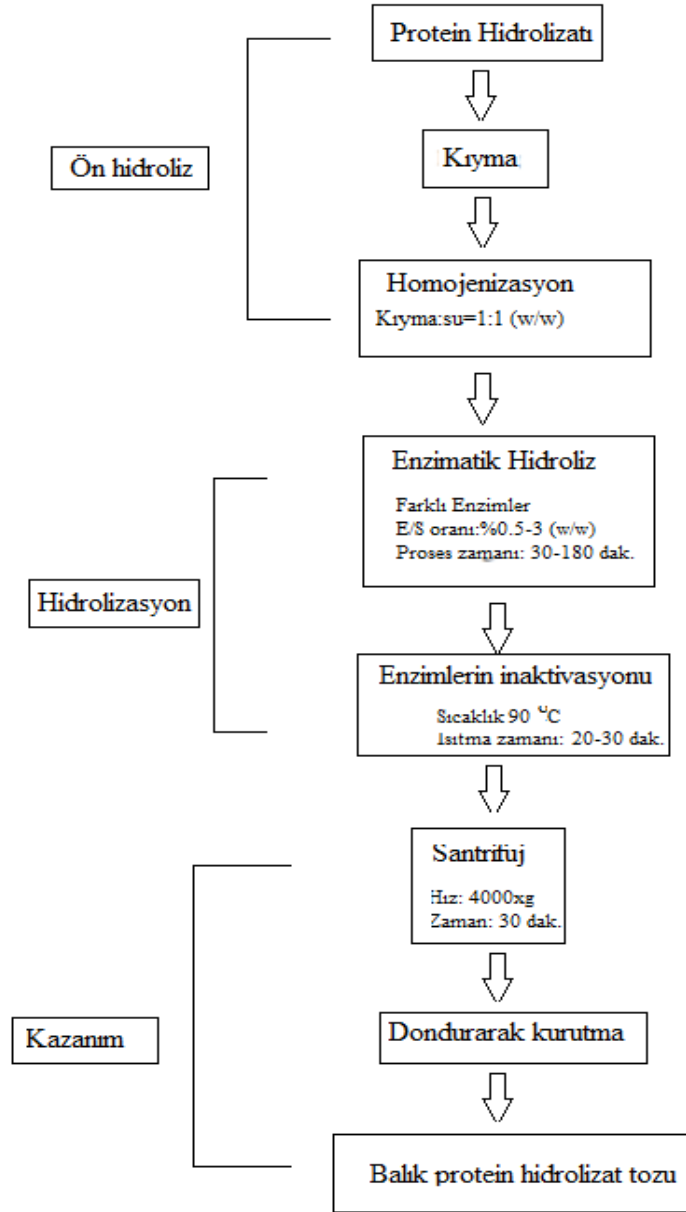
türetilmiştir (Hordur ve ark., 2000 ; Slizyt'e, 2004; Five, 2012; Carjaval., 2013; Tveit, 2014; Hordur ve ark., 2000; Rustad ve ark., 2011). Alkalaz, deterjan endüstrisi için Novo Nordisk (Bagsvaerd, Danimarka) tarafından geliştirilen *Bacillus licheniformis*'den üretilen bir alkali enzimdir. Bu enzimin, balık protein hidrolizatını hazırlamak için kullanılan en iyi enzimlerden biri olduğu kanıtlanmıştır (Sugiyama ve ark, 1991; Benjakul ve ark., 1997). Shahidi ve ark. (1995), alkalaz tarafından üretilen balık protein hidrolizatının daha iyi fonksiyonel özelliklere, çok iyi bir azot verimi ile yüksek bir protein içeriğine, kasın içerdiği amino asit kompozisyonuna benzer ve nötraz gibi diğer enzimlere kıyasla daha yüksek bir besleyici değere sahip olduğunu belirtmişlerdir (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Balık protein hidrolizatı üretmek için kullanılan enzimler (Vercruyssen ve ark., 2005; Xu ve ark., 2011)

Enzimler	Orijini	Özgünlük
Alkalaz	<i>Bacillus licheniformis</i>	Dar, esas olarak hidrofobik aminoasitler için
Nötraz	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Dar, başlıca Leu ve P için
Papain	<i>Papaya</i>	Geniş, endoproteaz
α -Kemotripsin	<i>Bovine pancreas</i>	Treonin, Triptofan, Fenilalanin, Lösin C-terminalinde
Flavourenzim	<i>Aspergillus oryzae</i>	Endoproteaz ve Ekzoproteaz karışımı

2.4.1. Enzimatik Hidrolizin Üretim Basamakları

Enzimatik hidrolizle balık protein hidrolizatı üretiminde üç ana işlem basamağı kullanılmaktadır. Bunlar; ön hidrolizasyon, hidrolizasyon ve geri kazanım aşamasıdır. Şekil 2.6' da, enzimatik yöntemle balık protein hidrolizatı üretmek için kullanılan akış diyagramı gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Enzimatik yöntemle balık protein hidrolizatı üretmek için kullanılan akış diyagramı (He ve ark., 2013)

2.4.1.1 Ön Hidroliz

Ön hidrolizasyon basamağının amacı, sonraki basamakta olan hidrolizasyon aşaması için homojen hale getirilmiş düşük yağ içeriğine sahip su-kıyma karışımları hazırlamaktır. Bu nedenle, hidroliz aşamasından önce ticari enzimler eklenmeden, kıyılmış hammadde su ile karıştırılır. Bu, enzimlerin substrata kolay erişmesini sağlar. Bu işlem sediman fazındaki çözünür bileşenlerin geri kazanımını sağlayarak hidrolizat verimini artırır ve proteinin artmasına neden olur (Slizyte ve ark., 2005a;

Slizyte ve ark., 2005b.) Slizyte ve ark., (2005b), kullanılan enzim türünden daha ziyade fazla su eklemenin verimi daha iyi etkilediğini belirtmiştir. Bunun olumsuz tarafı, yağ veriminin düşmesi ve emülsiyonun artmasına neden olmasıdır (Slizyte ve ark., 2005a; Slizyte ve ark., 2005b). Bununla birlikte, ilave edilen su daha sonra, kurutma veya daha sonra konsantre etmek gibi suyun uzaklaştırılması için ek işlemlerin yapılmasını zorunlu hale getirmektedir. Bu şekilde, hidroliz maliyeti hem endojen enzimlerin inaktivasyonu ile hem de su ve ticari enzimlerin eklenmesiyle artar ve bu faaliyetlerin gerekliliği, arzulanan ürünün kalitesiyle bağlantılı olarak belirlenmelidir. Benjakul ve Morrissey (1997) adlı araştırmacılar, balık atıkları öğütüldükten sonra eşit miktarlarla (ağırlık/ağırlık) su ile karıştırılarak homojen bir su-kıyma bulamacı elde etmişlerdir. Araştırmacılar ürüne daha fazla su eklemenin protein geri kazanımını arttırmadığını, ancak suyun azaltılmasının protein hidrolizatlarının su uçurma oranının azaltılmasına sebep olacağını öne sürmüşlerdir.

2.4.1.2. Hidrolizasyon

Hidrolizasyon için seçilen enzim, ön işlem basamağından sonra elde edilen sulu bulamaç içine homojen bir şekilde karıştırılır. İşleme sıcaklığı ve pH, seçilen enzimin optimal değerlerine göre ayarlanır. Hidroliz, yaklaşık 30 dakika süre ile enzimleri 90 °C'de inaktif ederek son bulur. Balık protein hidrolizatı üretmek için çeşitli çalışmalarda kullanılan enzimlerin menşei ve özgünlüğü Çizelge 2.6' da sunulmuştur (He ve ark., 2013)

Çizelge 2.6. Farklı balıklardan farklı enzimler kullanılarak elde edilen balık protein hidrolizat üretimi

Balık Türleri	Uygulanan Enzim	Sonuç	Kaynaklar
Köpek balığı	Alkalaz	Enzimatik proses protein fonksiyonlarının geliştirilmesinden sorumlu tutmuştur. Bununla birlikte, aşırı Hidrolizasyondan dolayı fonksiyonel özelliklerde azalma görülmüştür	Diniz ve Martin, 1997
Kırmızı somon	Alkalaz	1. En yüksek Hidroliz Derecesine (HD) ulaşılmasına dayalı optimum işlem şartı belirlenmiştir. (E / S =%5.2, sıcaklık 57 °C, işleme süresi 2 saat ve PH 8.0, HD için% 17.2 idi) 2. En yüksek HD ile hidrolizatlar en iyi çözünürlüğe sahipti, ancak yağ bağlama kapasitesi düşük çıkmıştır.	Gbogouri ve ark., 2004

Çizelge 2.6' nın devamı

Pasifik mezgiti	Alkalaz Nötraz	En yüksek HD'ye ulaşılmasına dayalı optimal işlem şartı belirlendi. Alkalaz kullanılarak: E / S = 20 AU / kg hammadde, işleme süresi 1 saat, sıcaklık 55 °C substrat / tereyağı = 1: 1 (w / v)	Benjakul ve Morrissey, 1997
Mersin balığı	Alkalaz	En yüksek HD'ye ulaşılmasına dayalı optimal işlem şartı belirlenmiştir. E / S = 0.1 AU / g protein, 205 dakika işlem süresi, 55 °C sıcaklık ve %61.96 en yüksek HD ile.	Ovissipour ve ark., 2009
Ot sazanı	Alkalaz	Hidrolizatların düşük HD'de yağ bağlama kapasitesi ve emülsiyon yapma kapasitesi daha iyi, yüksek HD kapasitesi daha iyi su tutma özelliği göstermiştir.	Wasswa ve ark., 2007
Ringa	Alkalaz Papain	1. Alkalaz hidrolizatların papain hidrolizatlarına göre aynı işleme koşullarında daha yüksek HD bulunmuştur. 2. Papain hidrolizatlar alkalaz hidrolizatlardan daha acı	Hoyle ve Merritt, 1994
Kapelin	Alkalaz Nötraz Papain	1. Alkalazla en iyi HD'yi elde edilmiştir 2. Et modeli sistemlerinde hidrolizatların (%3'e kadar) eklenmesi pişirme veriminde %4'lük bir artışa neden olmuştur ve %17.7 -%60.4 oranında oksidasyon inhibisyonu sağlanmıştır	Shahidi ve ark., 1995
Dil balığı	α Kimotripsin	Metionin-Isolisin-fenilalanin-Prolin-Glisin-Alanin-Prolin-Glutamikasit-Lösin' in bir peptiti, en yüksek ACE engelleyici olmuştur.	Jung ve ark., 2006
Palamut	Proteaz N	Yaklaşık 1400 Da ağırlığındaki moleküllü hidrolizatlar, daha güçlü bir anti-oksidatif aktiviteye sahiptir 900 ve 200 Da'dan daha fazla.	Wu ve ark., 2003

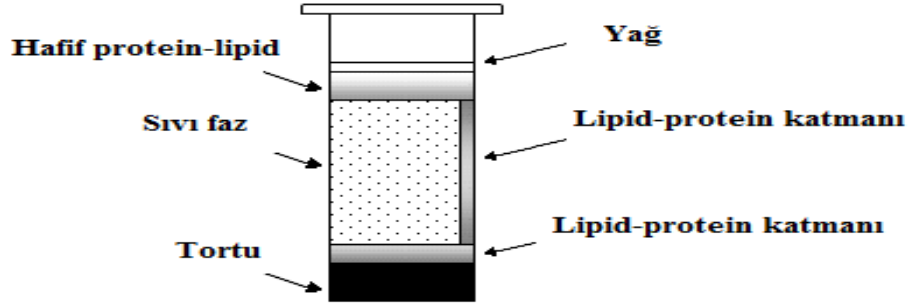
Pepsin gibi pH değeri asidik olan enzimler düşük pH da mikrobiyal büyümeyi engelleyebilir. Ancak asidik pH atmosferi aşırı hidrolizasyona sebep olduğu için proteinin geri kazanımının düşük olmasına, triptofan amino asitinin yıkımına, zayıf fonksiyonel özelliklere ve besinsel kalitenin düşük olmasına yol açarlar (Kristinsson ve Rasco, 2000). Bu nedenle, optimum nötr seviyeye yakın pH değerine reaksiyona sahip enzimler olan alkalaz, nötraz ve flavourenzim günümüzde daha kapsamlı olarak kullanılmaktadır. Hayvansal veya bitkisel kökenli enzimlere kıyasla, mikrobiyal enzimler daha avantajlıdır. Teknik ve ekonomik açıdan bakıldığında, mikrobiyal enzimler örneğin alkalazın, balık proteinlerinden hidrolizat üretiminde alkali pH'da çalışan en verimli enzim olduğu bildirilmiştir. Enzimler ve protein

hidrolizatlarının fonksiyonları arasındaki etkileşimin ayrıca balık türlerine göre değiştiği saptanmıştır (Herpvei ve ark., 2011).

Hidroliz işleminin etkinliğini gösteren hidroliz derecesi (HD), peptit bağlarının parçalanma yüzdesi olarak tanımlanmıştır. Şimdiye kadar hidrolizasyonun en etkili göstergesi HD(%) olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, protein geri kazanımı için parçalanmış peptit bağlarının daha yüksek olması, HD(%)'nin yükselmesine neden olduğu saptanmıştır. Daha küçük molekül ağırlığına sahip proteinlerin suda daha fazla çözünürlüğü, böylece hidrolizatın protein geri kazanımının artarak fonksiyonel özelliklerini daha kullanılabilir hale getirdiği bildirilmiştir. Kısaca yapılan çalışmalar, hidrolizatların fonksiyonel özellikleri ile HD(%) arasında bir korelasyon oluşturduğunu göstermiştir (Adler-Nissen, 1979; Shahidi ve ark., 1995).

2.4.1.3. Geri kazanım

Hidrolizasyonun üretim basamağının son aşamasında, protein hidrolizatları toz haline getirilir. Balık protein hidrolizatlarının sıvı formları yüksek su içeriğine sahip olduğundan bakterilerin kolayca çoğalmasına olanak sağlarlar ve bu nedenle çabuk bozulabilirler. Balık protein hidrolizatlarının toz hali, taşınması daha hafif ve kolay olması açısından sıvı formdan daha uzun süre saklanabilirler. Geri kazanım için sıvı hidrolizat solüsyonu 20 dakika boyunca 4000 g'de santrifüj edilerek üç faza ayrılır: üstte yağ tabakası, hemen altında hafif protein lipit tabakası ortasında hidrolizat solüsyonu ve altta bir yarı katı katman bulunmaktadır (He ve ark. 2003). Şekil 2.7' de sıvı protein hidrolizatı elde edildiğinde ortaya çıkan fazlar gösterilmiştir (Kristinsson ve Rasco, 2000).



Şekil 2.7. Sıvı protein hidrolizatı elde edildiğinde ortaya çıkan fazlar (Kristinsson ve Rasco, 2000)

Liaset ve ark., (2000), nötraz, alkalaz, pepsin ve kojizyme kullanarak dört farklı enzimle *Gadus morhua* ve *Salmo salar* balık gövdelerinden protein hidrolizatı üzerine araştırma yapmışlardır. Çalışmada, 120 dakika hidroliz sonrasında alkalaz ile işleme tabi tutulan somon ve pepsin ile işleme tabi tutulan morina için sırasıyla %67.6 ve %64 ile en yüksek protein geri kazanımı elde edilmiştir.

Shahidi ve ark., (1995), alkalaz, nötraz ve papain kullanılarak kapelin (*Mallotus villosus*)' den protein hidrolizatının ekstraksiyonu üzerine araştırma yapmışlardır. Ekstraksiyon solüsyonu ayrıca otolitik hidrolize tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar, otolitik hidroliz verimi ile karşılaştırıldığında ticari enzimlerle elde edilen protein geri kazanımlarının %22.9 %51.6-70'e ulaştığını ortaya koymuştur. Alkalaz hidrolizi, diğer enzimlere kıyasla en yüksek protein geri kazanımını göstermiştir.

Endojen enzimlerin, suyun, alkalaz ve lesitaz ultra enzimlerin başlangıçtaki inaktivasyonunun morina (*Gadus morhua*) protein ve yağının verimi üzerindeki etkileri Slizyte ve ark. (2005a) tarafından araştırılmıştır. Sonuçlar, hammaddenin ilk ısıtmasının bileşimini değiştirdiğini ve endojen enzimleri inaktive ettiğini ortaya koymuştur. Balık protein hidrolizatının verimi, fosfolipitler ve diğer polar lipitler gibi yüksek lipit miktarlarına sahip bulunmuştur. Araştırmada alkalaz, su ilavesi ile kaliteli protein ve yağ üretmiştir.

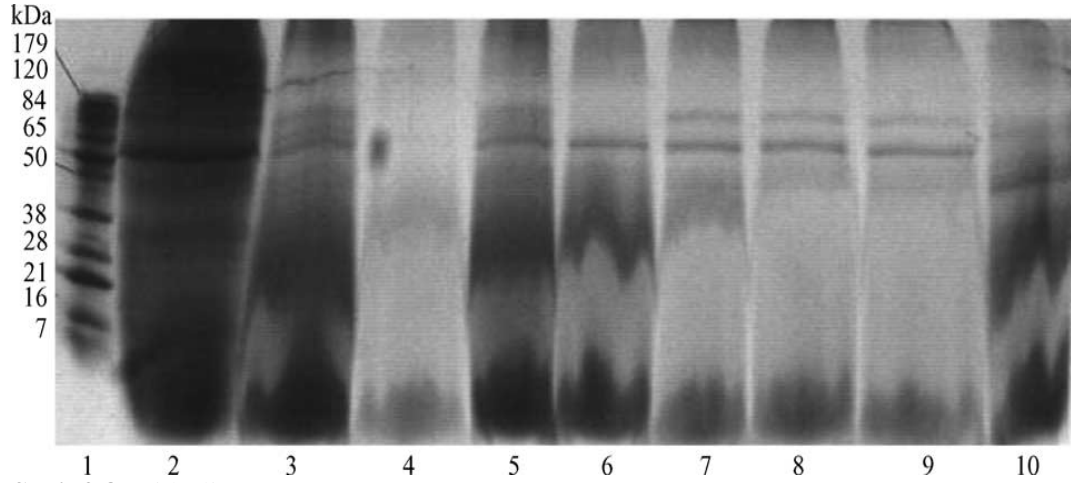
Guerard ve ark., (2001), sarıkuyruk orkinos (*Thunnus albacores*) atıklarından alkalaz enzimi kullanarak protein hidrolizatı elde etmişlerdir. Dondurularak kurutulmuş

protein hidrolizatında, *E. coli*, *L. casei*, *S. Cerevisiae*, *S. odorus*, *P. roqueforti* ve *A. niger* gibi mikrobiyal kültürler azot substratı olarak kullanılmıştır.

Enzimatik hidroliz, düşük ticari değere sahip olan, ancak Diniz ve ark., (1997), tarafından yüksek kaliteli protein için potansiyel bir kaynak olan Atlantik dikenli köpekbalığı (*Squalus acanthias*) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Köpekbalıkları atıklarından protein ekstraksiyonu için optimize edilmiş değişkenler, 35 °C'lik bir sıcaklık, 23.8 saatlik reaksiyon süresi, 171 rpm'lik dönüş hızı ve %1.5'lik bir enzim: substrat oranı olarak bulunmuştur.

Baek ve ark., (1995), alkali proteaz kullanarak tatlı su ıstakozu işleme yan ürünlerinin proteinlerinin ekstraksiyonu üzerine araştırmaya yapmışlardır. Enzimatik hidroliz için en uygun koşullar, 65 °C'lik bir sıcaklık, 8-9'luk pH, 2.5 saatlik reaksiyon süresi ve %0.3'lük bir enzim konsantrasyonu bulunmuştur. Maksimum protein verimi %75 olarak belirlenmiştir.

Aspmo ve ark., (2005), morina (*Gadus morhua*) içorganları, endojen enzimler tek başına ya da yedi farklı ticari proteazlardan biri ile kombinasyon halinde (Alkalaz 2.4L, Nötraz 0.8L, Protameks TM, Papain, Bromelain, Aktinidin ve bir bitki proteaz karışımı) hidroliz etmişlerdir. Hidroliz reaksiyonları, taze eritilmiş iç organ başlangıç sıcaklık gradyanı kullanılarak ve enzimlerin ısı inaktivasyonu ile çeşitli zaman noktalarında sona erdirilmiştir. Hidrolizatlar çözünebilir kuru madde (DM), bulanıklık, amino gruplarının konsantrasyonu ve peptit molekül ağırlığı dağılımı ile incelenmiştir. Çalışma sonucunda, yüksek konsantrasyonda alkalaz ile hidrolizlerde % 95'e yaklaşan en yüksek çözünür kuru madde verimi elde edilmiştir. Ayrıca, 24 saat sonra hidrolizatların sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) analizlerinde, Alkalazın hidrolizatta en güçlü enzim olduğu bulunmuştur (Şekil 2.8). Bromelain, Papain ve Supermiks de daha büyük proteinlerin indirgenmesinde etkili olduğu görülmüştür.

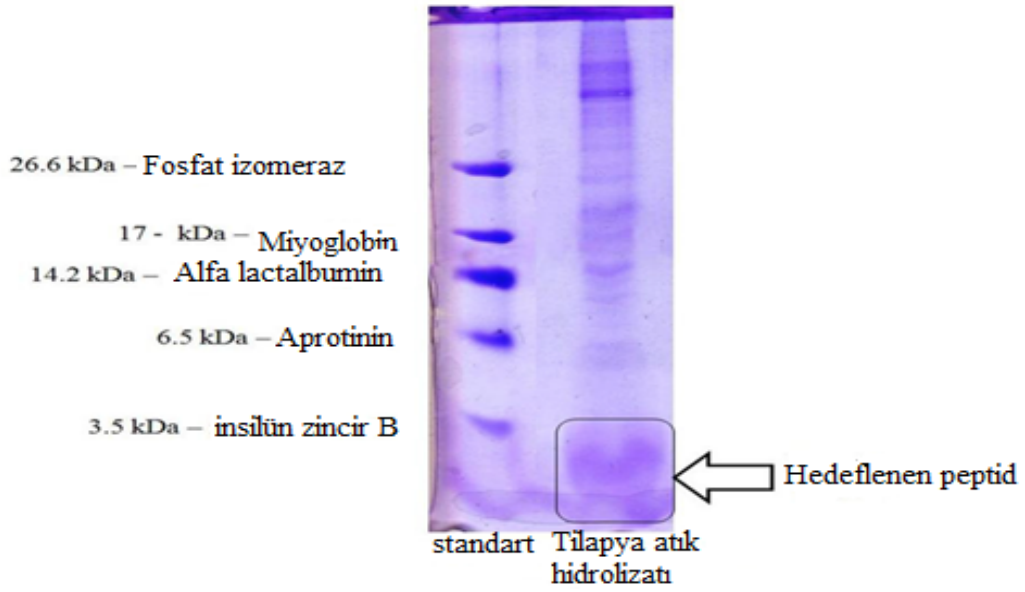


Şekil 2.8. Hidrolizat SDS-PAGE

Her oyuğa toplam 7.5 ml hidrolizat uygulanmıştır. Şerit 1, önceden hazırlanmış Invitrogen Benchmark TM markörünü(bantlardaki proteinlerin molekül kütleleri gösterilir). Şerit 2, hidrolize edilmemiş morina iç organ proteinlerini göstermektedir. Şerit 3, sadece endojen enzimlerle 24 saat sonra üretilen hidrolizatı göstermektedir. Şerit 4-10, Alkalaz (4), Nötraz (5), Protameks (6), Bromelain (7), Papain (8) ve Bitki supermix (9) ve Actinidin (10) ile 24 saat sonra hidrolizatlarıdır.

Roslan ve ark., (2015), tarafından tilapia balıklarının (*Oreochromis niloticus*) fileto haline getirmek için işlenmesi sırasında deri, kemik, pul, kafa ve kuyruk gibi çeşitli yan ürünleri hidrolizat tozu (TBHP) ile yararlı fonksiyonel özelliklere dönüştürülebilmektedir. TBHP'nin moleküler ağırlıklarının SDS-PAGE ile karakterizasyonu, alkalaz enziminin 120 dk içinde küçük boyutlu peptitler üretebildiğini gösteren 3.5 - 26.6 kDa arasında güçlü bantların varlığı ile göstermiştir (Şekil 2.9). Birçok çalışma, alkalazın yüksek oranda hidrolizle düşük molekül ağırlıklı peptit üretme kabiliyetini göstermiştir (Benjakul ve Morrissey, 1997; Liaset ve ark., 2000; Lalasidis ve ark., 1978). Bhaskar ve ark.(2008)'a göre, yüksek besin değeri olan balık protein hidrolizatı, düşük molekül ağırlıklı peptit bakımından zengin olmalıdır.

Yoon ve ark., (2015), *O. keta* ve *O. gorboscha* karaciğer ekstraktını, piyasada bulunan dört farklı ticari enzimi kullanarak 1 saat hidroliz etmişlerdir. Protameks / alkalaz kompleksiyle elde edilen HD(%)'ler *O. keta* ve *O. gorboscha* için sırasıyla %21.7 ve %23.4 olarak bulunmuştur.



Şekil 2.9. TBHP'nin moleküler ağırlıklarının SDS-PAGE ile karakterizasyonu

HD değerleri, diğer proteolitik enzimler için %20 'den daha düşük elde edilmiştir. Enzimler olmadan, HD(%) değerleri %8.9-10.5 aralığında bulunmuştur. Enzim tipi ve hidroliz koşulları nihai ürün verimi üzerinde belirgin etkilere sahiptir. Elde edilen çözümlü proteinin en yüksek geri kazanımları, Alkalaz kullanılarak 50 °C'de hidroliz ile pH 7.0' de elde edilmiştir (Çizelge 2.7 ve Çizelge 2.8).

Çizelge 2.7. *O. keta* ve *O. gorbuscha* den elde edilen protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi (%HD)

	Kontrol	Flavourenzim	Protameks	Nötraz	Alkalaz	Protameks +Alkalaz
<i>O.keta</i>	10.5	13.2	14.4	15.8	14.8	21.7
<i>O.gorbuscha</i>	8.9	15.7	17.1	17.5	18.5	23.4

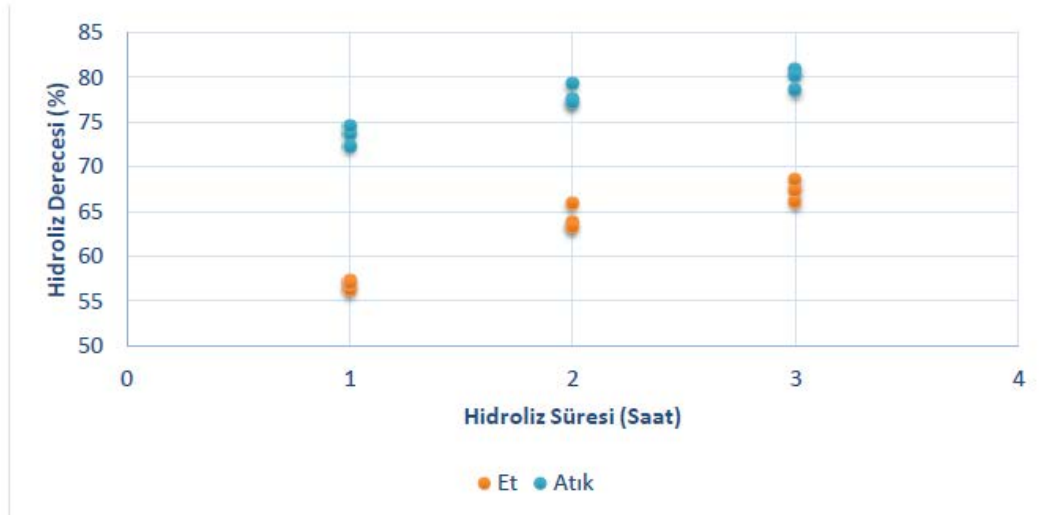
Çizelge 2.8. *O. keta* ve *O. Gorbuscha* karaciğer verim, protein konsantrasyonu ve (%HD)

Türler	Enzim uygulama	Verim (%)	Protein konsantrasyonu(mg/ml)	Hidroliz derecesi(%)
<i>O.keta</i>	1	21.7	20.6±0.1	14.4
	2	13.2	22.9±0.7	21.7
<i>O.gorbuscha</i>	1	19.5	23.6±0.7	17.1
	2	26.5	26.8±0.4	23.4

Baharuddin ve ark., (2016), yılanbalığı protein hidrolizatının (EPH) farklı hidroliz derecesinin (HD) etkisini araştırmışlardır. Hidroliz için, *Bacillus licheniformis*

suşundan elde edilen bakteriyel bir endoproteinaz olan alkalaz kullanılmıştır (2.4 Au / g ve yoğunluk 1.18 g / ml). EPH'nin alkalaz ile hidrolizi sırasıyla 120, 180 ve 300 dakika hidroliz zamanı için %36,%48 ve %69 hidroliz derecesine neden olduğu bulunmuştur.

Koç (2016), hamsi (*Engraulis encrasicolus*) eti ve işleme atıklarını Alkalaz® enzimi kullanarak üç farklı sürede (1, 2 ve 3 saat) protein hidrolizine tabi tutmuş; elde edilen hidrolizatların besleyici, fonksiyonel ve biyoaktif özelliklerini incelemiştir. Hamsi eti hidroliz dereceleri; 1, 2 ve 3 saatlik hidroliz sürelerine göre sırasıyla %56.7±0.3, %64.3±0.8, %67.3±0.7 olarak tespit edilirken, atık örneklerinde bu değerler %73.5±0.7, %78.0±0.7 ve %79.9±0.7 şeklinde ve daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacı, hidroliz derecesi özelliği üzerine materyal tipi ve hidroliz süreleri arasında önemli derecede ($p<0.05$) interaksiyon olduğunu tespit etmiştir (Şekil 2.10)



Şekil 2.10. Hidrolizatların hidroliz süreleri bazında hidroliz dereceleri(%)

2.4.1.4. Cevap Yüzeyi Yöntemi (Response Surface Methodology)

Cevap yüzeyi yöntemi (CYY), bir cevabın birçok değişkenle değiştiği ve amacın bu cevabı optimize etmek olduğu herhangi bir problemin analiz ve modellenmesinde kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. CYY çok değişkenli deneylerde bağımsız değişkenleri parametre veya faktör, bağımlı değişkenleri tepki veya çıktı olarak değerlendirilmektedir. CYY ile birden fazla bağımsız değişkenin tepki üzerine olan etkisi belirlenmekte ve optimum çalışma koşullarının hatasız bir şekilde seçilmesi sağlanmaktadır (Neter ve ark., 1999; Myers ve ark., 2002;). Bu yöntemde, proses için

uygun optimum koşullar belirlenerek istenilen özellikte ürün elde edilmesi amaçlanmaktadır (Tzia, 2003). Cevap yüzeyi modellerinde yürütülecek deney sayısı, modeldeki faktör sayısına ve değişken sayısına bağlı olarak seçilecek polinomların dereceleri kıstas alınarak belirlenmektedir (Nakai ve ark.,2006). CYY'nin en önemli avantajı istatistiksel değerlendirme için gerekli deney sayısını en aza indirmesidir. Ayrıca diğer tekniklere göre daha hızlı sonuç vermekte ve daha düşük maliyetle gerçekleştirilebilmektedir (Baş, 2006). Endüstriyel uygulamalarda yer alan enzimatik modifikasyon işlemlerinde ürün kalitesini arttırmak ve maliyeti düşürmek amacıyla çeşitli optimizasyon modelleri uygulanmaktadır (Xu, 2003).

Proseslerde ölçülmek istenen cevap üzerine etki eden çok sayıda değişken bulunmaktadır. CYY kullanılırken cevap üzerine en fazla etki ettiği düşünülen değişkenlerin seçilmesi, en doğru sonuçların alınması açısından önemlidir. Değişkenlerin seçiminden sonra ön denemeler ve literatür araştırması ile bu değişkenlerin ölçülebilecekleri değer aralıkları belirlenmektedir. Daha sonra proses için en uygun model denkleminin seçilmesi gerekmektedir. Model denklem, ölçülen tepkiyi proses değişkenlerinin bir fonksiyonu olarak ifade etmektedir. CYY'de kullanılan model denklemler birinci veya ikinci dereceden olabilmektedir. CYY ile yapılan çalışmalarda daha çok ikinci dereceden model denklemler tercih edilmektedir (Myers ve ark., 2002; Kent, 2008).

Modern anlamda cevap yüzeyi yönteminin temelleri Box ve Wilson tarafından atılmıştır. Cevap yüzeyi yöntemine Box ve Wilson'ın katkıları Myers ve arkadaşları tarafından,

- ✓Deney tasarımlarının cevap yüzeyi yönteminin içine alınması,
- ✓Optimum noktaların belirlenmesi ve değişik deney tasarımlarına ilişkin performans karşılaştırma fikrinin ortaya atılması,
- ✓Optimizasyon tekniklerinin cevap yüzeyi yönteminin içine girmesi ve en iyi noktaların bulunmasında en hızlı çıkış yönteminin benimsenmesi,
- ✓Merkezsiz bileşik tasarımların istatistik literatürüne kazandırılması olarak verilmiştir (Myers ve ark., 1981).

Baş (2010) tarafından belirtildiğine göre; cevap yüzeyleri 1990'lı yıllardan sonra çeşitli uygulama alanlarında kullanılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları,

- ✓ Tıp, kimya ve ilaç sanayisi (Yin ve Carter 1996, Hasmann ve ark., 2003, Kong ve Lee 2006),
- ✓ Gıda sektörü (Gomes ve Malcata 1998),
- ✓ Bilgisayar ve otomotiv sektörüdür (Amago 2001, Kaymaz ve McMahan 2005, Bucher ve Most 2008).

2.4.1.4.1. Balık Protein Hidrolizatlarının Cevap Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Nilsang ve ark. (2005), Flavourenzim TM ve Kojizyme kullanarak konserve balık endüstrisinin atıklarından balık protein hidrolizatı (FPH)' nı üretilmişlerdir. Hidroliz şartları, Cevap Yüzeyi Yöntemi (CYY) kullanılarak optimize edilmiştir. Model denkleminde sıcaklık (T), zaman (t) ve enzim konsantrasyonunun (E) etkileri 4x5x6 optimize tam blokta faktöriyel tasarım (RCBD) kullanılarak hidroliz derecesi (%HD) üzerine test edilmiştir (Çizelge 2.9).

Çizelge 2.9. Optimizasyon deneylerinde kullanılan faktörler ve koşullar

Faktörler	Kodlar	Koşullar
Sıcaklık (°C)	X_1	45, 50, 55 ve 60
Enzim Konsantrasyonu (%) ^a	X_2	1, 2, 3, 4, ve 5
Hidroliz süresi (s)	X_3	1, 2, 3, 4, 5 ve 6

^aSubstrattın kuru ağırlığına göre proteinin gramı

Çalışma sonucunda, flavourenzim için optimum enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu, sıcaklık ve hidroliz zamanı için değerler sırasıyla 50 LAPU / g protein, %20 , 45 °C ve 6 saat olarak bulunmuştur (LAPU: Leucine Amino peptitase Unit). Bu değerler Kojizyme için sırasıyla 40LAPU / g protein, %20 , 50 °C ve 6 saat olarak tespit edilmiştir. Çalışmada, hidrolizatın acı tadının oluşmasına sebep olan, örneğin hidroliz işlemi sırasında triptofan gibi, bazı amino asitlerin oluşumunu arttırdığı bulunmuştur. Buna karşılık, acı-tadı veren bu amino asitler Flavourenzim'de ise bulunamamıştır.

Bhaskar ve ark. (2008), Hindistan'ın bir tatlısu sazanı olan Catla (*Catla catla*) 'nın iç organ atıklarından protein hidrolizatı hazırlamışlardır. Balık içorgan atıklarından protein hidrolizatları hazırlamak için hidroliz koşulları (zaman, sıcaklık, pH ve enzim

substrat seviyesi) optimize faktöriyel tasarım (CRFD) kullanılarak Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile optimize edilmiştir. Dört farklı faktör (pH, sıcaklık, zaman ve enzim substrat düzeyi) üç eşit mesafede (-1, 0 ve +1) çalıştırılmıştır. Hidroliz derecesi ise, cevap değişkeni olarak (Y) belirlenmiştir. Bağımsız değişkenler olarak gözlenen HD değerlerine sıcaklık (X1), zaman (X2), enzim substrat seviyesi (X3) ve substratın (X4) pH'sının alkalaz ile hidrolize etkisi Çizelge 2.10' da sunulmuştur.

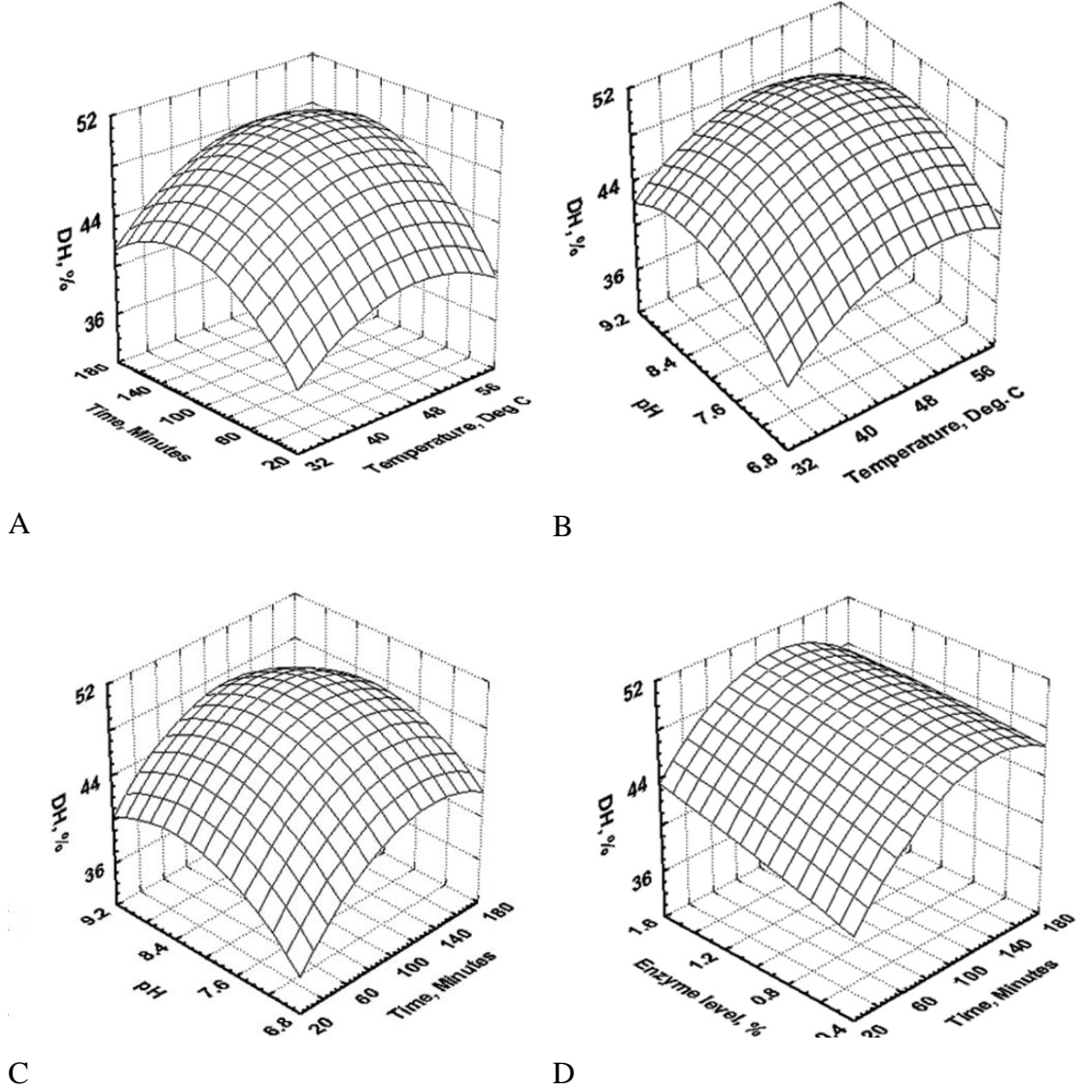
Çizelge 2.10. Yanıt değişkeni olan hidroliz derecesi (HD, Y) için gözlenen değerlerle birlikte bağımsız değişkenlerin gerçek düzeyleri

Run#	X1	X2	X3	X4	Y
1	35	45	0.50	7	34.23
2	35	45	1.00	9	40.36
3	35	45	1.50	8	42.36
4	35	105	0.50	9	45.32
5	35	105	1.00	8	47.36
6	35	105	1.50	7	43.00
7	35	165	0.50	8	42.45
8	35	165	1.00	7	40.36
9	35	165	1.50	9	41.97
10	45	45	0.5	9	43.26
11	45	45	1.00	8	45.12
12	45	45	1.50	7	44.32
13	45	105	0.5	8	47.56
14	45	105	1.00	7	42.36
15	45	105	1.50	9	47.00
16	45	165	0.5	7	43.68
17	45	165	1.00	9	47.36
18	45	165	1.50	8	48.42
19	45	165	0.5	8	42.53
20	55	45	1.00	7	39.56
21	55	45	1.50	9	44.21
22	55	105	0.5	7	43.25
23	55	105	1.00	9	48.35
24	55	105	1.50	8	49.65
25	55	165	0.5	9	46.35
26	55	165	1.00	8	49.04
27	55	165	1.50	7	47.13

X1: sıcaklık, X2: zaman, X3: enzim, X4: pH, Y: hidroliz derecesi (%)

İç organ atık proteinlerinin Cevap Yüzeyi grafiği, enzim-substrat seviyesi %1 ve pH 8 seviyesinde iken sıcaklık ve zaman fonksiyonu olarak (Şekil 2.11(A)) HD(%)'nin önemli ölçüde azalmadan önce %50'ye kadar yükseldiğini göstermektedir. Benzer şekilde, substrat pH'ında 8.5' e kadar bir artış olduğu ve (Şekil 2.11(B)) Şekil 2.11(C)) 135 dakikalık bir hidrolizde azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, araştırmacılar

tarafından HD(%)' nin %1.5 enzim seviyelerinin üzerinde durağan faza girdiği belirlenmiştir (Şekil 2.11(D)).



Şekil 2.11. İçorgan atığının alkalaz ile hidrolize edilmesi sırasında HD'nin tepki yüzeyi grafiği A) sıcaklık ve zamanın bir fonksiyonu olarak, B) sıcaklık ve pH'ın bir fonksiyonu olarak, C) zaman ve sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ve D) zaman ve enzim konsantrasyonunun fonksiyonu olarak

Optimizasyon çalışması sonucunda, alkalaz enzimi kullanarak optimum hidroliz derecesi(%) elde etmek için koşullar 50 °C sıcaklık, 135 dak zaman, substratın pH değeri 8.5 ve enzim konsantrasyonu %1.5 olarak saptanmıştır.

Ji ve ark., (2015) küçük sarı ışkine balığı (*Pseudo sciaenapolyactis*)' nın enzimatik hidrolizi, Cevap Yüzeyi Yöntemi kullanılarak üç farklı ticari gıda sınıfı proteazla gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.11 ve Çizelge 2.12).

Çizelge 2.11. Hidrolizatların çeşitli proteazlarla hidroliz derecesi

Proteazlar	Optimal Hidroliz Koşulları	HD(%)
Alkalaz	pH8.0, 55°C	29.31
Protameks	pH7.0, 55°C	28.60
Papain	pH7.0, 50°C	30.47

HD(%) proteaz tarafından bölünen peptit bağlarının yüzdesi olarak belirlendiği için yüksek HD(%) ile hidrolizatların daha düşük moleküllü peptitler içerdiğine inanılmaktadır (Alder-Nissen, 1979). Çalışmada yüksek HD(%) değeri (%30.47) papain enzimi ile 4 saatlik hidrolizasyon sonucunda elde edilmiştir. Üç hidrolizatın HD(%) düzeyleri papain hidrolizat>alkalaz hidrolizat>protameks hidrolizat olarak sıralanmıştır(Çizelge 2.11)

Çizelge 2.12. Bağımsız değişkenler ve merkezi kompozit dönebilen tasarım (CCRD)' ın için kullanılan düzeyleri ve enzimatik ön-muamele koşullarının optimizasyonu

Bağımsız Değişkenler	Semboller	Düzeyler		
		-1	0	1
Zaman (s)	X ₁	3	4	5
Enzim Konsantrasyonu (%)	X ₂	0.2	0.3	0.4
Sıcaklık (oC)	X ₃	50	55	60
Et/su Oranı (w/v)	X ₄	1:3	1:4	1:5

Modelden, optimize edilmiş koşullar Çizelge 2.13'de görüldüğü şekilde elde edilmiştir. Hidrolizatın maksimum HD(%) değeri, 3.89 saat, %0.22 enzim konsantrasyonu, örnek/ su oranı 1: 5 ve 57.75 °C saptanmıştır. Optimum koşullar altında maksimum HD'nin cevabı %49.37 olarak öngörülmüştür. Çalışma, tahmini HD(%) değeri ile deneysel HD(%) değerinin benzer olduğu, modelin deneysel sonuçların belirlenmesinde gerçekçi ve kuvvetli sonuçlar verebildiğini göstermiştir.

Çizelge 2.13. Optimum hidroliz koşulları, RSM için tahmini ve deneysel HD(%)

Optimum koşullar				HD (%)	
Zaman (s)	Enzim konsantrasyonu (%)	Sıcaklık (°C)	Et:su oranı (w/v)	Tahmini değer	Deneysel değer
3.89	0.22	57.75	1:5	49.37	49.50

2.4.1.4.2. Box Behnken Dizaynı

İkinci derece model parametrelerinin tahminlenmesinde kullanılan üç seviyeli tamamlanmamış (incomplete) çok etkenli tasarımlardan, dönersel tasarımların bir çeşidi olan Box-Behnken tasarımları 1960 yılında Box ve Behnken tarafından geliştirilmiştir. Box-Behnken tasarımlarında her bir etken üç düzeye sahiptir. Box-Behnken tasarımları 34 merkezsiz bileşik tasarımlara kıyasla daha ekonomik bir tasarım sınıfıdır (Köksoy, 2001). Box-Behnken tasarımlarının avantajlarından bir tanesi küresel bir tasarım olması ve sadece üç düzeyde verilere sahip olmasıdır. Box-Behnken tasarımları, tamamlanmamış bir blok tasarımının (incomplete block design) uygun bir şekilde iki düzeyli çok etkenli bir tasarımla birleştirilmesi sonucunda ortaya çıkarlar (Şehirlioğlu, 1997).

Box-Behnken dizaynına göre CYY iki basamaktan oluşur; birinci basamakta tepkinin değişkenlere bağlı fonksiyonu birinci dereceden bir polinom ile ifade edilir:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (2.1)$$

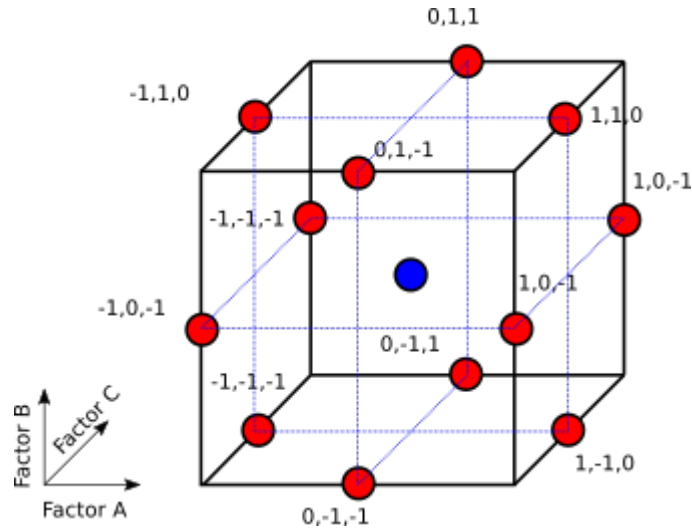
Bu dizaynına göre belirlenen koşullarda deneyler yapılarak elde edilen cevaplar en küçük kareler yöntemi ile polinoma uygulanır. Bu basamakta amaç optimuma en yakın bölgeyi belirlemektir.

Daha sonra optimuma yakın olarak belirlenen bölge dikkate alınarak tepkinin değişkenlere bağlı fonksiyonu için ikinci dereceden bir polinom türetilir:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (2.2)$$

Yine Box-Behnken dizaynına uygun şekilde belirlenen koşullarda deneyler gerçekleştirildikten sonra polinomun katsayıları en küçük kareler yöntemi ile belirlenir. Bu polinomun doğruluğu istatistiksel analizlerle test edildikten sonra bilgisayar yazılım programı kullanılarak cevap yüzeyi ve kontur grafikleri çizilir. CYY yöntemi, prosesi etkileyen parametreler arasında etkileşim olup olmadığını, varsa hangi etkileşimin daha baskın olduğunu, prosesin hangi optimizasyon parametresine daha duyarlı olduğunu belirleyebilen ve bu avantajlarından dolayı da

sıklıkla her alanda (gıdadan, ayırma proseslerine, uçak dizaynına kadar hemen her prosesde) kullanılabilen bir istatistiksel yöntemdir (Baş 2010). En önemli avantajlarından biri de belirlenen optimum koşulların endüstriye uygulanabilirliğinin olmaması durumunda, endüstride bu koşullara en yakın durumun uygulanması sonucunda elde edilecek proses verimini ek deneyler yaparak doğrulanmasına gerek kalmaksızın gösterebilmesidir. Yöntem Box-Behnken dizaynıyla beraber kullanıldığında prosesin döndürülebilirliği de sağlandığından, sistemdeki varyansın da sabit kalması sağlanabilmektedir. Bu yöntem üç bağımsız değişkenle çalışılabilen bir yöntemdir (Eryılmaz,2016). Box-Behnken dizaynı bütün noktaların yarıçapı $\sqrt{2}$ olan bir küre üzerinde olduğu küresel bir dizayndır (Şekil 2.12). Kübik bölge her bir değişkenin alt ve üst sınırları tarafından oluşturulur. Küpün içindeki noktalar, prosesin fiziksel kısıtlamalarından dolayı uygulanması imkânsız veya çok yüksek maliyetli olan faktör-seviye kombinasyonlarını ifade ettiğinde avantajlı bir yöntemdir. Bu dizayn oluşturulurken bağımsız değişkenlerin belirlenen bir noktası merkez seçilir ve bu nokta dizaynda 0 noktasını temsil eder. Bu değerden eşit uzaklıkta (+5 ve -5 veya +10 ve -10 aralığı) bulunan noktalar ise +1 ve -1 değerleri ile belirtilir (Şekil 2.12). Sistemin döndürülebilir olması için de genellikle üç veya beş tane deney merkez noktasında gerçekleştirilir. Bu deneylere merkez deneyleri adı verilir (Baş,2010; Değirmencioğlu ve Yazgı, 2006; Koç ve Ertekin,2009).



Şekil 2.12. Box-Behnken dizayn sınırları (<https://develve.net/Box-Behnken%20design.html>)

Model dizayn cevap yüzey yöntemiyle birlikte kullanılacaksa, genel prosedür cevap yüzeyi yönteminin ilk aşamasında belirlenen üç parametrenin optimum bölgesini

üreten değerlerinin merkez nokta olarak seçilmesi ve deneyi yapan kişinin öngörüsüne bağlı olarak aralığı belirlemesidir. Sonuçta Cevap Yüzeyi Yönteminde kullanılabilecek üç değişkenli ve üç merkez deneyli bir Box-Behnken dizaynı Çizelge 2.14'deki gibi elde edilecektir.

Çizelge 2.14. Üç Değişkenli Box-Behnken Dizaynı

X_1	X_2	X_3	Deney Sayısı
-1	-1	0	1
+1	-1	0	1
-1	+1	0	1
+1	+1	0	1
-1	0	-1	1
+1	0	-1	1
-1	0	+1	1
+1	0	+1	1
0	-1	-1	1
0	+1	-1	1
0	-1	+1	1
0	+1	+1	1
0	0	0	3

2.5. Protein Hidrolizatının Besinsel Kompozisyonu

Balık protein hidrolizatlarının kimyasal bileşimi insan sağlığı bakımından önemlidir. Çizelge 2.15' de çeşitli balık kaynaklarından üretilen balık protein hidrolizatlarının bileşimlerini göstermektedir (Chalamaiah ve ark. 2012).

Çizelge 2.15. Çeşitli balık kaynaklarından üretilen balık protein hidrolizatlarının bileşimleri

Balık Türleri ve bileşenleri	Protein (%)	Yağ (%)	Nem (%)	Kül (%)	Kaynaklar
<i>Clupea harengus</i> Protein hidrolizi					Hoyle ve Merritt (1994)
Ham protein	A	87.9	4.0	4.7	12.5
	P	85.3	4.7	4.8	9.6
Ringa pres keki	A	82.3	3.7	3.9	13.3
	P	83.4	3.6	3.2	9.9
Ethanol ekstraktı ringa	A	83.7	1.8	3.3	12.0
	P	85.7	0.9	3.9	7.5

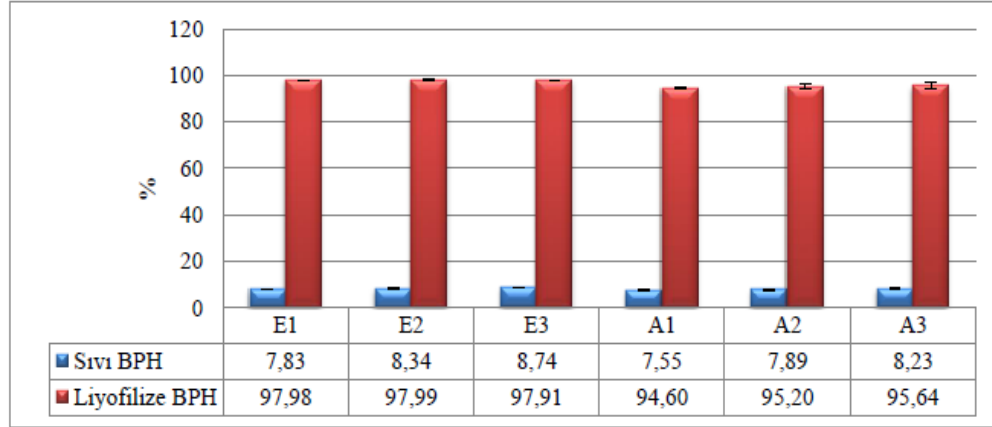
Çizelge 2.15' in devamı

<i>Merluccius</i> katı atık hidrolizati		82.25	3.94	–	13.82	Benjakul ve Morrissey (1997)
<i>Clupea</i> <i>harengus</i> protein hidrolizati		77.0	0.77	3.98	21.7	Liceaga- Gesualdo ve Li-Chan (1999)
<i>Clupea</i> <i>harengus</i> atığı hidrolizati	HBH	87	0.4	3.0	10.1	Sathivel ve ark. (2003)
	HHH	85.2	1.2	3.5	10.1	
	HGH	77	1.5	6.2	15.3	
<i>Salmo salar</i> başı protein hidrolizati		82.3	0.8	5.3	10.4	Gbogouri ve ark. (2004)
Tuna atığı protein hidrolizati		66.40	2.37	7.25	25.94	Nilsang ve ark. (2005)
<i>Oncorhynchus</i> <i>nerka</i> başı protein hidrolizati	Alkalaz	63.3	23.7	5.9	7.1	Sathivel ve ark. (2005)
	Flavourenzim 500L	62.8	24.5	5.0	7.7	
	Palataz 2000L	62.3	23.9	6.1	7.7	
	Proteks 6L	63.6	23.1	6.2	7.1	
	GC 106	64.8	22.6	5.6	7.2	
	Nötraz	64.8	22.5	5.7	6.9	
<i>Sardinella</i> <i>aurita</i> atığı protein hidrolizati	FPH1	75.01	8.53	1.35	14.81	Souissi ve ark. (2007)
	FPH2	72.99	10.21	2.83	13.06	
	FPH3	73.05	10.29	4.56	12.10	

FPH = Balık protein hidrolizati; A = Alkalaz; P = Papain; ; HBH =Ringa vucüt hidrolizati, HHH =Ringa vucut hidrolizati, HGH =Ringa gonad hidrolizati;

Koç (2016), sıvı hidrolizatlarda yürütülen makro besin bileşenleri analizlerinde; et materyalde en düşük kurumadde (KM) değeri (%7,70) 1 saatlik hidrolizde, en yüksek KM değeri (%8,84) 3 saatlik hidrolizde elde etmiştir. Atık hidrolizatlarında en küçük KM değeri (%7,5) 1 ve 2 saatlik hidrolizlerde, en yüksek KM değeri (%8,3) ise 3

saatlik hidrolizde elde etmiştir. Et örneklerinin kurutulmuş hidrolizatlarında ise en küçük (%97,5) ve en büyük (%98,3) kurumadde değerleri 2 saatlik hidroliz ile elde etmiştir. Kurutulmuş atık hidrolizatlarının en küçük KM değeri (%94,0) 1 saatlik hidrolizde, en yüksek KM değeri (%97,0) ise 3 saatlik hidrolizde tespit etmiştir. Sıvı ve kurutulmuş hidrolizatların grup bazında kurumadde değerleri Şekil 2.13’de gösterilmiştir.



Şekil 2.13. Sıvı ve kurutulmuş hidrolizatların % kuru madde (%KM) değerleri

Raslon ve ark., (2015), tilapia atığından elde edilen balık protein hidrolizatında protein, kül, nem ve yağ içeriklerini sırasıyla %62.71, %25.34, %6.48, %0.08 olarak bulmuşlardır.

Protein hidrolizatlarında, nutrasötikler veya fonksiyonel gıdalar gibi pek çok avantaj ortaya koyan serbest amino asitlerden ve kısa zincirli peptitlerden oluşan bir amino asit profili elde edilir. Herhangi bir gıda maddesinin amino asit kompozisyonu insan vücudu üzerinde çeşitli fizyolojik aktivitelerinde doğrudan ya da dolaylı olarak sağlığın korunması için önemli rol oynamaktadır. Amino asitler oksijen taşıyıcıları da dahil olmak üzere önemli fonksiyonlara sahip proteinler, vitaminler, CO₂, enzimler ve yapısal proteinlerin sentezi için gereklidir. Balık protein hidrolizatlarının amino asit bileşimi, besin değeri ve fonksiyonel özelliklere olan etkisinden dolayı önemlidir (Santos ve ark., 2011).

Raslon ve ark.,(2015), tilapia yan ürünleri hidrolizat tozu (TBHP)’nun amino asit (AA) bileşiminde en büyük bileşenin glutamik asit olduğunu bulmuşlardır (79.60 mg / g). Bunu sırasıyla glisin, aspartik asit ve alanin (67.82 mg / g, 45.85 mg / g ve

45.64 mg / g) amino asitlerinin izlediğini saptamışlardır. TBHP toplam AA'sı içinde lizin ve lösün en yüksek esansiyel aminoasit olarak bulunmuştur.

Bhaskar ve ark., (2008) göre, herhangi bir maddenin besleyici değeri, esansiyel AA ihtiyacına dayalı bir organizmanın gereksinimlerini karşılayan proteinin kapasitesine göre değerlendirilir. Tüm AA'ler arasında aspartik ve glutamik asitin, bildirilen balık protein hidrolizatlarının en bol AA olduğu bulunmuştur. Balık proteini hidrolizatların AA bileşiminde hammadde, enzim ve hidroliz koşullarına bağlı olarak farklılıklar sergilediği bildirilmiştir (Benjakul ve Morrissey, 1997; Wasswa ve ark., 2007; Bhaskar ve ark., 2008; Klompong ve ark., 2009).

Yoon ve ark., (2015), *Oncorhynchus keta* ve *Oncorhynchus gorbuscha* karaciğerini enzimatik yöntemle hidroliz ederek hidrolizatın optimum koşullarını, besinsel değerlerini ve işlevselliğini araştırmışlardır. Proteinlerin besleyici değerini değerlendirmek için esansiyel aminoasit kompozisyonları ve kimyasal skorlar FAO / WHO referans proteine göre verilmiştir. Alkalaz enzimi ile hazırlanan somon karaciğer hidrolizatlarının amino asit kompozisyonları Çizelge 2.16'da listelenmiştir. Karaciğer hidrolizatının amino asit profilleri genel olarak *O. keta* ve *O. gorbuscha* arasında benzer bulunmuştur. Treonin ve metiyonin konsantrasyonları dışında, türler arasında önemli bir fark bulunmamıştır. En bol esansiyel olmayan aminoasitler olarak glutamik asit (sırasıyla %14.6 ve %17.8), glisin (sırasıyla %9.2 ve %9.9) ve aspartik asit bulunmuştur (sırasıyla %8.6 ve %9.9). Lizin (*O. keta* ve *O. gorbuscha*'daki sırasıyla %8.2 ve %8.9), fenilalanin (sırasıyla %8.1 ve %8.6) ve lösün (sırasıyla %7.8 ve %9.1) gibi bazı esansiyel aminoasitler hidrolizatlarda bulunmuştur. Hidrolizatlar arasındaki amino asit kompozisyonundaki farklılıklar, proteazların özgülüğündeki farklılıklarına bağlanabilir.

Hoskin ve Ramamoorthy, (2008), tarafından hidrofobik aminoasitlerin (arginin, tirozin, izolösün, metiyonin, fenilalanin ve valin) yüksek oranı, antioksidan aktiviteleri (Chen ve ark., 1996) ve sitotoksik ve antikanser etkilerini geliştirdiği bildirilmiştir. *O. keta* ve *O. gorbuscha*'dan hazırlanan hidrolizatlarda hidrofobik amino asit oranları sırasıyla %38.4 ve %39.1 olarak saptanmıştır. Dolayısıyla, bu hidrolizatların arzu edilen biyolojik aktivitelere sahip işlevsel gıdaların üretimi için gerekli olan amino asitler bakımından iyi bir kaynak olduğu düşünülmektedir.

Esansiyel amino asitlerin anti oksidatif etkinlikleri Song ve ark., (2011), tarafından bildirilmiştir.

Çizelge 2.16. *Oncorhynchus keta* ve *Oncorhynchus gorbuscha* karaciğer hidrolizatının aktif fraksiyonunun aminoasit kompozisyonu(% w/w)

Esansiyel olmayan A.A	<i>O.keta</i>	<i>O.gorbuscha</i>	
Alanin	3,89±0.01	4,99±0.02	
Arjinine	5.58±0.03	6.01±0.05	
Aspartik Asit	8.56±0.05	9.89±0.03	
Glutamik Asit	14.56±0.01	17.78±0.02	
Glisin	9.15±0.02	7.11±0.03	
Prolin	7.15±0.08	5.58±0.04	
Serin	3.10±0.03	2.45±0.02	
Tirosin	3.58±0.04	4.56±0.01	
Ara Toplam	55.57	58.37	
Esansiyel A.A			
Histidin	4.1±0.05	3.12±0.07	1.90
İzolösin	4.23±0.03	3.95±0.02	2.80
Lösin	7.78±0.03	9.10±0.02	6.60
Lizin	8.20±0.04	8.89±0.02	5.80
Metiyonin+ Sistin	2.21±0.02	1.01±0.01	2.52
Fenilalanin	8.10±0.03	8.56±0.01	6.33
Tirozin			
Treonin	3.10±0.02	3.81±0.03	3.40
Valin	6.95±0.04	5.95±0.02	3.50
Ara Toplam	44.67	41.64	
Toplam Aminoasit(mg/100mghidrolizat)	7.52±0.05	8.96±0.03	

Koç (2016), hamsi eti ve atığından elde edilen hidrolizatların amino asit analizi sonuçlarını kuru madde bazında hesaplamış; ve buna göre elde edilen toplam amino asitler Çizelge 2.17’de, serbest amino asitler ise Çizelge 2.18’de sunulmuştur. Hidrolizatların toplam amino asit bileşimi, et ve atık materyalin amino asit içeriğine paralel olarak şekillenmiştir. Ancak hidrolizat eldesi sırasında protein içermeyen yapılar ayrıldığından amino asit miktarlarında bir artış olmuştur. Ayrılan kısımların nispeten az olduğu et hidrolizatlarında hammaddeye göre ortalama toplam amino asit miktarında artış yaklaşık %8 olarak kaydedilirken, bu oran atık hidrolizatlarında %36 gibi dikkat çekici bir seviyede gerçekleşmiştir.

Çizelge 2.17. Hamsi eti ve atık hidrolizatlarında toplam amino asit değerleri (KM’de g/100g hidrolizat)

	E1	E2	E3	A1	A2	A3
Alanin	5.39	5.94	4.89	4.88	4.29	4.28
Glisin	3.31	3.89	3.45	4.55	3.80	3.86
Valin*	4.36	5.37	4.90	4.41	4.63	4.35
Lösin*	5.66	7.08	6.11	5.05	4.91	4.81
İzolösin*	5.27	4.89	4.60	4.23	5.05	4.15

Çizelge 2.17' nin devamı

Treonin*	2.58	3.07	2.79	2.46	2.03	2.19
Serin	2.27	2.22	2.47	1.99	1.80	2.06
Prolin	2.99	3.70	3.32	4.05	3.82	3.66
Asparajin+Aspartik asit	11.36	10.46	12.14	10.14	10.90	11.05
Metiyonin*	1.12	2.30	2.00	1.67	1.68	1.50
Hidroksiprolin	1.23	0.46	0.28	0.18	2.35	0.76
Glutamin+Glutamik asit	17.07	15.15	15.65	11.93	11.00	9.87
Fenilalanin*	2.36	3.06	2.66	2.05	2.39	2.37
Lizin*	7.54	9.17	7.44	7.46	5.79	4.89
Histidin*	5.47	5.79	5.58	3.64	3.56	2.95
Tirozin*	1.60	2.15	1.93	0.52	1.91	1.75
Sistein*	0.47	0.63	0.40	0.54	0.49	0.36
Toplam E.A.A miktarı	36.43	43.50	38.39	32.03	32.44	29.32
Toplam A.A miktarı	80.05	85.33	80.58	69.75	70.42	64.85

Çizelge 2.18. Balık eti ve atık hidrolizatlarında serbest amino asit değerleri (KM'de mg/100g hidrolizat)

	E1	E2	E3	A1	A2	A3
Alanin	67.2	70.3	71.2	145.5	151.2	146.9
Glisin	19.2	18.9	20.0	42.6	46.4	50.4
Valin*	40.5	40.0	41.6	168.4	172.1	182.6
Lösin*	70.7	74.0	79.2	348.3	380.4	356.6
İzolösin*	41.1	41.7	44.4	178.5	185.0	196.0
Treonin*	14.2	13.3	14.7	54.2	52.1	56.6
Serin	13.8	13.8	14.4	49.8	45.9	49.9
Prolin	39.6	36.8	37.7	103.9	110.5	110.0
Asparajin+Aspartik asit	9.1	9.8	9.2	90.8	96.2	94.3
Metiyonin*	37.7	39.8	44.0	127.5	134.2	132.5
Hidroksiprolin	2.9	6.6	6.9	4.9	4.5	5.0
Glutamin+Glutamik asit	37.7	39.8	41.1	146.7	136.7	134.7
Fenilalanin*	53.7	54.4	57.1	259.4	264.4	270.6
Lizin*	146.1	167.1	177.9	430.7	434.8	390.1
Histidin*	1402.4	1308.6	1328.1	601.8	579.2	615.3
Tirozin*	46.9	47.7	49.8	198.6	203.8	211.4
Sistein*	2.3	2.5	2.2	17.9	19.1	22.3
Toplam E.A.A miktarı	1855.8	1789.1	1839.1	2385.3	2425.2	2434.0
Toplam A.A miktarı	2045.2	1985.1	2039.6	2969.5	3016.7	3025.2

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmada, Karadeniz bölgesinde en fazla balık atığı olarak ortaya çıkan hamsi (*Engraulis encrasicolus*) atığı (kafa ve içorganları) ocak ayında, mezigit (*Merlangius merlangus*) atığı (kafa ve içorganları) şubat ayında ve gökkuşağı alabalığı (*Onchoryncus mykiss*) atığı (iskelet, yüzgeç, kafa, deri ve içorganları) mart ayında Ordu ilindeki su ürünleri satışı yapan işletmelerden temin edilmiştir.

Atıklar, 1 ve 5 kg'lık paketler halinde vakum paketlenerek buz içindeki köpük kutulara yerleştirilerek, Ordu Üniversitesi Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Bölümü İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı laboratuvarına getirilip protein hidrolizatı elde edilene kadar -40 °C' de depolanmıştır.

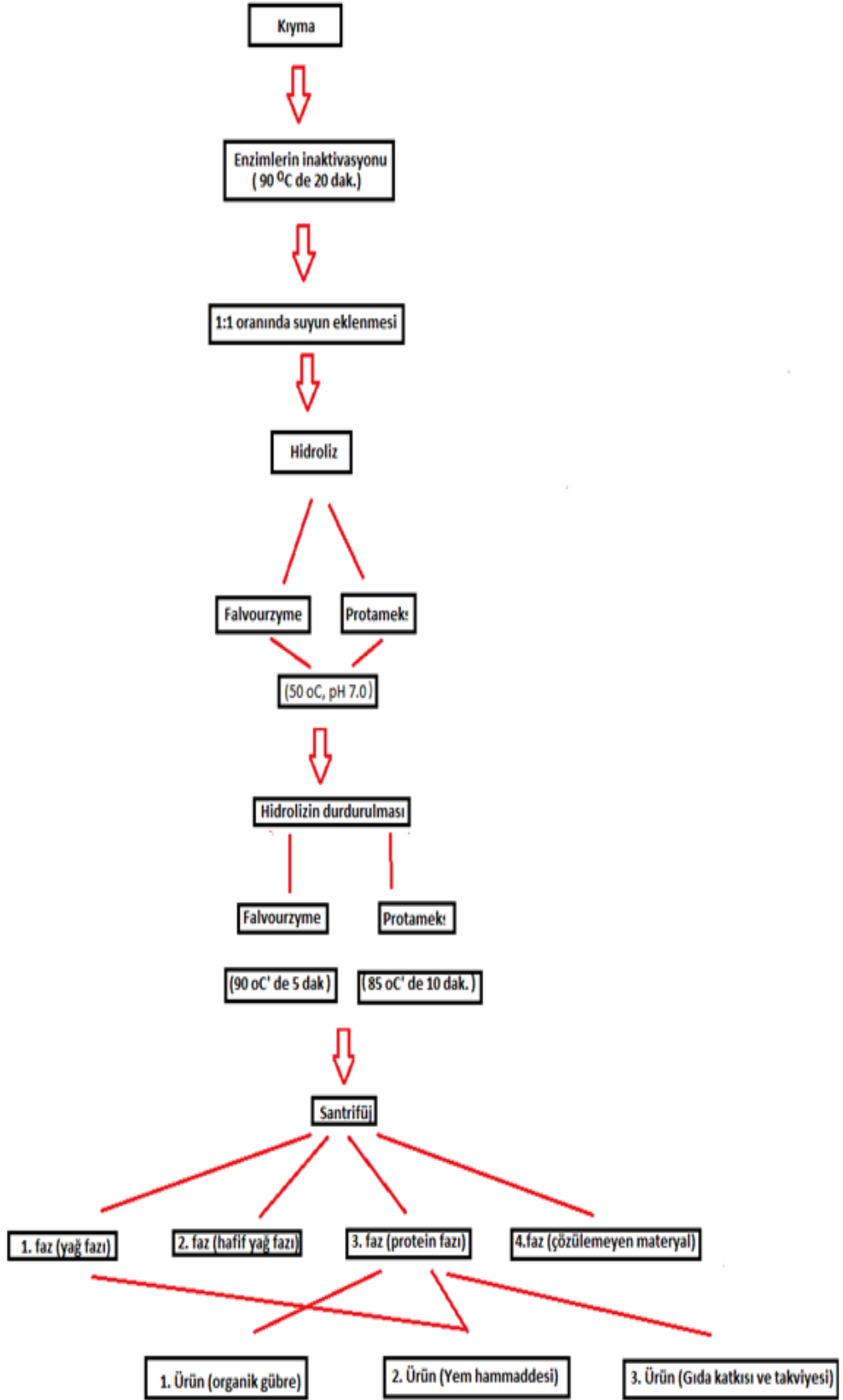
3.2.Yöntem

3.2.1. Enzimatik Hidroliz

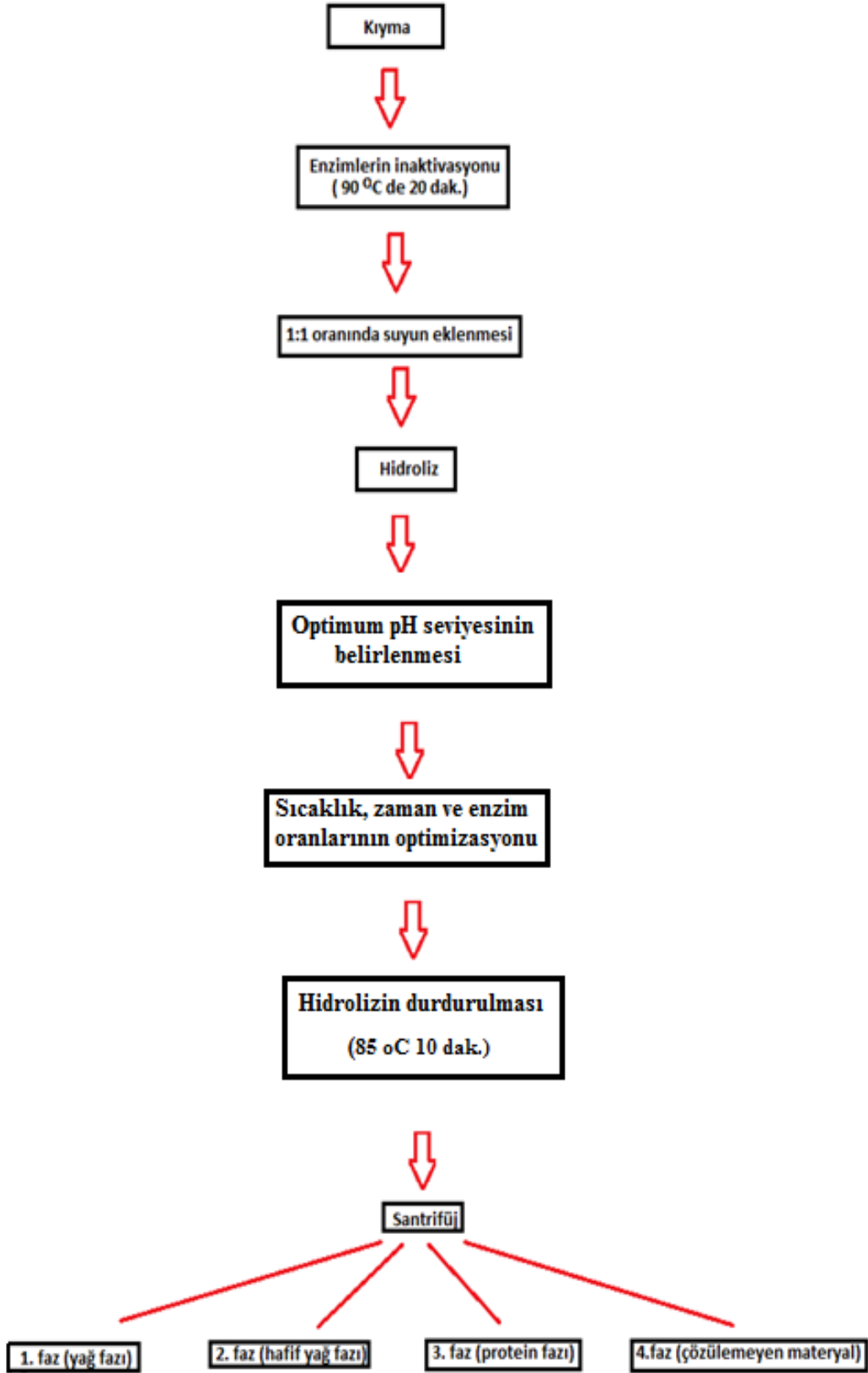
Dondurulmuş halde 5 kg paketler halinde depolanan atıklar bir kıyma makinasının (Empero E.M.P.12.01.P) yardımıyla oda sıcaklığında çözdürülmesi sağlandıktan sonra kıyılmıştır. Daha sonra endojen enzimlerin inaktivasyonunun sağlanması için atıklar 90 °C' de 20 dak. kadar Memmert WNB 22 marka su banyosunda ısıtılmıştır. Enzimleri inaktif hale getirilen kıyılmış balık eti soğutulduktan sonra üzerine 1:1 oranında saf su eklenerek homojenize (IKA T 25) edilmiştir. Balık atıklarından protein hidrolizatı, Şekil 3.1 ve Şekil 3.2' de verilen akış şemasına göre elde edilmiştir.

Protein hidrolizatının elde edilmesinde en önemli aşama enzimatik hidrolizde uygulanacak süre, sıcaklık, pH, enzim türü ve enzim miktarıdır. Ticari olarak uluslararası platformda BPH üretiminde kullanılan iki farklı enzimin (protameks ve flavourenzim APU/g) optimum hidroliz sıcaklıkları, pH değerleri ve inaktivasyon süre ve sıcaklıkları üretilen firma tarafından belirtilmiştir. Ulusal bir firmada tedarik edilen alkali özellikteki proteazın optimum pH düzeyi ise, 8, 8.5 ve 9 olmak üzere üç farklı pH ile hidroliz edilerek en yüksek protein çözünürlüğü veren pH düzeyine göre belirlenmiştir. Bu enzimlerin pH düzeyleri 2 N NaOH kullanılarak

ayarlanmıştır. Buna göre alkali proteaz için optimum pH 8.0 olarak tespit edilmiştir. Protameks ve flavourenzim için ise pH 7.0 olarak ayarlanmıştır (Metler Toledo FP 20). Hidroliz sıcaklığı denenecek enzimlerin üretici firmaları tarafından önerilen sıcaklıklar baz alınarak uygulanmıştır. Alkali proteaz enzimi için ise, optimizasyon işlemi için 40°C, 50°C ve 60°C olmak üzere 3 farklı sıcaklık belirlenmiştir. Flavourenzim ve protameks için ise firmaların önerdiği şekilde 50°C sıcaklık uygulanmıştır. Hidroliz aşamasında optimum ürün verimliliği için 3 enzim (alkali proteaz, flavourenzim, protameks) için farklı enzim süreleri 1, 4.5 ve 8 saat ve enzim miktarları % 1, % 1.5 ve % 2 olarak tespit edilmiştir. Belirli süre, sıcaklık ve enzim konsantrasyonu uygulanan örneklerdeki hidrolizin sona erdirilmesi için her bir enzime ait inaktivasyon süre ve sıcaklığı enzimlerin satın alındığı firmanın önerisine göre uygulanmıştır. Buna göre flavourenzim enzimi için 90°C ' de 5 dak., protameks enzimi için 85°C' de 10 dak. alkali proteaz için 85°C' de 10 dak. olarak uygulanmıştır ve daha sonra 15 dak. soğutulmuştur. Soğutulan hidroliz solüsyonu, daha sonra 4100 rpm' de 20 dak. santrifuj (Sigma 3-30K) edilerek fazlara ayrılması sağlanmıştır. Burada en üst fazda yağ fazı, 2. fazda hafif protein yağ fazı, 3. fazda proteinli faz ve son fazda çözünemeyen maddelerin fazı olmak üzere 4 farklı fazın oluşması sağlanmıştır. BPH üretimi 3. fazda bulunan proteinli sıvıdan elde edilmiştir (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). Önce yağın ve hafif yağın bulunduğu üst ve 2. faz vakum pompası ile ayrılan ve proteinli solüsyon filtre kâğıdından geçirilerek proteinli solüsyon elde edilmiştir. Bu solüsyonun protein kalitesinin belirlenmesi amacıyla protein miktarı Lowry ve ark., (1959) methoduna göre tespit edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.1. Balık atıklarının protameks ve flavourenzim ile optimizasyonunda hidrolizat üretim akış şeması



Şekil 3.2. Balık atıklarının alkali proteaz enzimi ile optimizasyonunda hidrolizat üretim akış şeması

3.2.2. Hidroliz Derecesi (%HD) Tespiti

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

$$\% \text{ HD} = \text{Nö} / \text{NT} \times 100$$

Nö: Hidrolizatın %10 TCA'da çözülmüş protein miktarı NT: Hidrolizattaki toplam protein miktarı

3.2.3. Protein Geri Kazanımı

Protein geri kazanımı Saltvedt, 2015'e göre denklem 3.1, 3.2 ve 3.3 deki gibi hesaplanmıştır.

Protein geri kazanımı[%]

$$= \frac{100 \text{ gr ham maddeden elde edilen balık protein hidrolizatındaki(bph) protein}}{100 \text{ gr ham materyaldeki protein}} * 100\% \quad (3.1)$$

$$= \frac{100 \text{ gr hammadde den elde edilen bph verimi} * \text{bph deki protein içeriği}}{100 \text{ gr hammadde deki protein}} * 100\% \quad (3.2)$$

$$= \left(\frac{\text{bph'in kuruağırlık fraksiyonu}}{100 \text{ gr ham materyal}} \right) * \frac{\text{balık protein hidrolizatı protein içeriği}}{\text{balık protein hidrolizatı kurumadde içeriği}} * \frac{100}{100 \text{ gr ham materyaldeki protein}} \quad (3.3)$$

3.2.4. Besin Kompozisyonu Analizleri

Ham materyal olarak kullanılacak atıklarda ve elde edilen hidrolizatlarda ham protein (NX6.25) Kjeldahl metoduna göre (AOAC, 1998), ham yağ analizi Bligh

ve Dyer (1959)' a göre, nem AOAC (1990)' a göre ve ham kül analizi AOAC 935.47 (1998)' a göre belirlenmiştir.

3.2.4.1. Lipid Analizi

Lipit analizi Bligh ve Dyer (1959)'in uyguladığı yönteme göre yapılmıştır. 15 g homojenize edilmiş örnek, üzerine 120 ml metanol/kloroform (1/2) eklendikten sonra warring blender ile karıştırılmıştır. Daha sonra bu örnekler üzerine 20 ml %0.4'lük CaCl₂ solüsyonundan eklenerek süzme kağıdından (Scliecher&Schuell, 5951/2 185 mm) süzülen örnekler, 105°C'de 1 saat etüvde bekletilip darası alınmış olan balon jodelere süzdürülmüştür. Bu balonlar, ağızları hava almayacak şekilde kapatılıp 1 gece karanlık bir ortamda bekletilmiş ve ertesi gün metanol-sudan oluşan üst tabaka bir ayırma hunisi yardımıyla alınmıştır. Balonların içinde kalan kloroform lipit kısmından kloroform 60°C'de su banyosunda rotary evaporatör kullanılarak uçurulmuştur (Heidolph Basis Hei-Vap MI). Daha sonra balonlar etüvde 1 saat süreyle 60°C'de bekletilerek içerisindeki kloroformun tamamının uçması sağlanmış (Termal G11540SD) ve bir desikatör içerisinde oda sıcaklığına kadar soğutulup 0.1 mg duyarlı hassas terazide tartılmıştır (Precisa XB 220A). Lipit oranının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Lipit Miktarı (\%)} = \frac{[\text{Balon Darası(g)} + \text{Lipit (g)}] - [\text{Balon Darası (g)}] \times 100}{\text{Örnek Miktarı (g)}} \quad (3.4)$$

3.2.4.2. Kül Analizi

Ham kül analizinde kullanılan porselen krozeler ilk önce 103°C'de 1 saat süreyle etüvde kurutulup daha sonra desikatörde soğutulduktan sonra 0.1 mg duyarlı hassas terazide daraları alınmıştır. Krozeler içerisine homojenize edilmiş örnekten 3.3-5 g tartılıp bu örnekler 4 saat +550°C'de rengi açık gri oluncaya kadar yakılmış (Protherm PLF 110/10) ve ardından desikatör içinde oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra, hassas terazide tartılmıştır. (AOAC, 1990). Örneğe ait % ham kül sonuçları aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Ham Kül (\%)} = \frac{[\text{Dara (g)} + \text{Ham Kül(g)}] - \text{Dara(g)} \times 100}{\text{Örnek Miktarı}} \quad (3.5)$$

3.2.4.3. Nem analizi

Nem analizi AOAC (1990)'in uyguladığı yöntem esas alınarak yapılmıştır. Petri kutuları etüvde 105°C'de 1 saat süreyle kurtulmuş ve desikatörde 30 dakika süreyle soğutulduktan sonra 0.1mg duyarlı hassas terazide darası alınmıştır. Daha sonra homojenize edilmiş örnekten darası alınan petrilere yaklaşık 4-5g koyularak sabit bir ağırlığa ulaşana kadar 105°C'de (24 saat) kurutulmuştur. Bu işlemin ardından oda sıcaklığına kadar soğumaları için desikatöre yerleştirilmiş ve 0.1mg duyarlı hassas terazide tartılarak sonuçlar kaydedilmiştir. Analiz sonucunda örneğe ait nem miktarı aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Nem miktarı (\%)} = \frac{\text{İlk Tartım} - \text{Son Tartım} \times 100}{\text{Örnek Miktarı (g)}} \quad (3.6)$$

3.2.4.4. Protein Analizi

Hidroliz solüsyonunda, hidroliz işleminin optimizasyonun belirlenmesi için protein miktarı Lowry metodu (1951)' na göre belirlenmiştir. Protein miktarları oluşturulan standart kalibrasyon grafiğinden yararlanarak hesaplanmıştır. Protein standardı olarak bovine serum albümin kullanılmıştır.

3.2.4.5. Sodyum Dedosil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Analizi

Liyofilizatörde kurutulan (Labfreez FD-10-MR) 3 g toz hidrolizat 27 ml %5 SDS içerisinde ekstrakte edilmiş ve ekstraktlar 85°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hidrolizat ekstraktı 3500g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz protein profillerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Protein ekstraktlarının protein konsantrasyonları, Lowry metodu (1951)' na göre belirlenmiş ve protein standardı olarak bovine serum albümin kullanılmıştır. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) Laemmli (1970) metoduna göre %4 toplayıcı jel ve %16 ayırıcı jel kullanılarak çalıştırılmıştır. Jele 30 µl (1 µg / µl) örnek yüklenmiş ve jeller sabit akımda (200 volt) yürütülmüştür. Molekül ağırlık kalibrasyon standartları olarak yüksek ve düşük molekül ağırlıklı protein standartları karışımı (161-0317, BioRad) kullanılmıştır. Standartta yer alan proteinler; miyozin (200 kDa), β-galaktosidaz

(116,250 kDa) fosforilaz b (97,400 kDa), sığır serumu albümini (66,200 kDa), ovalbümin (45 kDa), karbonik anhidraz (31 kDa), tripsin önleyicisi (21,500 kDa), lizozim (14.400 kDa) ve aprotinin (6,5 kDa)' dir. Elektroforez işlemi, Bio-Rad Mini Protean elektroforez düzeneği ve Bio-Rad Model PowerPac Basic güç kaynağı kullanılarak yapılmıştır. Jel üzerindeki protein bantlarını görüntülemek için Coomassie parlak mavisi (R-250) ve gümüş nitrat ile boyama yapılmıştır.

3.2.4.5.1. Coomassie Parlak Mavisi (R-250) ile Boyama

Jeller, %10 asetik asit ve %40 metanol içeren çözelti içinde 15 dakika SDS'in uzaklaştırılması için yıkanmış, %0.125 Coomassie parlak mavisi (R-250) kullanılarak hazırlanan boya çözeltisinde 45 dakika boyandıktan sonra, %10 metanol ve %5 asetik içeren çözelti içinde, jel zemininden boya uzaklaştırılana kadar bekletilmiştir (Laemmli, 1970).

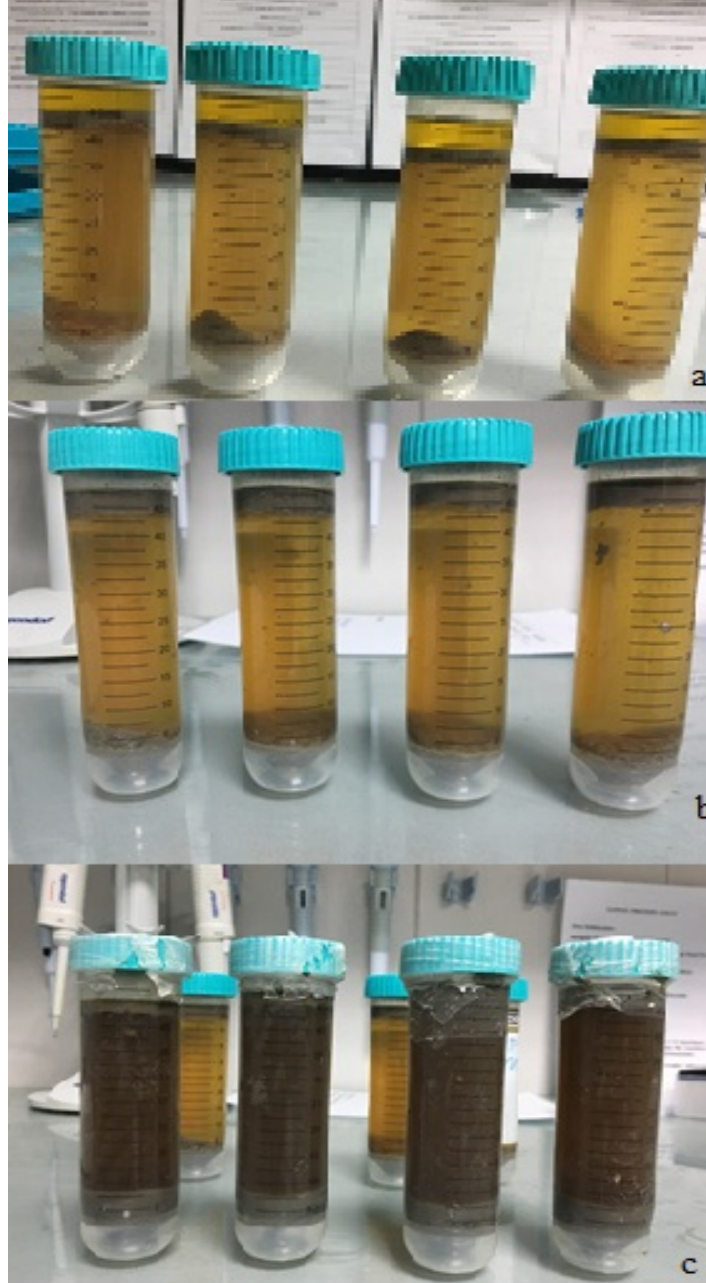
3.2.4.5.2. Gümüş Nitrat ile Boyama

Jeller en az 2 saat fiksatifte (%50 (v/v) metanol, %10 (v/v) asetik asit ve ,50uL formalaldehit/ 100 mL çözelti) bekletilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra jel yıkama çözeltisi (%50 etanol) ile iki defa 20'er dakika yıkanmıştır. Jeller %0.02 (w/v) sodyum tiyosülfat ile 2 dakika muamele edildikten sonra üç defa ultra saf su ile 5'er dakika yıkanmıştır. Ardından 30 dakika boyunca soğuk (4°C) su ile hazırlanmış boyama çözeltisi (%0.2 (w/v) gümüş nitrat) ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Jel iki defa ultra saf su ile hızlıca çalkalandıktan sonra %6 (w/v) sodyum karbonat, %0.05 (v/v) formaldehit,%2 sodyum thiosülfat çözeltisi ile istenilen yoğunlukta protein spotları gözlenene dek (~30 dakika) inkübe edilmiştir. Protein spotları oluşuktan sonra reaksiyon oluşumunu durdurmak amacı ile %5 (v/v) asetik asit ile 10 dakika muamele edilmiştir. İşlem sonunda jel %1 asetik asit çözeltisinde 4°C'de (maksimum 1 hafta) depolanmıştır.

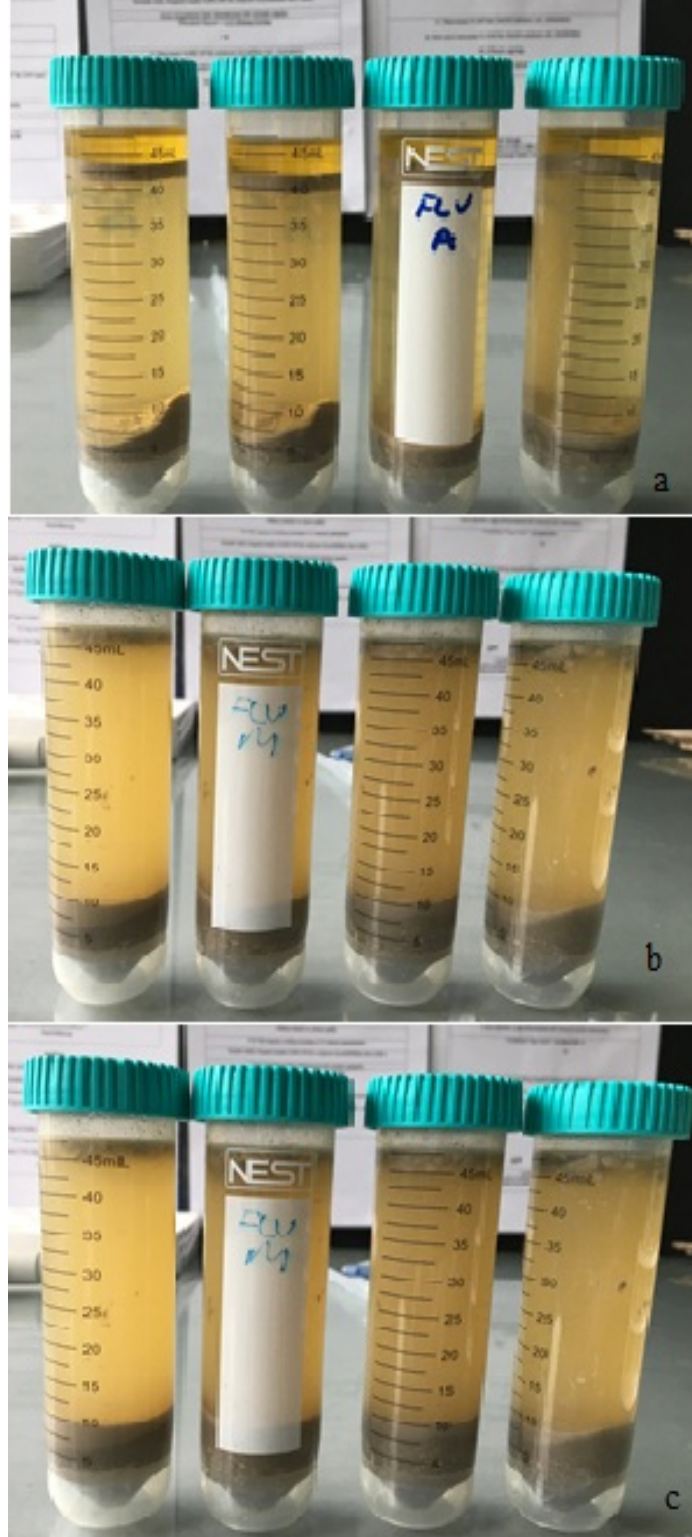
3.2.4.6. Hidroliz Derecesi için Araştırma Modeli ve İstatistiksel Analiz

Alkali proteaz enzimi ile yapılan hidrolizatların hidroliz derecesi(%HD) için Box-Benkhan (1960) modeli kullanılmıştır. Farklı değişkenlerin üç seviyedeki etkilerini değerlendirmek için iki kez ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Tarama deneylerinin ilk kümesinde, üç değişkenin hidroliz derecesi (%HD) üzerindeki

etkileri: X_1 (sıcaklık 40-50-60 °C), X_2 (zaman 1, 4.5 ve 8 saat), X_3 (enzim oranı 1, 1.5, 2 %) en yüksek hidroliz derecesi (%HD) koşulları etkili bir şekilde belirlemek için Cevap Yüzeği Yöntemi Box-Behnken tasarımı (BBD) kullanılarak araştırılmıştır. Çizelge 3.1’de gösterildiği gibi, belirlenen parametreler, en dik çıkış yöntemi kullanılarak tek faktörlü deney sonuçlarına dayanılarak seçilmiştir.



Şekil 3.3. Alkali proteaz enzimi kullanılarak CYY Box-Benken modeli ile optimize edilerek üretilen hidrolizat sıvısı ve fazları a)Alabalık atığı hidrolizat sıvısı ve fazları b)Mezgit atığı hidrolizat sıvısı ve fazları c)Hamsi atığı hidrolizat sıvısı ve fazları



Şekil 3.4. Flavorenzim kullanılarak CYY Merkezi Birleşik Tasarım modeli ile optimize edilerek üretilen üretilen hidrolizat sıvısı ve fazları a)Alabalık atığı hidrolizat sıvısı ve fazları b)Mezgit atığı hidrolizat sıvısı ve fazları c)Hamsi atığı hidrolizat sıvısı ve fazları

Alkali proteaz enzimi ile yapılan hidrolizatların hidroliz derecesi için Box-Benkan (1960) modeli kullanılmıştır. Farklı değişkenlerin üç seviyedeki etkilerini değerlendirmek için iki kez ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Tarama deneylerinin ilk kümesinde, üç değişkenin hidroliz derecesi (%HD) üzerindeki etkileri: X₁ (sıcaklık 40-50-60 °C), X₂ (zaman 1, 4.5 ve 8 saat), X₃ (enzim oranı 1, 1.5, %2) en yüksek hidroliz derecesi koşulları etkili bir şekilde belirlemek için Cevap Yüzeyi Yöntemi Box-Behnken tasarımı (BBD) kullanılarak araştırılmıştır. Çizelge 3.1’de gösterildiği gibi, belirlenen parametreler, en dik çıkış yöntemi kullanılarak tek faktörlü deney sonuçlarına dayanılarak seçilmiştir.

Çizelge 3.1. BBD tasarım modelinde bağımsız değişken ve kodlanmış düzeyler

Bağımsız Değişken	Kodlanmış Düzeyler		
	-1	0	+1
Sıcaklık (°C)(X ₁)	40	50	60
Zaman (Saat)(X ₂)	1	4.5	8
Enzim (%) (X ₃)	1	1.5	2

Üç faktör deneyi için on beş deneysel tasarım (yani, on iki faktöriyel nokta ve üç merkezi nokta) gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2). Her bir durumun üç deneysel kopyası yapılarak ortalama değerler deneysel cevap olarak ifade edilmiştir. Deneysel çalışmalar, gözlemlenen cevaplarda beklenmedik değişkenliğin etkilerini en aza indirmek üzere optimize edilmiştir. Değişkenler, aşağıdaki denkleme göre kodlanmıştır

$$X = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \quad (3.7)$$

Burada x kodlanmış değer, X_i; karşılık gelen gerçek değer, X₀; alanın merkezinde gerçek değer ve ΔX; x'in 1 biriminin bir varyasyonuna karşılık gelen X_i artışını ifade etmektedir.

Çizelge 3.2. Bağımsız değişkenler x1 (sıcaklık (°C), x2 (zaman (saat), x3 enzim (%)) ve kodlu değişkenler (X₁,X₂,X₃) için box-benkhen dizayn

	Kodlu değişkenler			Bağımsız değişkenler			Y	
	X ₁	X ₂	X ₃	x1 (°C)	x2 (SAAT)	x3 (%)	HD %	
6	1	1	0	-1	60	4.5	1	-
15	2	0	0	0	50	4.5	1.5	-
8	3	1	0	1	60	4.5	2	-
14	4	0	0	0	50	4.5	1.5	-
12	5	-1	0	-1	50	8	2	-
2	6	1	-1	0	60	1	1.5	-
3	7	-1	1	0	40	8	1.5	-
5	8	-1	0	-1	40	4.5	1	-
7	9	-1	0	2	40	4.5	2	-
11	10	0	0	1	50	1	2	-
1	11	0	-1	0	40	1	1.5	-
13	12	0	0	0	50	4.5	1.5	-
10	13	0	1	-1	50	8	1	-
4	14	1	1	0	60	8	1.5	-
9	15	0	-1	-1	50	1	1	-

Hidrolizatlara ait veriler, ANOVA'nın indirgenmiş önerilen modelleri vasıtasıyla bir Cevap Yüzeyi Yöntemi (CYY) ne göre uygulanmıştır. CYY, optimum hidroliz derecesi için bir dizi deneysel koşul belirlenerek DesignExpert® 10.0 (Stat Ease, Inc., Minneapolis, MN, ABD, 2010) tarafından değerlendirilmiştir. Hidroliz derecesi açısından cevap (Y), aşağıdaki istatistiksel modele uyması için CYY ile analiz edilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (3.8)$$

Bu modelde Y tahmini cevap ve X₁, X₂ ve X₃ bağımsız değişkenler, β₀, sabit katsayı β₁, β₂, β₃ lineer katsayı, β₁₁, β₂₂, β₃₃ kare katsayısı, β₁₂, β₁₃, β₂₃ parametreler arasındaki karşılıklı etkileşimi gösteren katsayıdır.

Protameks ve flavourenzim ile yapılan hidrolizatların hidroliz derecesi için Merkezi Birleşik Tasarım (CCD) modeli kullanılmıştır.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{i1} X_i^2 \quad (3.9)$$

Bu karesel model n tane değişkenin lineer etkilerini, karesel etkilerini ve aralarındaki etkileşimlerini dikkate almaktadır. Bu modelde Y tahmini cevap, β_0 , sabit katsayı, β_i , lineer katsayı, β_{ij} , i ve j değişkenleri arasındaki etkileşim etkisini ve k faktör sayısını tarif etmektedir

Deneyin ikinci derecesinde, CYY ile HD (%) cevabı bakımından optimum ekstraksiyon koşulu seçilmiştir. Deneysel modelin geçerliliğini doğrulamak için daha sonra doğrulama deneyleri yapılmıştır. Optimum koşula bağlı olarak, dış faktörlerin ve istenen fonksiyonel özelliklerin etkisi altında özelliklerini değerlendirmek için optimum süre, sıcaklık ve enzim oranı kullanılarak balık atıklarından hidrolizatlar elde edilmiştir. (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6)



Şekil 3.5. Alkali proteaz enzimi kullanılarak CYY Box-Benken modeli ile optimize edilerek üretilen a)Alabalık atığı hidrolizatı b)Mezgıt atığı hidrolizatı c)Hamsi atığı hidrolizatı



Şekil 3.6. Alabalık, mezgit ve hamsi atığı hidrolizatı üretimine ait fotoğraflar

3.2.4.7. Aminoasit Analizi

3.2.4.7.1. Toplam Amino Asit Analizi

Numunelerde toplam amino asit miktarı Lee ve Hwang (2017) ile Chan ve Matanjun (2017) 'ın kullandığı yöntemler modifiye edilerek LC-MS/MS cihazında yapılmıştır. Bu yönteme göre, homojenize edilmiş 0,2 g örnek, içerisinde 10 mL 6 N HCl bulunan çözeltiliye tartılıp karışım ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra test tüpü 5 dakika vorteks ile karıştırılıp 110°C'deki fırında 24 saat hidrolizin tamamlanması için bekletilmiştir. Oda sıcaklığına soğutulan karışım 4°C de 4000 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen üst faz 0.45 µm PTFE membran filtreden geçirildikten sonra LC-MS/MS cihazına enjekte edilmiştir. Kıvrak (2015)'ın bildirdiği cihaz koşullarında gerekli modifikasyonlar yapılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Esansiyel aminoasitlerin içeriği dikkate alınarak, protein hidrolizatının kimyasal skorları, FAO/WHO (1990) tarafından belirlenen standart proteinin esansiyel aminoasit içeriğine göre kimyasal skor Formül 3.10 'a göre hesaplanmıştır.

$$\text{Kimyasal Skor} = \frac{\text{Hidrolizattaki E.A.A (g 100 g}^{-1}\text{)}}{\text{Standart proteindeki E.A.A (g 100 g}^{-1}\text{)}} * 100 \quad (3.10)$$

3.2.4.8. İz element Analizi

İz element analizi ICP-MS cihazı yardımı ile Intarasirisawat ve ark. (2011)'nın belirttiği yönteme göre yapılmıştır. Buna göre 0.1 gr numune, mikrodalga yakma kaplarına tartılıp üzerine 4 ml nitrik asit eklenmiş ve ağzı kapatılan teflon kaplarda mikrodalga cihazında yakılmıştır. Yakma işlemi tamamlandıktan sonra örnekler, balon jöjeye aktarılıp 10 ml hacime kadar saf su ile tamamlanmıştır. Balon jöje içerisindeki örnek ICP-MS cihazına verilerek iz element analizi gerçekleştirilmiştir. ICP-MS cihazında argon gazının plazma içerisine akış hızı, destek ve nebulizatör hızı sırasıyla 15, 0.2 ve 0.8 L/dakika olmakla birlikte örnek akış hızı 1.5 ml/dakika olarak ayarlanmış, örneklerin iz element miktarları mg/kg cinsinden verilmiştir.

3.2.5. İstatistiksel Analizler

Optimizasyon deneyleri, Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) faktörel tasarım modellerinden BBD ve CCD, STATISTICA (Statsoft, 1999)'nın deneysel tasarım modülü kullanılarak analiz edilmiştir. Optimize edilmiş koşulları elde etmek için CYY vasıtasıyla elde edilen verilerin analizinde, aynı yazılım kullanılmıştır.

Balık atıklarının kimyasal kompozisyonu CYY göre optimize edilen hidrolizatların protein geri kazanımı, hidroliz derecesi, aminoasit ve iz element içeriklerinin balık ve enzim türlerine göre değişimini belirlemek için SPSS 16.0 paket programı kullanılarak Duncan çoklu karşılaştırma testi ($P < 0.05$ önem düzeyinde One-way Anova) uygulanmıştır (Duncan, 1955).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Balık Atıklarının Kimyasal Kompozisyonu

Balık atıklarının kimyasal kompozisyonunu belirlemek için yapılan istatistiksel analizde; alabalık, mezigit ve hamsi atığının ham protein düzeyleri arasındaki farkın önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Mezigit atığında ve hamsi atığındaki lipit içerikleri sırasıyla %6.06 ve %7.23 olarak saptanmıştır ve aralarındaki fark önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). En yüksek lipit içeriği ise %22.11 ile alabalık atığında tespit edilmiştir ($p<0.05$). Kül içeriğinde en yüksek değer %4.08 ile hamsi atığında bulunmuştur ($p<0.05$). Alabalık %3.06 ve mezigit atığı %3.22 arasındaki farkın önemli olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$) (Çizelge 4.1). Sarıkuyruk ve skip jack türü ton balığı atığında sırasıyla ham protein için %10.91 ve %17.5, yağ için %4.42 ve %2.60, ham kül için %1.88 ve %1.90 ve nem için %73.17 ve %74.51 olarak bulmuşlardır. Koç (2016)' un, hamsi atığı için elde ettiği değerlerin bu çalışmada elde edilen sonuçlara yakın olduğu görülmektedir. Buna göre araştırmacı hamsi atığının nem, ham protein, yağ ve ham kül içeriklerini sırasıyla %73.85, %14.54, %6.60 ve %5.00 olarak saptamıştır. Balık atıklarının kimyasal kompozisyonu balığın türüne, atığın vucüt parça oranlarına, mevsime ve balığın büyüklüğüne göre değişebilmektedir (Benjakul ve Morisey, 1990).

Çizelge 4.1. Alabalık, mezigit ve hamsi atıklarının kimyasal kompozisyonu (%)

Kimyasal Kompozisyon (%)				
	Protein	Lipit	Kül	Nem
Alabalık	13.15±0.45 ^a	22.11±0.25 ^b	3.06±0.08 ^a	58.70±0.54 ^b
Mezigit	11.94±0.39 ^a	6.06±0.28 ^a	3.22±0.14 ^a	77.64±0.16 ^a
Hamsi	12.17±0.44 ^a	7.23±0.12 ^a	4.08±0.11 ^b	76.44±0.25 ^a

Üç balık atığının ham protein düzeyleri kuru madde bazında ele alındığında aralarındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). En yüksek protein içeriği ise önemli bir şekilde %56.25 ile mezigit atığında tespit edilmiştir ($p<0.05$). Mezigit ve hamsi atığındaki lipit içerikleri sırasıyla %28.56 ve %30.79 olarak saptanmıştır ($p>0.05$). En yüksek lipit içeriği ise önemli bir şekilde %57.71 ile alabalık atığında tespit edilmiştir ($p<0.05$). Balık atıklarının kül içerikleri sırasıyla hamsi atığında %17.37, mezigit atığında %15.19 ve alabalık atığında %7.98 olarak tespit edilmiştir

(Çizelge 4.2.) ve aralarında farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.2. Alabalık, mezzit ve hamsi atıklarının kimyasal kompozisyonu (g/100 g kuru madde)

Kimyasal Kompozisyon (g/100 g kuru madde)			
	Protein	Lipit	Kül
Alabalık	34.31±1.16 ^a	57.71±0.65 ^b	7.98±0.39 ^a
Mezzit	56.25±1.84 ^c	28.56±1.30 ^a	15.19±0.68 ^b
Hamsi	51.84±1.59 ^b	30.79±0.50 ^a	17.37±0.45 ^c

4.2. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile Hidroliz Parametrelerinin Optimizasyonu

Balık atıklarından hidrolizat üretimi ile ilgili çalışmalarda belirlenen hidrolizat deneyleri sonucunda belirlenen en uygun sıcaklık, zaman ve enzim konsantrasyon aralıkları dikkate alınarak, deney tasarımları Cevap Yüzeyi Yöntemi (CYY) ile Box-Behnken (BBD) ve Merkezi Birleşik Tasarımlarına (CCD) göre yapılmıştır. Önerilen matematiksel modeller varyans analizi (ANOVA) ve regresyon istatistiksel yöntemi ile değerlendirilmiştir. Yöntemde deneysel çalışma aralıkları olarak en düşük sıcaklık değeri 40°C en yüksek sıcaklık değeri olarak 60°C, en düşük zaman 1 saat ve en yüksek zaman 8 saat olarak en düşük enzim oranı %1 ve en yüksek %2 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada, alkali proteaz enzimi ile hidrolizasyon çalışması Box-Behnken (BBD) kullanılarak üç faktörlü (sıcaklık, zaman, enzim oranı)-üç düzeyli (-1,0,1), protameks ve flavourenzim için Merkezi Birleşik Tasarımlarını (CCD) kullanılarak iki faktörlü (zaman, enzim oranı)-üç düzeyli (-1,0,1) olarak analiz edilmiştir.

4.2.1. Alabalık Atıklarının Alkali Proteaz Enzimi ile Optimizasyonu

BBD faktöriyel dizayn kullanılarak belirlenen sıcaklık, zaman ve enzim konsantrasyonu bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, deneysel ve yöntem tarafından öngörülen hidroliz derecesi (%HD) Çizelge 4.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Alabalık atıklarında alkali proteaz enzimi ile gerçek bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler tepki değişkeni, HD (%), Y

	X₁	X₂	X₃	Y
1	60	4.5	1	66.32
2	50	4.5	1.5	62.76
3	60	4.5	2	65.30

Çizelge 4.3' ün devamı

4	50	4.5	1.5	62.76
5	50	8	2	67.52
6	60	1	1.5	65.71
7	40	8	1.5	61.94
8	40	4.5	1	60.43
9	40	4.5	2	61.28
10	50	1	2	62.14
11	40	1	1.5	60.88
12	50	4.5	1.5	62.76
13	50	8	1	66.56
14	60	8	1.5	66.26
15	50	1	1	61.62

X₁: sıcaklık, X₂: zaman, X₃: enzim Y: hidroliz derecesi(%HD)

Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) tarafından en uygun model olarak 14.30 F değeri ve 0.0004 P değeri (P>F) ile lineer model önerilmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. CYY ile alabalık atıklarında alkali proteaz enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Ortalama	60703.51	1	60703.51			
Lineer	63.42	3	21.14	14.30	0.0004	Önerilen
2FI	0.99	3	0.33	0.17	0.9120	
Quadratik	5.39	3	1.80	0.91	0.4989	
Kübik	9.88	3	3.29			
Kalan	0.000	2	0.000			
Toplam	60783.19	15	4052.21			

Çizelge 4.5. Alkali proteaz enzimi kullanılarak alabalık atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin RSM lineer model ANOVA tablosu

	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Model	63.42	3	21.14	14.30	0.0004	*
A-Sıcaklık	45.41	1	45.41	30.72	0.0002	
B-Zaman	17.80	1	17.80	12.04	0.0052	
C-Enzim	0.21	1	0.21	0.14	0.7123	
Arta kalan	16.26	11	1.48			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	16.26	9	1.81			ö.s
Hata	0.000	2	0.000			
Düzeltilmiş toplam	79.68	14				
R ²	0.7959					
Adj R ²	0.7402					
Pred R ²	0.5903					
Sinyal/Gürültü oranı	12.340					

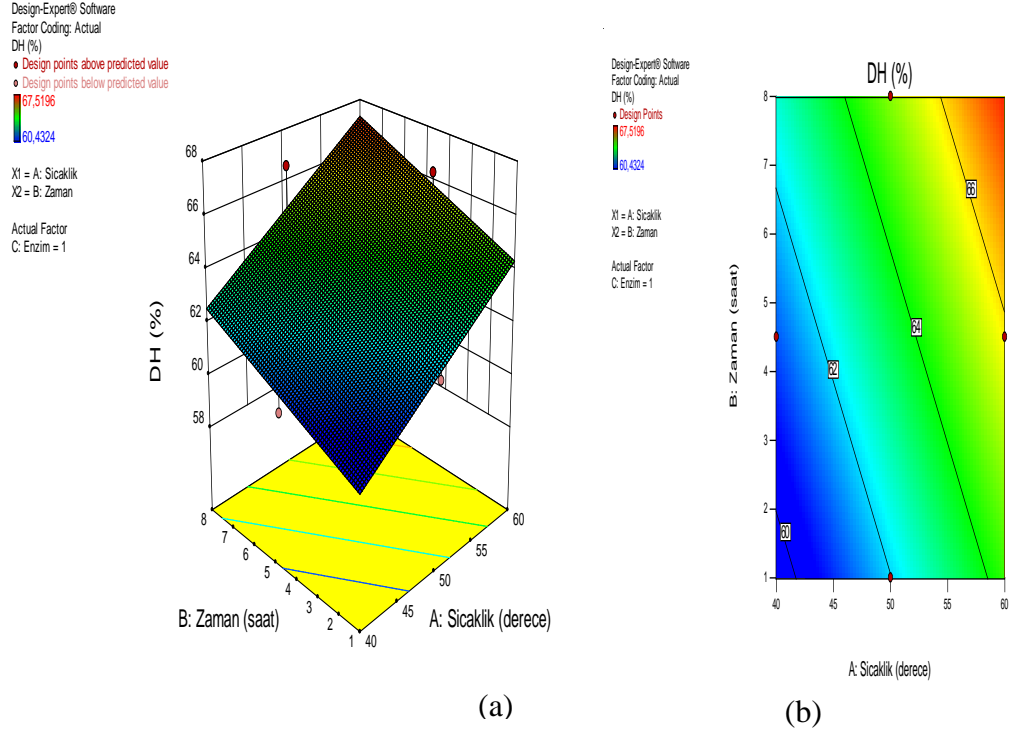
ANOVA analizinde her bir terimin anlamlılığı bu terimlerin karşılığı olan F değeri, p değeri ve kareler toplamı vasıtasıyla belirlenmektedir. Büyük F değeri, karşılık gelen terimin çok fazla anlamlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca, F değerine bağlı olan p değeri F değerinin yeterince büyük bir değere sahip olup olmadığını göstermek için kullanılabilir. $P > F$ değeri hangi parametrenin etkin olduğunu göstermektedir. $P > F$ değeri 0.05 küçük olan parametrelerin daha etkin olduğu bilinmektedir (Trinh ve Kang, 2010). Modelde, $Pred R^2$ değeri 0.5903 ve $Adj R^2$ 0.7402 ve sinyal / gürültü oranı 12.340 olarak bulunmuştur. Bu değer modelin uygun bir sinyali olduğunu göstermektedir. Çalışmanın uyum eksikliği (lack of fit) değeri ise önemsiz bulunmuştur. Uyum eksikliğinin önemsiz bulunması önerilen lineer modelin uyumlu olduğunu göstermektedir. DH değeri üzerine Lineer model terimlerinden, sıcaklık (A) ve zaman (B) istatistiksel olarak önemli bulunurken ($p < 0.05$), enzim konsantrasyonunun (C) ise önemli bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur ($p > 0.05$). Formül 4.1 de regresyonunun grafiksel gösterimleri olan cevap yüzeyleri verilmiştir.

$$Y = 62.76 + (2.38 * X_1) + (1.49 * X_2) + (0.16 * X_3) \quad (4.1)$$

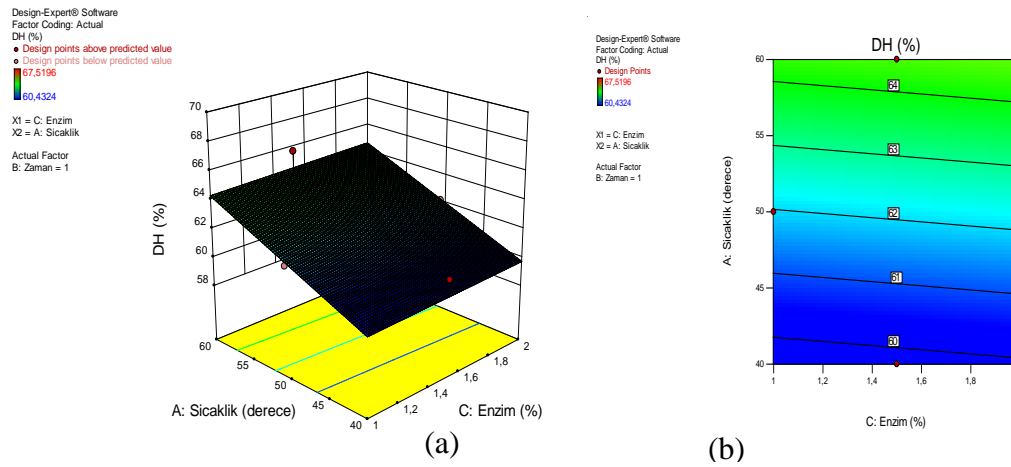
Optimizasyonu sağlanmış hidrolizasyonun, istenilebilir profil, hidroliz derecesinin 65.80'e yükseldiği 60°C sıcaklık 1 saat ve %1 enzim konsantrasyonu ile birlikte optimum hidroliz derecesine ulaşılabileceğini göstermektedir. Alabalık atıklarından alkali proteaz enzimi ile sıcaklık ve zamana bağlı HD(%) değişimini gösteren üç boyutlu grafik ve kontur grafik Şekil 4.1. de, sıcaklık ve enzime bağlı HD(%) değişimini gösteren 3 boyutlu grafik ve kontur ise Şekil 4.2 de gösterilmiştir. HD(%) için model denklem, alabalık atık proteinlerinin üç bağımsız değişkenin (X_1 , X_2 , ve X_3) onların etkileşimlerin fonksiyonu olarak tepki değişkeni (Y), temel faktörlerin sabit doğrusal ve 2. dereceden uyumlama katsayıları ve etkileşimlerin doğrusal uyumlama katsayıları Çizelge 4.6 kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Alabalık atıklarında alkali proteaz enzimi kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regresyon katsayıları ve bunların etkileşimleri

Faktör	Regrasyon Katsayısı
Sabit (Intercept)	63.62
A-Sicaklik	2.38
B-Zaman	1.49
C-Enzim	0.16



Şekil 4.1. CYY ile alabalık atıklarında alkali proteaz enzimi ile sıcaklık ve zamana göre HD(%) değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik, (b) kontür grafik



Şekil 4.2. CYY ile alabalık atıklarında alkali proteaz enzimi ile sıcaklık ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik, (b) kontür grafik

Benjakul ve Morrisey (1997), pasifik merlanının katı atık proteinleri için optimum hidrolize koşullarını 9.5 pH, 60 derece hidroliz sıcaklığı, 60 dakika hidroliz süresi ve katı atık ve tampon karışımı için (1:1 w/v) 20 Aukg'lik enzim seviyesi olarak bulmuşlardır. Benjakul ve Morrisey'in (1997) bulguları bu çalışmada bulunanlardan oldukça yüksektir. Bunun sebebi muhtemelen farklı koşul kombinasyonları denirken diğerlerini sabit tutmalarıdır. Bu çalışma sonucunda elde edilen yüksek hidroliz seviyeleri, hidrolizatların acılığını azaltabileceği (Adler-Nissen, 1984) ve alkalazın diğer proteazlara göre daha az acı hidrolizatlar ortaya çıkardığı da rapor edilmiştir (Hoyle ve Meritt, 1994; Benjakul ve Morrisey, 1997).

Tahmin edilen ve yukarıdaki uyumlama denklemi ile elde edilen HD(%), deneysel HD(%)'e yakındır (Çizelge 4.7) ve bu da modelin alabalık atık proteinlerini etkileyen farklı deneysel değerler kombinasyonlarında HD(%)'nin tahmin etmekteki kullanılabilirliğini göstermektedir.

Çizelge 4.7. Alabalık atıklarında alkali proteaz enzimi ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen hidroliz derecesi (HD %)

	Optimum koşullar			Cevap
	X ₁	X ₂	X ₃	Y
Tahmin Edilen	60	1	1	65.80
Deney Sonucu				64.35

X₁: sıcaklık, X₂: zaman, X₃: enzim, Y: hidroliz derecesi(%)

4.2.2. Mezgit Atıklarının Alkali Proteaz Enzimi ile Optimizasyonu

BBD faktöriyel dizayn kullanılarak belirlenen mezgit atıklarında alkali proteaz enzimi ile elde edilen hidrolizdeki sıcaklık, zaman ve enzim konsantrasyonu bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, deneysel ve yöntem tarafından öngörülen HD(%) Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Mezgit atıklarında alkali proteaz enzimi ile gerçek bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler tepki değişkeni, HD(%) (Y)

	X ₁	X ₂	X ₃	Y
1	50	4.5	1.5	49.43
2	40	4.5	2	50.04
3	60	1	1.5	57.47
4	60	4.5	1	53.48

Çizelge 4.8' in devamı

5	50	1	2	52.39
6	40	8	1.5	52.38
7	50	1	1	52.99
8	50	4.5	1.5	49.44
9	50	8	2	46.07
10	60	8	1.5	53.08
11	50	4.5	1.5	49.44
12	50	8	1	46.40
13	60	4.5	2	53.21
14	40	1	1.5	58.47
15	40	4.5	1	60.13

X₁: sıcaklık, X₂: zaman, X₃: enzim Y: hidroliz derecesi(%)

CYY ile mezzit atıklarında alkali proteaz enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda 0.007 p değeri (P>F) ile quadratik model önerilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. CYY ile mezzit atıklarında alkali proteaz enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Ortalama	41020.82	1	41020.82			
Lineer	86.11	3	28.70	2.15	0.151	
2FI	24.85	3	8.28	0.54	0.666	
Quadratik	108.65	3	36.22	13.84	0.007	Önerilen
Kübik	13.09	3	4.36			
Kalan	0.000	2	0.000			
Toplam	41253.52	15	2750.23			

Formül 4.2 tarafından ifade edilen model quadratik bir formüldür ve denklemini aşağıdaki gibidir:

$$Y=49.44+(-0.47*X_1)+(5.33*X_1^2)+(-2.92*X_2)+(0.58*X_2^2)+(-1.41*X_3) \quad (4.2) \\ +(-0.56*X_3^2)+(0.42*X_1*X_2)+(2.46*X_1*X_3)+(0.067*X_2*X_3)$$

HD(%) için model denklem, alabalık atık proteinlerinin üç bağımsız değişkenin (X₁, X₂, ve X₃) onların etkileşimlerin fonksiyonu olarak tepki değişkeni (Y), temel faktörlerin sabit doğrusal ve 2. dereceden uyumlama katsayıları ve etkileşimlerin doğrusal uyumlama katsayıları Çizelge 4. 10'uda kullanılarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.10. Mezgit atıklarında alkali proteaz kullanarak, optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri

Faktör	Regrasyon Katsayısı
Sabit (Intercept)	49.44
A-Sıcaklık	-0.47
B-Zaman	-2.92
C-Enzim	-1.41
AB	0.42
AC	2.46
BC	0.067
A ²	5.33
B ²	0.58
C ²	-0.56

Cevap yüzeyi quadratik formül için elde edilen varyans analizi (ANOVA) Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Alkali proteaz enzimi kullanılarak mezgit atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F
Model	219.61	9	24.4	9.32	0.0121 *
A-Sıcaklık	1.76	1	1.76	0.67	0.4491
B-Zaman	68.39	1	68.39	26.13	0.0037
C-Enzim	15.96	1	15.96	6.1	0.0566
AB	0.72	1	0.72	0.28	0.622
AC	24.11	1	24.11	9.21	0.0289
BC	0.018	1	0.018	6.80E-03	0.9375
A ²	104.96	1	104.96	40.1	0.0014
B ²	1.25	1	1.25	0.48	0.5207
C ²	1.14	1	1.14	0.44	0.5378
Arta kalan	13.09	5	2.62		
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	13.09	3	4.36		
Hata	0	2	0		
Düzeltilmiş Toplam	232.7	14			
R ²			0.9438		
R ² Adj			0.8425		
Pred R ²			0.1001		
Sinyal/Gürültü oranı			10.580		

9.32 Model F değeri, modelin anlamlı olduğunu ifade etmektedir. 0,0121 Prob>F değerinin 0,0500'den küçük olması model terimlerinin anlamlı olduğunu göstermektedir. HD(%) için bulunan ikinci dereceden modelin R^2 0.9438 ve R^2 Adj 0.8425 değerlerinin 1'e çok yakın olması deneysel değerlerle model tarafından öngörülen değerlerin çok iyi bir uyum içerisinde olduğunu göstermektedir. Sinyal / gürültü oranının 4'den büyük bir oranda olması istenir. Bu çalışmada, 10.580 sinyal / gürültü oranı ile modelin uygun bir sinyale sahip olduğunu göstermektedir. Modelin uyum eksikliği (lack of fit) ise önemsiz bulunduğundan seçilen modelin uyumlu olduğu görülmektedir.

DH üzerine, zaman (B), sıcaklık (A), enzim konsantrasyonu (C) interaksiyonu ve A^2 değerleri istatistiksel olarak önemli bulunurken ($p < 0.05$), sıcaklık (A) ve enzim konsantrasyonu (C)' nun önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur ($p > 0.05$).

Optimizasyonu sağlanmış hidrolizasyonun, istenilebilir profil, hidroliz derecesinin 56.81 'e yükseldiği 60 °C sıcaklık 1 saat ve %1.270 enzim konsantrasyonu ile birlikte optimum hidroliz derecesine ulaşılabileceğini göstermektedir. Mezgit atıklarından alkali proteaz enzimi ile sıcaklık ve zamana bağlı HD (%) değişimini gösteren üç boyutlu grafik ve kontur grafik Şekil 4.3. de, sıcaklık ve enzime bağlı HD(%) değişimini gösteren 3 boyutlu grafik ve kontur ise Şekil 4.4 de, enzim ve zamana bağlı HD(%) değişimini gösteren 3 boyutlu grafik ve kontur ise Şekil 4.5 de gösterilmiştir.

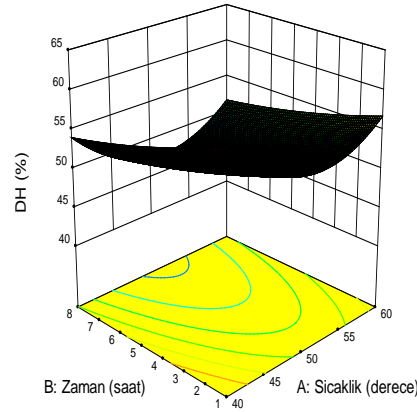
Çalışmada, bağımsız olarak zaman ve enzim konsantrasyonu ile sıcaklık-enzim ikilisinin HD(%) üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu ($p < 0.05$) fakat sıcaklığın ise önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Tahmin edilen ve yukarıdaki uyumlama denklemi ile elde edilen HD(%), deneysel HD(%)'ye yakın bulunmuştur (Çizelge 4.12) ve bu da atık proteinlerini etkileyen farklı deneysel değerler kombinasyonlarında atık proteinlerinin HD(%)'sini tahmin etmekteki kullanılabilirliğini göstermektedir. HD(%) için sonuçta oluşan uyumlama katsayısı deneysel işlemlerde ve sağlama işlemlerinde yüksek korelasyon değerleri (1.0'e yakın) ile tahmin modelinin geçerliliğini göstermektedir.

Çizelge 4.12. Mezgit atıklarında alkali proteaz ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen HD (%)

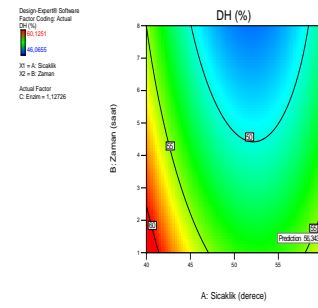
	Optimum koşullar			Cevap
	X_1	X_2	X_3	Y
Tahmin Edilen	60	1	1.270	56.81
Deney Sonucu				57.47

X_1 : sıcaklık, X_2 : zaman, X_3 : enzim, Y: hidroliz derecesi(%)

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
DH (%)
60,1251
46,0655
X1 = A: Sıcaklık
X2 = B: Zaman
Actual Factor
C: Enzim = 1,27



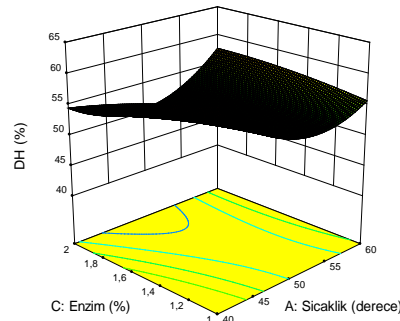
(a)



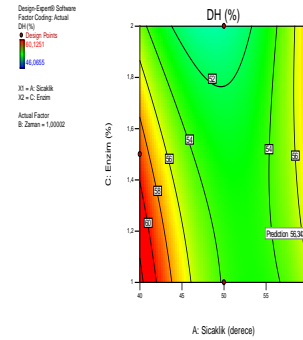
(b)

Şekil 4.3. CYY ile mezgit atıklarında alkali poteaz enzimi ile sıcaklık ve zamana göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
DH (%)
60,1251
46,0655
X1 = A: Sıcaklık
X2 = C: Enzim
Actual Factor
B: Zaman = 1,09459

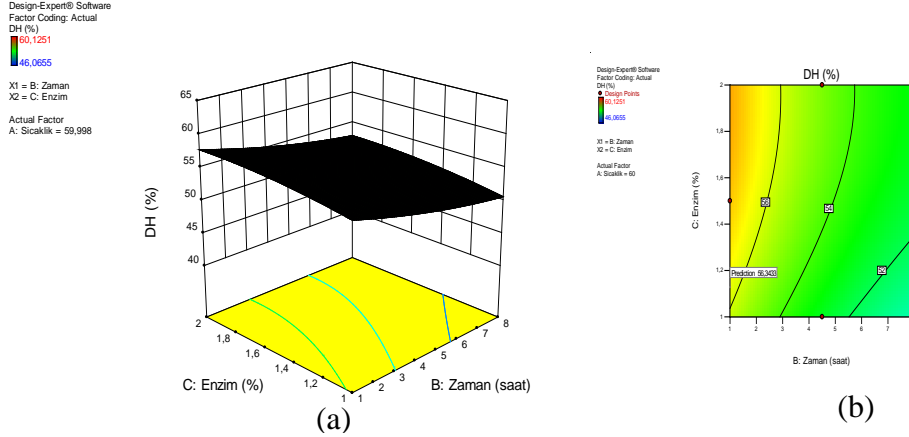


(a)



(b)

Şekil 4.4. CYY ile mezgit atıklarında alkali poteaz enzimi ile sıcaklık ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik



Şekil 4.5. CYY ile mezgit atıklarında alkali poteaz enzimi ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik

4.2.3. Hamsi Atıklarının Alkali Proteaz Enzimi ile Optimizasyonu

BBD Faktöriyel dizayn kullanılarak belirlenen hamsi atıklarında alkali proteaz enzimi ile elde edilen hidrolizdeki sıcaklık, zaman ve enzim konsantrasyonu bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, deneysel ve yöntem tarafından öngörülen HD(%) değerleri Çizelge 4.13’ de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13. Hamsi atıklarında alkali proteaz enzimi ile gerçek bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler tepki değişkeni, hidroliz derecesi (HD, Y)

	X_1	X_2	X_3	Y
1	60	4.5	1	56.95
2	40	8	1.5	59.75
3	50	1	2	71.02
4	50	4.5	1.5	65.37
5	60	4.5	2	53.20
6	50	8	2	62.51
7	40	4.5	2	55.81
8	50	1	1	66.71
9	50	8	1	45.48
10	50	4.5	1.5	65.37
11	40	4.5	1	54.77
12	50	4.5	1.5	65.37
13	60	8	1.5	54.51
14	40	1	1.5	44.66
15	60	1	1.5	53.45

X_1 :sıcaklık, X_2 :zaman, X_3 :enzim Y:hidroliz derecesi(%HD)

CYY ile hamsi atıklarında alkali proteaz enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller çizelge 4.14 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.14. CYY ile hamsi atıklarında alkali proteaz enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Ortalama	51033.01	1	51033.01			Önerilen
Lineer	67.81	3	22.60	0.32	0.8086	
2FI	95.43	3	31.81	0.38	0.7718	
Quadratik	336.46	3	112.15	1.66	0.2887	
Kübik	337.44	3	112.48			
kalan	0.000	2	0.000			
Toplam	51870.16	15	3458.01			

Modelde lineer ve quadratik terimler arasındaki farkın önemli olmadığı ($p>0.05$), genel ortalama modelinin ise önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Ortalamalar arasındaki fark önemli olsa da lineer ve quadratik etkiler istatistiksel olarak önemsiz olarak saptanmıştır ($p>0.05$), (Çizelge 4.14). Bu durumda hamsi atıklarının alkali proteaz enzimi ile optimizasyonunda uygulanan model terimleri önemli bulunmamıştır. Alkali proteaz enziminin HD(%) üzerine sıcaklık ve zamanın önemli bir etkiye sahip olmadığı Çizelge 4.15’de görülmektedir.

Çizelge 4.15. Alkali proteaz enzimi kullanılarak hamsi atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD(%)’nin ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F
Model	0.000	0			
Arta kalan	837.15	14	59.80		
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	837.15	12	69.76		
Hata	0.000	2	0.000		
Düzeltilmiş	837.15	14			
Toplam					
R ²	0.0000				
R ² Adj	0.0000				
Pred R ²	-0.1480				

4.2.4. Alabalık Atıklarının Protameks Enzimi ile Optimizasyonu

Merkezi Birleşik Tasarımlarına (CCD) faktöriyel dizayn kullanılarak belirlenen alabalık atıklarında protameks enzimi ile elde edilen hidrolizdeki zaman ve enzim konsantrasyonu bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, deneysel ve yöntem tarafından öngörülen HD(%) Çizelge 4.16’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. Alabalık atıklarında protameks enzimi ile gerçek bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler tepki değişkeni (Y) HD(%)

	X_1	X_2	Y
1	4.5	0.79	48.18
2	4.5	1.5	51.06
3	4.5	2.20	47.79
4	8	2	42.16
5	-0.45	1.5	74.95
6	1	2	87.67
7	4.5	1.5	51.06
8	9.45	1.5	37.32
9	8	1	42.22
10	4.5	1.5	51.06
11	4.5	1.5	51.06
12	1	1	79.29
13	4.5	1.5	51.06

X_1 : zaman, X_2 : enzim Y: hidroliz derecesi(%HD)

CYY ile alabalık atıklarında protameks enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller Çizelge 4.17' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. CYY ile alabalık atıklarında protameks enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Ortalama	33528.00	1	33528.00			Önerilen
Lineer	22.39	2	11.19	4.11	0.0498	
2FI	2.92	1	2.92	1.08	0.3252	
Quadratik	13.23	2	6.62	4.18	0.0639	
Kübik	10.96	2	5.48	236.13	< 0.0001	Önerilen
Kalan	0.12	5	0.023			
Toplam	33577.62	13	2582.89			

Önerilen modelde P değeri ($P>F$) 0.0001 olarak bulunurken F değeri 236.13 olarak bulunmuştur. Bu değerler modelin uygun olduğunu göstermektedir.

Formül 4.4 tarafından ifade edilen model zaman ve protameks enzim konsantrasyonunun fonksiyonu olarak HD(%)' ni göstermektedir. HD(%) için model denklem, alabalık atık proteinlerinin iki bağımsız değişkenin (X_1 ve X_2) onların etkileşimlerin fonksiyonu olarak tepki değişkeni (Y), temel faktörlerin sabit doğrusal ve 2. dereceden uyumlama katsayıları ve etkileşimlerin doğrusal uyumlama katsayıları Çizelge 4.18 kullanılarak belirlenmiştir ve aşağıdaki gibidir.

$$Y=51.06+(-13.3*X_1)+(5.23*X_1^2)+(-0.14*X_2)+(1.16*X_2^2) \quad (4.4)$$

$$+(2.11*X_1*X_2)+(-2.21*X_1^2*X_2)+(-7.34*X_1*X_2^2)$$

Çizelge 4.18. Alabalık atıklarında protameks enzimi kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regresyon katsayıları ve bunların etkileşimleri

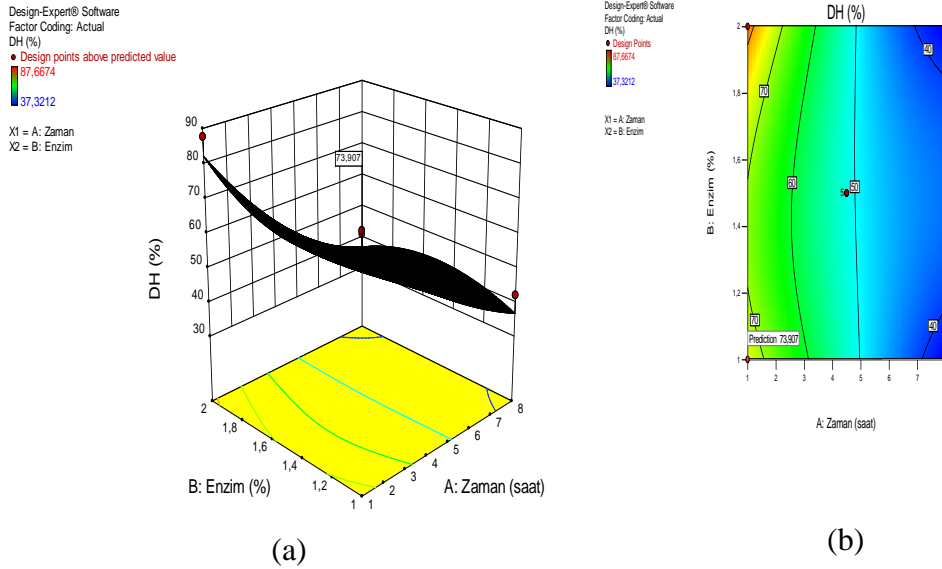
Faktör	Regresyon Katsayısı
Sabit (Intercept)	51.06
A-Zaman	-13.3
B-Enzim	-0.14
AB	-2.11
A ²	5.23
B ²	1.16
A ² B	2.21
AB ²	-7.34

Protameks enzimi kullanılarak alabalık atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında zaman ve enzim konsantrasyonundan etkilenen HD (%)' nin ANOVA sonuçları Çizelge 4.19' da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Protameks enzimi kullanılarak alabalık atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında zaman ve enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Model	2639.91	7	377.13	8.12	0.017	*
A-Zaman	707.8	1	707.8	15.24	0.011	
B-Enzim	0.075	1	0.075	1.61E-03	0.970	
AB	17.81	1	17.81	0.38	0.563	
A ²	190.47	1	190.47	4.1	0.099	
B ²	9.35	1	9.35	0.2	0.673	
A ² B	9.8	1	9.8	0.21	0.665	
AB ²	107.84	1	107.84	2.32	0.188	
Arta kalan	232.25	5	46.45			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	232.25	1	232.25			
Hata	0	4	0			
Düzeltilmiş Toplam	2872.16	12				
R ²	0.9191					
R ² Adj	0.8059					
Pred R ²	0.5976					
Sinyal / gürültü oranının	8,512					

Model için F değeri 8.12 olarak bulunduğu ve 0.017 P değeri ($P > F$) olmasından modelin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. HD(%) için bulunan ikinci dereceden modelin R^2 0.9191 ve R^2 Adj 0.8059 değerleri 1' e yakın bulunmuştur. Bu çalışmada tespit edilen %91.91 R^2 değeri, toplam değişimin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnız %8.09'unun modelle ifade edilemediğini göstermektedir. Sonuç olarak bu değerlerin birbirine ve 1' e yaklaşması modelin başarısını göstermektedir. Bu çalışmada yeterli kesinliği (adequate precision), gösteren 8.512 sinyal / gürültü oranı ile modelin yeterli sinyale işaret ettiği bulunmuştur. Formül 4.4' te elde edilen regrasyonunun grafiksel gösterimleri Şekil 4.6' da üç boyutlu cevap yüzeyleri design expert 10 (Statsoft, 1999) kullanılarak gösterilmiştir.



Şekil 4.6. CYY ile alabalık atıklarında protameks enzimi ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik, (b) kontür grafik

Optimizasyonu sağlanmış hidrolizasyonun hidroliz derecesi 73.91 'e yükseldiği enzim ve zaman için Cevap Yüzeyi Grafiği Şekil 4.6' da görülmektedir. Optimum HD (%73.91) için istenilebilirlik profili, maksimum istenilebilirlik seviyesi olan 1.0'e (0-1 arası ölçekte) 1 saat hidroliz süresi ve %1 lik enzim konsantrasyonu ile ulaşılabilceğini göstermektedir. Çalışmada, HD(%) değeri üzerine sıcaklığın önemli bir etkiye sahip olduğu ($p < 0.05$) fakat enzim miktarının ise önemli bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur ($p > 0.05$). Tahmin edilen ve yukarıdaki uyumlama denklemi ile elde edilen HD(%), deneysel HD(%)'e yakın bulunmuştur (Çizelge 4.20). Elde

edilen bu sonuca göre, modelin alabalık atık proteinlerini etkileyen farklı deneysel değerler kombinasyonlarında atık proteinlerinin HD(%)'sini tahmin etmekte kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.20. Alabalık atıklarında protameks ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen HD (%)

	Optimum koşullar		Cevap
	X ₁	X ₂	Y
Tahmin Edilen	1	1	73.91
Deney Sonucu			74.30

X₁: zaman, X₂: enzim Y: hidroliz derecesi(%)

4.2.5. Mezgıt Atıklarının Protameks Enzimi ile Optimizasyonu

CCD faktöriyel dizayn kullanılarak belirlenen mezgıt atıklarında protameks enzimi ile elde edilen hidrolizdeki zaman ve enzim konsantrasyonu bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, deneysel ve yöntem tarafından belirlenen HD(%) Çizelge 4.21'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.21. Mezgıt atıklarında protameks enzimi ile gerçek bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler tepki değişkeni, hidroliz derecesi (HD(%), Y)

	X ₁	X ₂	Y
1	4.5	0.79	57.82
2	4.5	1.5	56.89
3	4.5	2.21	54.86
4	8	2	58.78
5	-0.45	1.5	54.49
6	1	2	54.43
7	4.5	1.5	56.89
8	9.44975	1.5	57.81
9	8	1	54.61
10	4.5	1.5	56.89
11	4.5	1.5	56.89
12	1	1	54.43
13	4.5	1.5	56.89

X₁: zaman, X₂: enzim Y: hidroliz derecesi(%HD)

CYY ile mezgıt atıklarında protameks enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller Çizelge 4.22'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. CYY ile mezigit atıklarında protameks enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Ortalama	41183.60	1	41183.60			
Lineer	10.64	2	5.32	3.11	0.089	
2FI	4.37	1	4.37	3.08	0.113	
Quadratik	3.05	2	1.53	1.10	0.383	
Kübik	8.75	2	4.37	23.23	0.003	Önerilen
Kalan	0.94	5	0.19			
Toplam	41211.35	13	3170.10			

Formül 4.5 tarafından ifade edilen model zaman ve protameks enzim konsantrasyonunun fonksiyonu olarak HD(%)'ni göstermektedir. HD(%) için model denklem, mezigit atık proteinlerinin iki bağımsız değişkenin (X1 ve X2) onların etkileşimlerin fonksiyonu olarak tepki değişkeni (Y), temel faktörlerin sabit doğrusal ve 2. dereceden uyumlama katsayıları ve etkileşimlerin doğrusal uyumlama katsayıları Çizelge 4.23 kullanılarak belirlenmiştir.

$$Y=56.89+(1.17*X1)+(-0.54*X1^2)+(-1.05*X2)+(-0.45*X2^2) \quad (4.5)$$

$$+(1.04*X1*X2)+(2.09*X1^2*X2)+(-0.038*X1*X2^2)$$

Çizelge 4.23. Mezigit atıklarında protameks enzimi kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri

Faktör	Regrasyon Katsayısı
Sabit (Intercept)	56.89
A-Zaman	1.17
B-Enzim	-1.05
AB	1.04
A ²	-0.54
B ²	-0.45
A ² B	2.09
AB ²	-0.038

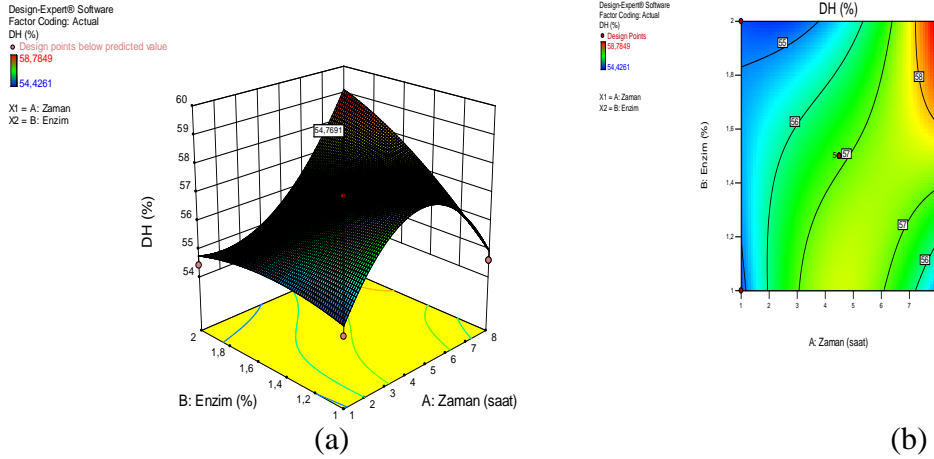
Cevap Yüzeyi kübik formül için varyans analizi (ANOVA) Çizelge 4.24'de verilmiştir. Model için F değeri 20.34 olarak bulunduğu ve 0.0022 p değeri (P>F) ile modelin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. HD(%) için bulunan ikinci dereceden modelin 0.9661 R² ve 0.9186 R²Adj değerlerinin 1' e çok yakın olması deneysel değerlerle model tarafından öngörülen değerlerin çok iyi bir uyum

içerisinde olduğunu göstermektedir. R^2 değeri yüzde olarak ifade edildiğinde, %96.61 ile toplam değişimin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnız %3.39'unun modelle ifade edilemediğini göstermektedir. Çalışmada sinyal gürültü oranı 14.620 değeri ile %4' ün üstünde bulunarak yeterli sinyale işaret ettiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.24. Protameks enzimi kullanılarak mezgit atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Model	26.81	7	3.83	20.34	0.0022	*
A-Zaman	5.5	1	5.5	29.19	0.0029	
B-Enzim	4.38	1	4.38	23.25	0.0048	
AB	4.37	1	4.37	23.19	0.0048	
A ²	2.05	1	2.05	10.87	0.0215	
B ²	1.4	1	1.4	7.41	0.0416	
A ² B	8.75	1	8.75	46.45	0.001	
AB ²	2.86E-03	1	2.86E-03	0.015	0.9067	
Arta kalan	0.94	5	0.19			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	0.94	1	0.94			
Hata Düzeltmiş	0	4	0			
Toplam	27.75	12				
R ²	0.9661					
R ² Adj	0.9186					
Pred R ²	0.7325					
Sinyal / gürültü oranını	14.620					

Formül 4.5 ile elde edilen regrasyonunun grafiksel gösterimleri olan üç boyutlu cevap yüzeyleri design expert kullanılarak elde edilmiş ve Şekil 4.7' de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. CYY ile mezzgit protameks enzimi ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik

Optimizasyonu sağlanmış hidrolizasyonun hidroliz derecesinin(HD%) 54.77 'e yükseldiği enzim ve zaman için cevap yüzey grafiği Şekil 4.7 de görülmektedir. Optimum HD(%) (%54.77) için istenilebilirlik profili , maksimum istenilebilirlik seviyesi olan 1.0'e (0-1 arası ölçekte) 1 saat hidroliz süresi ve %1 lik enzim konsantrasyonu ile ulaşılabileceğini göstermektedir. Çalışmada, zaman ve enzim konsantrasyonu ile zaman-enzim konsantrasyonu arasındaki etkinin HD(%) düzeyleri üzerinde önemli oranda etkili olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). Tahmin edilen ve yukarıdaki uyumlama denklemi ile elde edilen %54.77 HD(%), %54.43 ile deneysel HD(%)'e yakın bulunmuştur (Çizelge 4.25). Sonuca göre uygulanan modelin mezzgit atık proteinlerini etkileyen farklı deneysel değerler kombinasyonlarında atık proteinlerinin HD (%)' sini tahmin etmekte kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.25. Mezzgit atıklarında protameks ile hidrolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen hidroliz derecesi (HD%)

	Optimum koşullar		Cevap
	X_1	X_2	Y
Tahmin Edilen	1	1	54.77
Deney Sonucu			54.43

X_1 : zaman, X_2 : enzim Y: hidroliz derecesi HD (%)

4.2.6. Hamsi Atıklarının Protameks Enzimi ile Optimizasyonu

CCD faktöriyel dizayn kullanılarak belirlenen hamsi atıklarında protameks enzimi ile elde edilen hidrolizdeki zaman ve enzim konsantrasyonu bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, deneysel ve yöntem tarafından öngörülen hidroliz derecesi (HD)(%) Çizelge 4.26'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. Hamsi atıklarında protameks kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regresyon katsayıları ve bunların etkileşimleri

	X_1	X_2	Y
1	4.5	0.79	46.03
2	4.5	1.5	47.79
3	4.5	2.20	50.06
4	8	2	47.42
5	-0.45	1.5	47.74
6	1	2	51.25
7	4.5	1.5	47.79
8	9.45	1.5	47.14
9	8	1	48.39
10	4.5	1.5	47.79
11	4.5	1.5	47.79
12	1	1	56.43
13	4.5	1.5	47.79

X_1 : zaman, X_2 : enzim Y: hidroliz derecesi(%)

CYY ile hamsi atıklarında protameks enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller Çizelge 4.27' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.27. CYY ile hamsi atıklarında protameks enzimi ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller

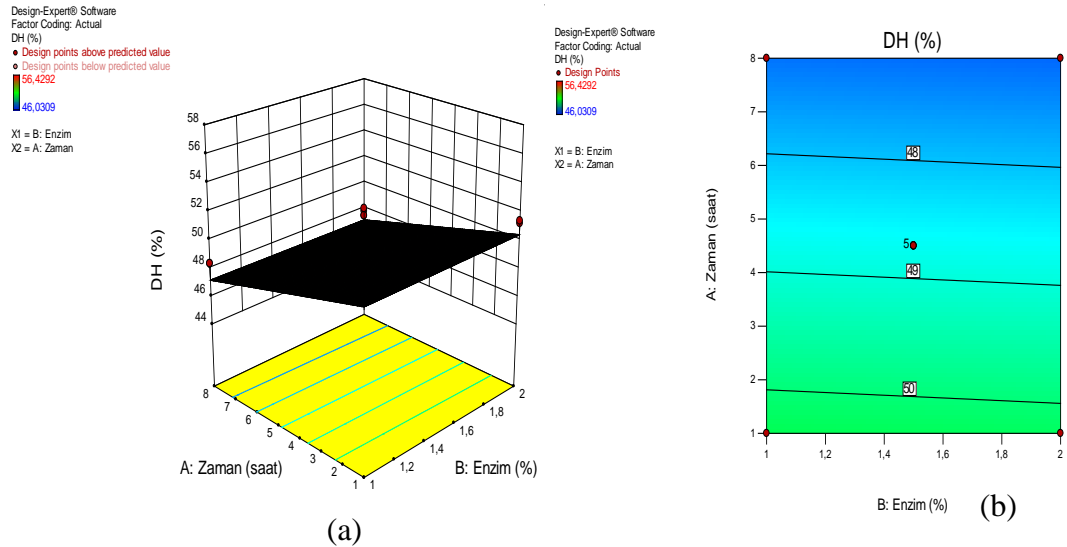
Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Ortalama	30860.29	1	30860.29			Önerilen
Lineer	20.23	2	10.12	1,58	0.254	Önerilen
2FI	4.44	1	4.44	0.67	0.435	
Quadratik	7.44	2	3.72	0.50	0.628	
Kübik	32.72	2	16.36	4.17	0.086	
Kalan	19.60	5	3.92			
Toplam	30944.72	13	2380.36			

Program tarafından 0.254 p değeri ($P>F$) ile lineer model önerilmiştir (Çizelge 4.27). Görüldüğü üzere 1.58 Model F değeri, modelin gürültüye göre anlamlı olmadığını ve

0.2542 Prob> F" değerinin 0.0500'den büyük olması model terimlerinin anlamlı olmadığını göstermektedir Çizelge 4.28'de lineer model terimlerinden HD(%) üzerine, zaman (A) ve enzim konsantrasyonu (B)' nun istatistiksel olarak önemli bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur (p>0.05). Üç boyutlu Cevap Yüzeyleri Design Expert kullanılarak Şekil 4.8' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.28. Protameks enzimi kullanılarak hamsi atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	ö.s
Model	20.23	2	10.12	1.58	0.2542	
A-Zaman	20.20	1	20.20	3.15	0.1065	
B-Enzim	0.027	1	0.027	4.130E-003	0.9500	
Arta kalan	64.20	10	6.42			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	64.20	6	10.70			
Hata	0.000	4	0.000			
Düzeltilmiş Toplam	84.43	12				
R ²	0.2396					
R ² Adj	0.0875					
Pred R ²	-0.6251					
sinyal / gürültü oranı	3.693					



Şekil 4.8. CYY ile hamsi protameks enzimi ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik

4.2.7. Alabalık Atıklarının Flavourenzim İle Optimizasyonu

CCD faktöriyel dizayn kullanılarak belirlenen alabalık atıklarında flavourenzim ile elde edilen hidrolizdeki zaman ve enzim konsantrasyonu bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, deneysel ve yöntem tarafından öngörülen hidroliz derecesini (HD%) göstermektedir. Çizelge 4.29'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.29. Alabalık atıklarında flavourenzim kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regresyon katsayıları ve bunların etkileşimleri

	X ₁	X ₂	Y
1	4.5	0.79	66.99
2	4.5	1.5	66.23
3	4.5	2.21	66.51
4	8	2	66.86
5	-0.45	1.5	67.49
6	1	2	67.67
7	4.5	1.5	66.23
8	9.45	1.5	66.48
9	8	1	66.20
10	4.5	1.5	66.23
11	4.5	1.5	66.23
12	1	1	67.29
13	4.5	1.5	66.23

Çizelge 4.30'da görüldüğü gibi, CYY ile alabalık atıklarında flavourenzim ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda, 0.005 p değeri (P>F) ile quadratik model önerilmiştir.

Çizelge 4.30. CYY ile alabalık atıklarında flavourenzim ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Ortalama	57769.53	1	57769.53			
Lineer	1.40	2	0.70	3.41	0.074	
2FI	0.018	1	0.018	0.079	0.785	
Quadratik	1.60	2	0.80	12.77	0.005	Önerilen
Kübik	0.40	2	0.20	25.60	0.002	
Kalan	0.039	5	7.816E-003			
Toplam	57772.99	13	4444.08			

Formül 4.7 tarafından ifade edilen model, zaman ve flavourenzim konsantrasyonunun fonksiyonu olarak HD'ni göstermektedir.

$$Y=66.23+(-0.36*X1)+(0.41*X1^2)+(-0.17*X2)+(0.3*X2^2) \quad (4.7)$$

$$+(0.067*X1*X2)+(0.43*X1^2*X2)+(-0.12*X1*X2^2)$$

HD (%) için model denklem, alabalık atık proteinlerinin iki bağımsız değişkenin (X1 ve X2) onların etkileşimlerin fonksiyonu olarak tepki değişkeni (Y), temel faktörlerin sabit doğrusal ve 2. Dereceden uyumlama katsayıları ve etkileşimlerin doğrusal uyumlama katsayıları Çizelge 4.31 kullanılarak belirlenmiştir ve aşağıdaki gibidir.

Çizelge 4.31. Alabalık atıklarında flavourenzim kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri

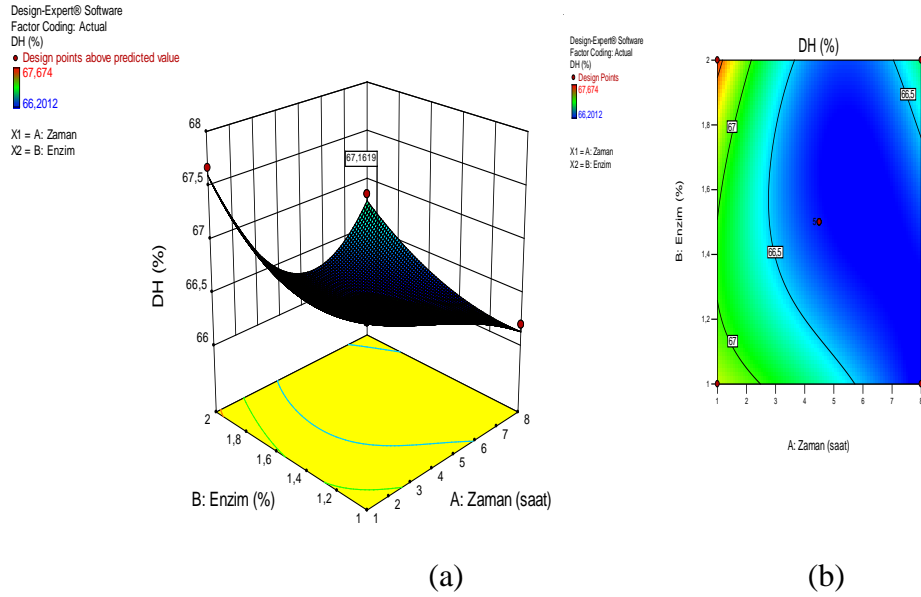
Faktör	Regrasyon Katsayısı
Sabit (Intercept)	66.23
A-Zaman	-0.36
B-Enzim	-0.17
AB	0.067
A ²	0.41
B ²	0.3
A ² B	0.43
AB ²	-0.12

Varyans analizi (ANOVA) Çizelge 4.32’de verilmiştir. Model için F değeri 62.61 olarak bulunduğu ve 0.0001 p değeri (P>F) ile modelin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. HD(%) için bulunan ikinci dereceden modelin 0.9887 R² ve 0.9729 R²Adj değerlerinin 1’ e çok yakın olduğu bulunmuştur. Hidroliz derecesi (HD%) için öngörülen modelin 0.9827’ lik R² değeri deneysel verilerle model tarafından öngörülen değerlerin uyumuna işaret etmektedir. Yüzde olarak ifade edildiğinde, R² enzim aktivitesi için %98.27 toplam değişimin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnız %1.73’ünün modelle ifade edilemediğini göstermektedir. Sonuç olarak bu değerlerin birbirine ve 1’ e yaklaşması modelin başarılı olduğunu ve sinyal /gürültü oranı (21.237)’nin ise 4’ ün üstünde olmasından dolayı yeterli sinyale işaret ettiğini göstermektedir. Formül 4.7 nin regrasyonunun grafiksel gösterimleri olan üç boyutlu Cevap Yüzeyleri Design Expert kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.9).

Çizelge 4.32. Flavourenzim kullanılarak alabalık atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Model	3.43	7	0.49	62.61	0.0001	*
A- Zaman	0.51	1	0.51	65.33	0.0005	
B-Enzim	0.12	1	0.12	14.93	0.0118	
AB	0.018	1	0.018	2.29	0.1905	
A ²	1.19	1	1.19	152.11	< 0.0001	
B ²	0.61	1	0.61	77.81	0.0003	
A ² B	0.37	1	0.37	47.58	0.001	
AB ²	0.028	1	0.028	3.61	0.116	
Arta kalan	0.039	5	7.82E-03			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	0.039	1	0.039			
Hata Düzeltmiş Toplam	0	4	0			
R ²	3.46	12		0.9887		
R ² Adj				0.9729		
R ² Pred				0.2781		
sinyal / gürültü oranı				21.237		

Çizelge 4.32'de görüldüğü gibi quadratik model terimlerinde HD(%) üzerine zaman (A), A², B² ve A²B istatistiksel olarak önemli bulunurken(p<0.05) enzim konsantrasyonu (B) zaman-enzim interaksyonu (AB) ve AB² önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur(p>0.05).



Şekil 4.9. CYY ile alabalık atıklarında flavourenzim ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik, (b) kontür grafik

Optimizasyonu sağlanmış hidrolizasyonun hidroliz derecesinin 67.16 ‘a yükseldiği enzim ve zaman için cevap yüzey grafiği Şekil 4.9 da 1.302 saatte ve %1 enzim konsantrasyonu ile görülmektedir. Optimum HD (%67.16) için istenilebilirlik profili, maksimum istenilebilirlik seviyesi olan 1.0’e (0-1 arası ölçekte) 1.302 saatte ve %1 enzim enzim konsantrasyonu ile ulaşılabileceğini göstermiştir. Çizelge 4.33’te tahmin edilen HD(%) ile deney sonucu elde edilen HD(%) değerleri birbirine yakın bulunduğundan ve bu da HD(%) alabalık atık proteinlerini etkileyen farklı deneysel değerler kombinasyonlarında atık proteinlerinin HD(%)’sini tahmin etmekteki kullanılabilirliğini göstermektedir.

Çizelge 4.33. Alabalık atıklarında flavourenzim ile hidrolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen hidroliz derecesi

	Optimum koşullar		Cevap
	X ₁	X ₂	Y
Tahmin Edilen	1.302	1	67.16
Deney Sonucu			67.29

X₁: zaman, X₂: enzim Y: hidroliz derecesi (HD%)

4.2.8. Mezgit Atıklarının Flavourenzim ile Optimizasyonu

CCD faktöriyel dizayn kullanılarak belirlenen mezgit atıklarında flavourenzim ile elde edilen hidrolizdeki zaman ve enzim konsantrasyonu bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, deneysel ve yöntem tarafından öngörülen HD Çizelge 4.34'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.34. Mezgit atıklarında flavourenzim kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regresyon katsayıları ve bunların etkileşimleri

	X ₁	X ₂	Y
1	4.5	0.80	51.90
2	4.5	1.5	49.51
3	4.5	2.21	51.36
4	8	2	53.72
5	-0.45	1.5	47.95
6	1	2	50.83
7	4.5	1.5	49.51
8	9.45	1.5	55.59
9	8	1	50.38
10	4.5	1.5	49.51
11	4.5	1.5	49.51
12	1	1	50.92
13	4.5	1.5	49.51

X₁: zaman, X₂: enzim Y: hidroliz derecesi(HD %)

CYY ile mezgit atıklarında flavourenzim ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda, 0.0498 p değeri (P>F) ile lineer ve 0.0001< p (P>F) değeri ile kübik model önerilmiştir (Çizelge 4.35).

Çizelge 4.35. CYY ile mezgit atıklarında flavourenzim ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Ortalama	33528.00	1	33528.00			
Lineer	22.39	2	11.19	4.11	0.0498	Önerilen
2FI	2.92	1	2.92	1.08	0.3252	
Quadratik	13.23	2	6.62	4.18	0.0639	
Kübik	10.96	2	5.48	236.13	< 0.0001	Önerilen
Kalan	0.12	5	0.023			
Toplam	33577.62	13	2582.89			

Formül 4.8 tarafından ifade edilen model, zaman ve flavourenzim konsantrasyonunun fonksiyonu olarak HD'ni göstermektedir.

$$Y=49.51+(2.7*X1)+(1.07*X1^2)+(-0.19*X2)+(1*X2^2) \quad (4.8)$$

$$+(0.86*X1*X2)+(1*X1^2*X2)+(-2.11*X1*X2^2)$$

HD (%) için model denklem, mezzit atık proteinlerinin iki bağımsız değişkenin (X1 ve X2) onların etkileşimlerin fonksiyonu olarak tepki değişkeni (Y), temel faktörlerin sabit doğrusal ve 2. dereceden uyumlama katsayıları ve etkileşimlerin doğrusal uyumlama katsayıları Çizelge 4.36 kullanılarak belirlenmiştir ve aşağıdaki gibidir.

Çizelge 4.36. Mezzit atıklarında flavourenzim kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regrasyon katsayıları ve bunların etkileşimleri

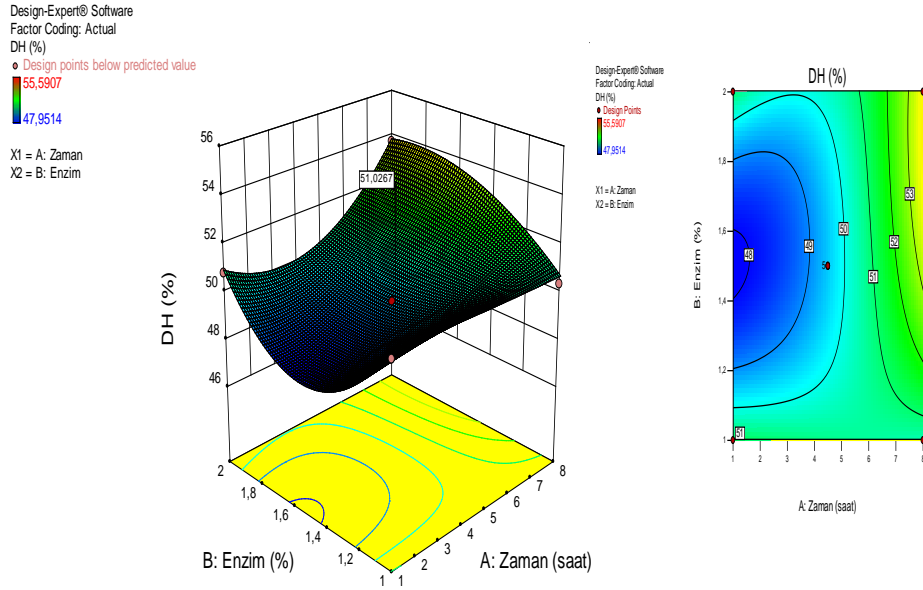
Faktör	Regrasyon Katsayısı
Sabit	49.51
A-Zaman	2.7
B-Enzim	-0.19
AB	0.86
A ²	1.07
B ²	1
A ² B	1
AB ²	-2.11

Varyans analizi (ANOVA) Çizelge 4.37’de verilmiştir. Model için F değeri 304.67 olarak bulunduğu ve 0.0001 p değeri (P>F) ile modelin uyumlu olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmada uyum eksikliği (lack of fit) değeri önemsiz bulunmuştur. Uyum eksikliğinin önemsiz bulunması modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. HD (%) için bulunan ikinci dereceden modelin 0.9977 R² ve 0.9944 R²Adj değerlerinin 1’ e çok yakın olduğu bulunmuştur. Hidroliz derecesi için öngörülen modelin 0.9977’ lik R² değeri deneysel verilerle model tarafından öngörülen değerlerin uyumuna işaret etmektedir. Yüzde olarak ifade edildiğinde, R² enzim aktivitesi için %99.77 toplam değişimin bağımsız değişkenlere atfedilebileceğini, toplam değişimin yalnız %0.23’ünün modelle ifade edilemediğini göstermektedir. Sonuç olarak bu değerlerin birbirine ve 1’ e yaklaşması modelin başarılı olduğunu ve sinyal /gürültü oranı (63.917)’nin ise 4’ ün üstünde olmasından dolayı yeterli sinyale işaret ettiğini göstermiştir. Formül 4.8’in regrasyonunun grafiksel gösterimleri olan üç boyutlu Cevap Yüzeyleri Design Expert kullanılarak elde edilmiş ve Şekil 4.10’ da gösterilmiştir.

Çizelge 4.37. Flavourenzim kullanılarak mezgit atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Model	49.51	7	7.07	304.67	< 0.0001	*
A- Zaman	29.18	1	29.18	4	< 0.0001	
B-Enzim	0.14	1	0.14	6.22	0.0549	
AB	2.92	1	2.92	126	< 0.0001	
A ²	7.97	1	7.97	343.51	< 0.0001	
B ²	6.98	1	6.98	300.71	< 0.0001	
A ² B	2.02	1	2.02	86.86	0.0002	
AB ²	8.95	1	8.95	385.4	< 0.0001	
Arta kalan	0.12	5	0.023			
Uyum Eksikliği (Lack of Fit)	0.12	1	0.12		ö.s	
Hata	0	4	0			
Düzeltilmiş Toplam	49.62	12				
R ²			0.9977			
R ² Adj			0.9944			
R ² Pred			0.8503			
Sinyal gürültü oranı			63.917			

Çizelge 4.37’de görüldüğü gibi kübik model terimlerinde HD(%) üzerine zaman (A), zaman-enzim interaksiyonu (AB) A², B² ve A²B ve AB² istatistiksel olarak önemli bulunurken (p<0.05) enzim konsantrasyonu (B) önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (p>0.05). Çalışmada, HD(%) konsantrasyonu üzerine zaman, enzim oranı, zaman-enzim oranı interaksiyonun arasında önemli bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (p<0.05).



(a)

(b)

Şekil 4.10. CYY ile mezzgit atıklarında flavourenzim ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik,(b) kontür grafik

Optimizasyonu sağlanmış hidrolizasyonun hidroliz derecesinin(HD%) 51.03 'e yükseldiği enzim ve zaman için cevap yüzey grafiği Şekil 4.10 da 1.03 saatte ve %1 enzim konsantrasyonu ile görülmektedir. Optimum HD (%51.03) için istenilebilirlik profili, maksimum istenilebilirlik seviyesi olan 1.0'e (0-1 arası ölçekte) 1.03 saatte ve %1 enzim enzim konsantrasyonu ile ulaşılabileceğini göstermiştir. Tahmin edilen ve yukarıdaki uyumlama denklemi ile elde edilen HD(%) ile gözlemlenen HD(%) değerleri birbirine yakın bulunmuştur (Çizelge 4.38). Bu da mezzgit atık proteinlerini etkileyen farklı deneysel değerler kombinasyonlarında atık proteinlerinin HD(%)'sini tahmin etmekte kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.38. Mezzgit atıklarında flavourenzim ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen hidroliz derecesi

	Optimum koşullar		Cevap
	X ₁	X ₂	Y
Tahmin Edilen	1.030	1	51.03
Deney Sonucu			50.92

X₁: zaman, X₂: enzim Y: hidroliz derecesi

4.2.9. Hamsi Atıklarının Flavourenzim ile Optimizasyonu

CCD faktöriyel dizayn kullanılarak belirlenen hamsi atıklarında flavourenzimi ile elde edilen hidrolizdeki zaman ve enzim konsantrasyonu bağımsız değişkenlerine karşı, cevap değişkenleri, deneysel ve yöntem tarafından öngörülen hidroliz derecesi (% HD) Çizelge 4.39’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.39. Hamsi atıklarında flavourenzim kullanarak optimizasyon deneyleri ve ana faktörlerin regresyon katsayıları ve bunların etkileşimleri

	X₁	X₂	Y
1	4.5	0.79	67.01
2	4.5	1.5	66.32
3	4.5	2.20	67.74
4	8	2	65.50
5	-0.44	1.5	63.04
6	1	2	67.78
7	4.5	1.5	66.32
8	9.44	1.5	63.76
9	8	1	66.73
10	4.5	1.5	66.32
11	4.5	1.5	66.32
12	1	1	68.23
13	4.5	1.5	66.32

X₁:zaman, X₂:enzim Y:hidroliz derecesi

CYY ile hamsi atıklarında flavourenzim ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller Çizelge 4.40’ da gösterilmiştir. Program tarafından 0.0315 p (P>F) quadratik modeli önerilmiştir.

Çizelge 4.40. CYY ile hamsi atıklarında flavourenzim ile hidroliz parametrelerinin optimizasyonunda önerilen modeller

Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Ortalama	57077.10	1	57077.10			önerilen
Lineer	1.01	2	0.51	0.20	0.8228	
2FI	0.15	1	0.15	0.053	0.8231	
Quadratik	15.85	2	7.93	5.90	0.0315	önerilen
Kübik	3.81	2	1.91	1.71	0.2725	
Kalan	5.59	5	1.12			
Toplam	57103.51	13	4392.58			

Çizelge 4.41. Flavourenzim kullanılarak hamsi atıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, zaman, enzim konsantrasyonundan etkilenen HD'nin ANOVA tablosu

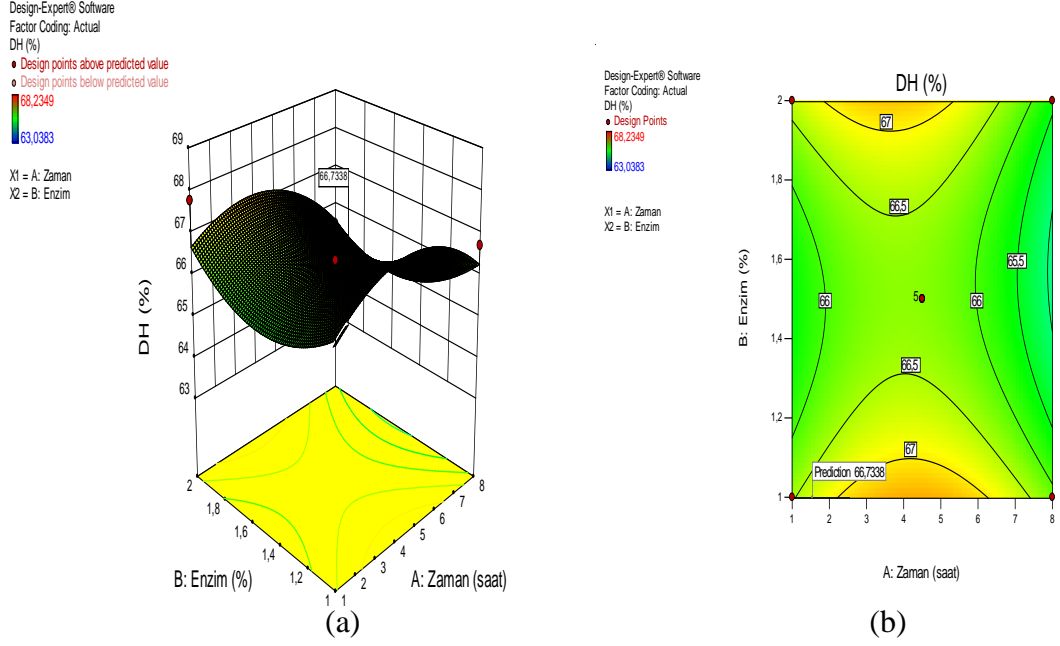
Kaynak	Kareler Ortalaması	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler	F Değeri	P-Değeri P>F	
Model	17.01	5	3.40	2.53	0.1288	ö.s
A- Zaman	0.96	1	0.96	0.71	0.4265	
B-Enzim	0.053	1	0.053	0.039	0.8482	
AB	0.15	1	0.15	0.11	0.7491	
A ²	7.57	1	7.57	5.63	0.0494	
B ²	6.22	1	6.22	4.63	0.0683	
A ² B	9.40	7	1.34			
AB ²	9.40	3	3,13			
Arta kalan	0.000	4	0,000			
UyumEksikliği (Lack of Fit)	26.41	12				
R ²	0.6440					
R ² Adj	0.3898					
R ² Pred	-1.5314					
Sinyal gürültü oranı	5.820					

2.53 Model F değeri, modelin anlamlı olduğunu ifade etmektedir. 5.820 sinyal/gürültü oranı ile uygun bir sinyali gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.41).

Quadratik model terimlerinde HD(%) üzerine A² istatistiksel olarak önemli bulunurken (p<0.05), zaman (A) , enzim konsantrasyonu (B), B² ve A²B ve AB² istatistiksel olarak önemli bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (p>0.05).

1.482 saatte ve %1 enzim konsantrasyonu ile optimizasyonu sağlanmış hidrolizasyonun hidroliz derecesinin 67.39 'a yükseldiği enzim ve zaman için Cevap Yüzey Grafiği Şekil 4.11' de görülmektedir.

Optimum HD (%67.39) için istenilebilirlik profili, maksimum istenilebilirlik seviyesi olan 1.0'e (0-1 arası ölçekte) 1.482 saat hidroliz süresi ve %1 lik enzim konsantrasyonu ile ulaşılabileceğini göstermektedir. Tahmin edilen ve yukarıdaki uyumlama denklemi ile elde edilen HD(%), deneysel HD(%)'e yakın bulunmuştur (Çizelge 4.42)



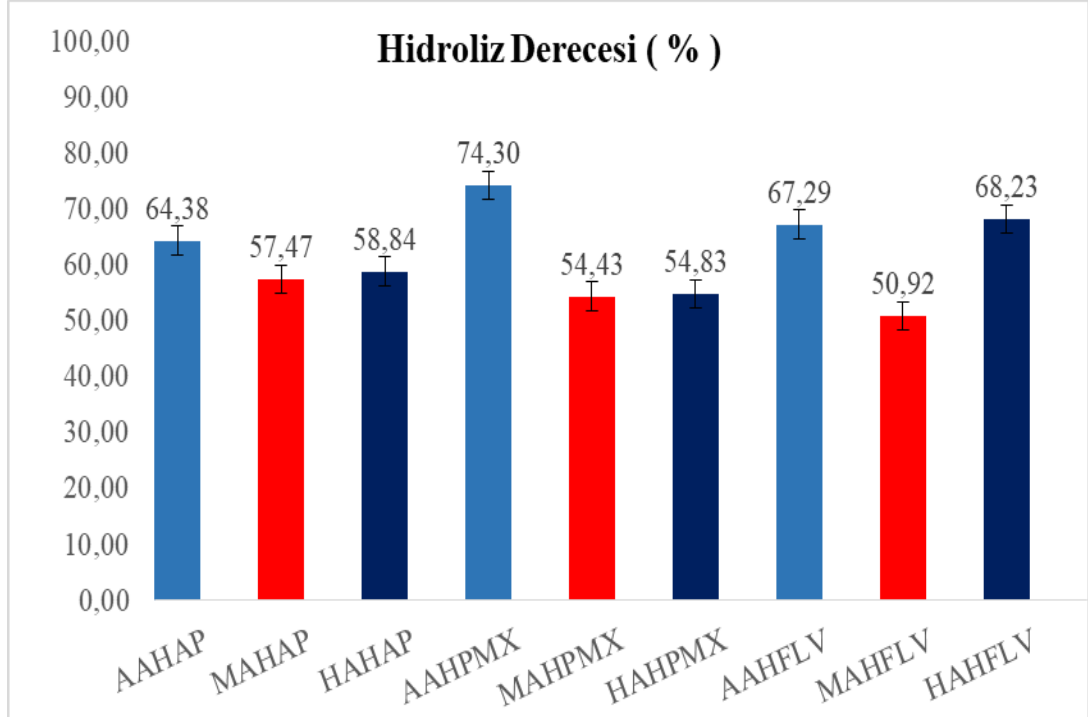
Şekil 4.11. CYY ile hamsi atıklarında flavourenzim ile zaman ve enzime göre HD değişimini gösteren (a) üç boyutlu grafik, (b) kontür grafik

Çizelge 4.42. Hamsi atıklarında flavourenzim ile hidolizasyonda HD için karşılık gelen tahmin değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen HD(%)

	Optimum koşullar		Cevap
	X ₁	X ₂	Y
Tahmin Edilen	1.482	1	67.39
Deney Sonucu			68.23

4.3. Optimize Edilen Hidrolizatların Hidroliz Derecesi (%HD)

Farklı enzimlerle CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgit atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının Hidroliz Dereceleri (% HD) Şekil 4.12' de verilmiştir



Şekil 4.12. Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının hidroliz dereceleri (%) (AAHAP; Alabalık atığı hidrolizati alkali proteaz enzimi, MAHAP; mezgıt atığı hidrolizati alkali proteaz enzimi, HAHAP ; hamsi atığı hidrolizati alkali proteaz, protameks enzimi, AAHPMX; Alabalık atığı hidrolizati protameks enzimi, MAHPMX; mezgıt atığı hidrolizati protameks enzimi, HAHPMX;hamsi atığı hidrolizati protameks enzimi, AAHFLV; Alabalık atığı Hidrolizati flavourenzim, MAHFLV; mezgıt atığı hidrolizati flavourenzim,HAHFLV;hamsi atığı hidrolizati flavourenzim

HD(%), peptit bağlarının proteinden ayrıştığını gösteren bir indikatör olarak değerlendirilir (Benjakul ve Morrissey, 1997). Yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre, mezgıt ve hamsi atığının protameks ile hidrolizi hariç ($p>0.05$), diğer tüm grupların hidroliz dereceleri (HD %) arasındaki farkın önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Gruplar içinde en yüksek hidroliz derecesi (HD%) %74.30 ile alabalık atığının protameks ile hidrolizatından elde edilirken ($p<0.05$), en düşük hidroliz derecesi %50.92 ile mezgıt atığının flavourenzim ile hidrolizinden elde edilmiştir ($p<0.05$) (Çizelge 4.43).

Çizelge 4.43. Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının hidroliz dereceleri

Balık Atığı / Enzim	HD (%)*
AAHAP	64.35±0.98 ^c
MAHAP	57.47±0.89 ^c

Çizelge 4.43' ün devamı

HAHAP	58.84±0.13 ^d
AAHPMX	74.30±0.14 ^g
MAHPMX	54.43±0.76 ^b
HAHPMX	54.83±0.23 ^b
AAHFLV	67.29±0.08 ^f
MAHFLV	50.92±0.36 ^a
HAHFLV	68.23±0.20 ^f

*Aynı sütun içindeki farklı harfler 0.05 önem düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Balık atığı türleri için hidroliz derecelerine (HD%) göre alkali proteaz, protameks ve flavourenzim' in etkisi Çizelge 4.44' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.44. Balık atığı türleri için hidroliz derecelerine göre alkali proteaz, protameks ve flavourenzim' in etkisi (%)^{*}

Enzimler	Alabalık	Mezgit	Hamsi
Alkali proteaz	64.35±0.98 ^a	57.47±0.89 ^c	58.84±0.13 ^b
Protameks	74.30±0.14 ^c	54.43±0.76 ^b	54.83±0.23 ^a
Flavourenzim	67.29±0.08 ^b	50.92±0.36 ^a	68.23±0.20 ^c

*Aynı sütun içindeki farklı harfler 0.05 önem düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre, alabalık atığında en yüksek hidroliz derecesi (HD%) protameks ile tespit edilirken ($p<0.05$), bunu flavourenzim ve alkali proteaz takip etmiştir ($p<0.05$). Mezgit atığında en yüksek hidroliz derecesi (HD%) alkali proteaz ile saptanırken ($p<0.05$), en düşük hidroliz derecesi (HD%) flavourenzim ile elde edilmiştir ($p<0.05$). Hamsi atığı hidrolizatında ise en yüksek hidroliz derecesi (HD%) %68.23 ile flavourenzim ile elde edilmiştir. Benzer sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından da belirtilmektedir (Benjakul ve Morrissey, 1997; Bhaskar ve ark., 2008).

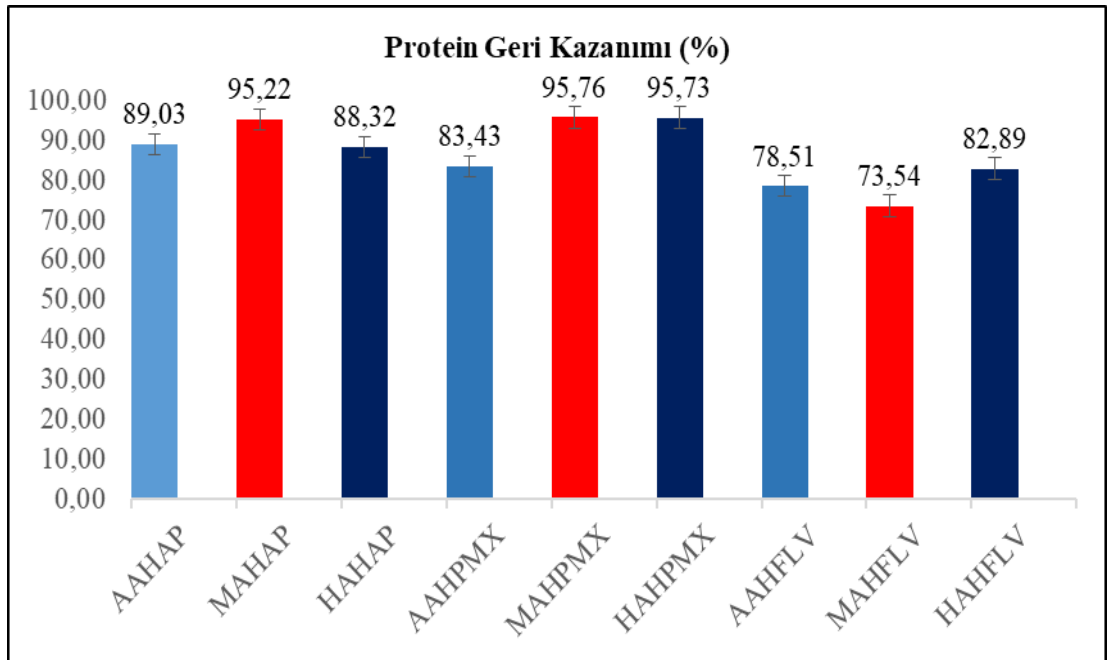
Hinsui ve ark. (2016), Skipjack tuna içorganlarının HD' sini (%61.73) Yellowfin tuna'nın içorganlarından elde edilen hidrolizatın HD' sinden (%52.98) yüksek tespit etmişlerdir. Chotikachinda ve ark. (2013), Skipjack tunanın HD' sini %62.90 olarak bulmuşlardır. Baharuddin ve ark. (2016), alkalaz enzimi ile yapılan yılan balığı protein hidrolizatının hidroliz derecesi (HD%) sonuçlarını hidroliz sürelerine bağlı olarak 120 dakikada %36, 180 dakikada %48, 300 dakikada %69 HD değerlerini tespit etmişlerdir. TCA yöntemi kullanılarak hidroliz derecesinin(HD %) tespit edildiği bir BPH çalışmasında, Amiza ve ark. (2012), Cobia (*Rachycentron*

canadum) balığı fileto atıklarının alkalaz enzimi ile hidroliz etmişler ve kullanılan enzim miktarı (%1,5, %2, %20, m/m) ve hidroliz süresi (120 dk, 180 dk, 300 dk) artışına bağlı olarak hidroliz derecelerini %53, %71 ve %96 olarak belirlemişlerdir.

Ovissipour ve ark. (2012), (alkalaz, protameks, nötraz, flavourenzim ve tripsin) 5 farklı enzim kullanarak Pers mersin balığı için elde edilen sonuçlar, en yüksek HD(%) alkalaz hidrolizatlarında ve en düşük ise tripsin hidrolizatlarında tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar Guerard ve ark. tarafından da desteklenmektedir (2002). Benzer şekilde bu çalışmada da, balık atığı ve enzim türüne göre hidroliz derecesinin %50.92 ile % 74.30 arasında değiştiği belirlenmiştir.

4.4. Optimize Edilen Hidrolizatların Protein Geri Kazanımları

Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının protein geri kazanımları (%) Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının protein geri kazanımları(%) (AAHAP; Alabalık atığı hidrolizatı alkali proteaz enzimi, MAHAP; mezgıt atığı hidrolizatı alkali proteaz enzimi, HAHAP; hamsi atığı hidrolizatı alkali proteaz, protameks enzimi, AAHPMX; Alabalık atığı hidrolizatı protameks enzimi, MAHPMX; mezgıt atığı hidrolizatı protameks enzimi, HAHPMX, hamsi atığı hidrolizatı protameks enzimi, AAHFLV; Alabalık atığı hidrolizatı flavourenzim, MAHFLV; mezgıt atığı hidrolizatı flavourenzim, HAHFLV; hamsi atığı hidrolizatı flavourenzim)

Çizelge 4.45’ de görüldüğü üzere gruplar içinde en yüksek protein geri kazanımı mezgıt ve hamsi atığının protameks ile ve mezgıt atığının alkali proteaz ile hidrolizatından elde edilirken ($p<0.05$), en düşük protein geri kazanımı %73.54 ile mezgıt atığının flavourenzim ile hidrolizinden elde edilmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.45. Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının protein geri kazanımları (%)

Balık Atığı / Enzim	Protein Geri Kazanımı (%)
AAHAP	89.03±0.00 ^d
MAHAP	95.22±0.75 ^e
HAHAP	88.32±0.00 ^d
AAHPMX	83.43±0.37 ^c
MAHPMX	95.76±0.00 ^e
HAHPMX	95.73±0.07 ^c
AAHFLV	78.51±0.72 ^b
MAHFLV	73.54±0.19 ^a
HAHFLV	82.89±0.19 ^c

*Aynı sütun içindeki farklı harfler 0.05 önem düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.46. Balık atığı türleri için protein geri kazanımına göre alkali proteaz, protameks ve flavourenzim’ in etkisi

Enzimler	Alabalık	Mezgıt	Hamsi
Alkali proteaz	89.03±0.00 ^c	95.22±0.75 ^b	88.32±0.00 ^b
Protameks	83.43±0.37 ^b	95.76±0.00 ^b	95.73±0.07 ^c
Flavourenzim	78.51±0.72 ^a	73.54±0.19 ^a	82.89±0.19 ^a

*Aynı sütun içindeki farklı harfler 0.05 önem düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Balık atığı türleri için protein geri kazanımına göre alkali proteaz, protameks ve flavourenzim’ in etkisi Çizelge 4.46’da gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analiz sonucuna göre, alabalık atığında en yüksek protein geri kazanımı %89.03 ile alkali proteaz ile tespit edilirken ($p<0.05$), bunu protameks ve flavourenzim takip etmiştir ($p<0.05$). Mezgıt atığında en yüksek protein geri kazanımı %95.27 alkali proteaz ve %95.76 protameks ile saptanırken ($p>0.05$), en düşük protein geri kazanımı %73.54 flavourenzim ile elde edilmiştir ($p<0.05$). Hamsi atığı hidrolizatında ise en yüksek protein geri kazanımı %95.73 ile protameks ile elde edilmiştir. Bu çalışma ile, balık

atığı türü ve enzim türüne göre protein geri kazanımının değişebileceği belirlenmiştir. Enzim türleri dikkate alındığında en düşük protein geri kazanımının flavourenzim ile elde edildiği görülmektedir. Protein geri kazanımı, hidroliz sonrası protein fazında bulunan proteinler ile hammaddede çözünür halde bulunan toplam proteinlerin yüzdesini gösterir. Ovissipour ve ark. (2009) tarafından, Pers mersin balığı için 5 farklı enzim (alkalaz, protameks, nötraz, flavourenzim ve tripsin) kullanılarak yapılan hidroliz çalışmasında, alkalaz ile hidroliz edilen balık proteininin 18 saat sonra en yüksek protein geri kazanımına (%83.64) sahip olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar, Pers mersin balığı için alkalaz enzimini kullanarak protein verimini belirlemede zaman ve sıcaklığın önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Liasset ve ark. (2000), dört farklı enzim (Nötraz, Alkalaz, pepsin ve kojizyme) kullanarak Atlantik morina ve Atlantik somon balık gövdelerinden protein hidrolizatı ekstraksiyonu üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada, 120 dakika hidroliz sonrasında, Alkalaz ile işleme tabi tutulan somon ve pepsin ile işleme tabi tutulan morinaların, sırasıyla, %67.6 ve %64 oranında daha yüksek protein geri kazanımları sağladığını ortaya koymuştur.

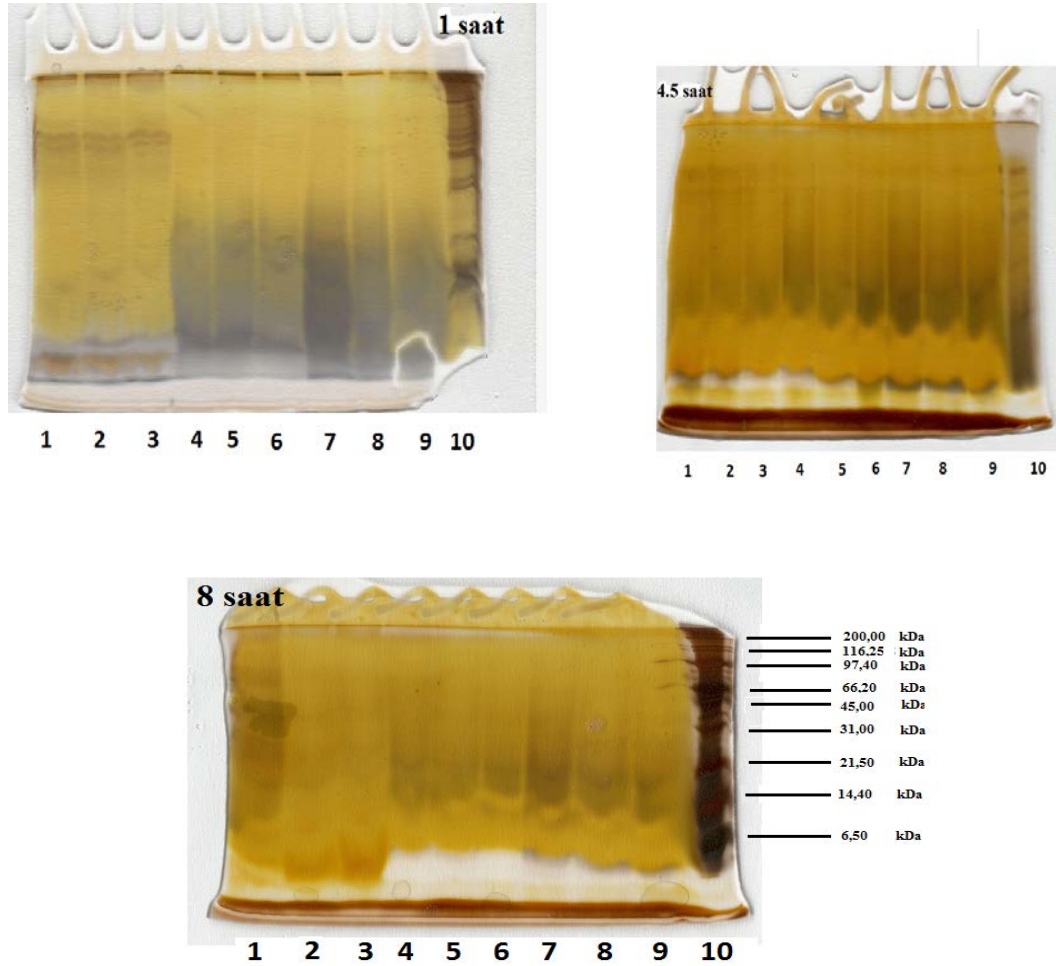
Shahidi (1994), ticari enzimler için protein geri kazanımını %51.6 ile %70.6 aralığında tespit etmişlerdir. Alkalaz enzimi için inkübasyon sürecine bağlı olarak optimum 60 °C de 60 dakika ve 55 °C 120 dakikada %70.6 protein geri kazanımı elde etmişlerdir. Meldstad (2015), Atlantik morina (*Gadus morhua*) kafasından elde edilen protein hidrolizatı ile ilgili çalışmasında, en yüksek protein içeriğinin %88.4 ile taze morinadan üretilen hidrolizatlatlarda (FPH) elde edildiği, en düşük protein kazanımının ise %67.7 ile dışarıda çözdürülmüş örneklerde olduğu görülmüştür. Nemati ve ark. (2012), *Alosa caspia* atıklarından ticari enzimler kullanılarak elde edilen protein hidrolizatlarını incelendiğinde, 60 dakika süre ile alkalaz enzimi ile yapılan protein hidrolizatında protein geri kazanımının %80.42 olduğunu göstermişlerdir. Theodore (2005), kedi balığı atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarında asit ile %71.5 ve alkali ile %70.3 olarak protein geri kazanımı elde etmişlerdir. Hultin ve Kelleher (2000), istavrit beyaz kasları ile asidik ortamda elde edilen hidrolizatlarda % 94 protein geri kazanımı tespit etmişlerdir. Araştırmalarda elde edilen farklı değerlerin balık türlerine, atık kompozisyonuna, enzim türüne, hidroliz yöntemine (sıcaklık, süre ve enzim oranı) göre değişebileceği görülmektedir.

4.5. Hidrolizatların Sodyum Dodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) Profilleri

Farklı süre, sıcaklık, enzim türü ve oranı ile hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgit atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının molekül ağırlıklarına göre dağılımı incelenmiştir.

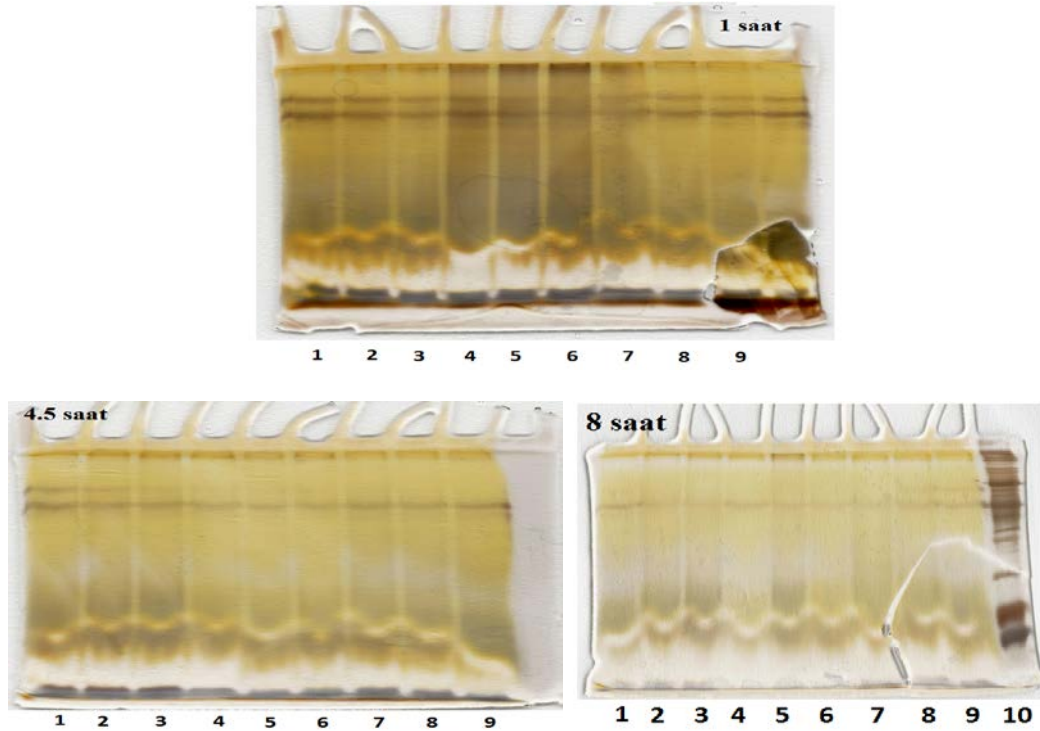
4.5.1. Alkali Proteaz Enziminin Alabalık, Hamsi ve Mezgit Atığı Hidrolizatlarına Etkisi

Farklı süre, sıcaklık, enzim oranı ile hidrolize olan alabalık atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının molekül ağırlıklarına göre dağılımı şekil 4.14'de verilmiştir.



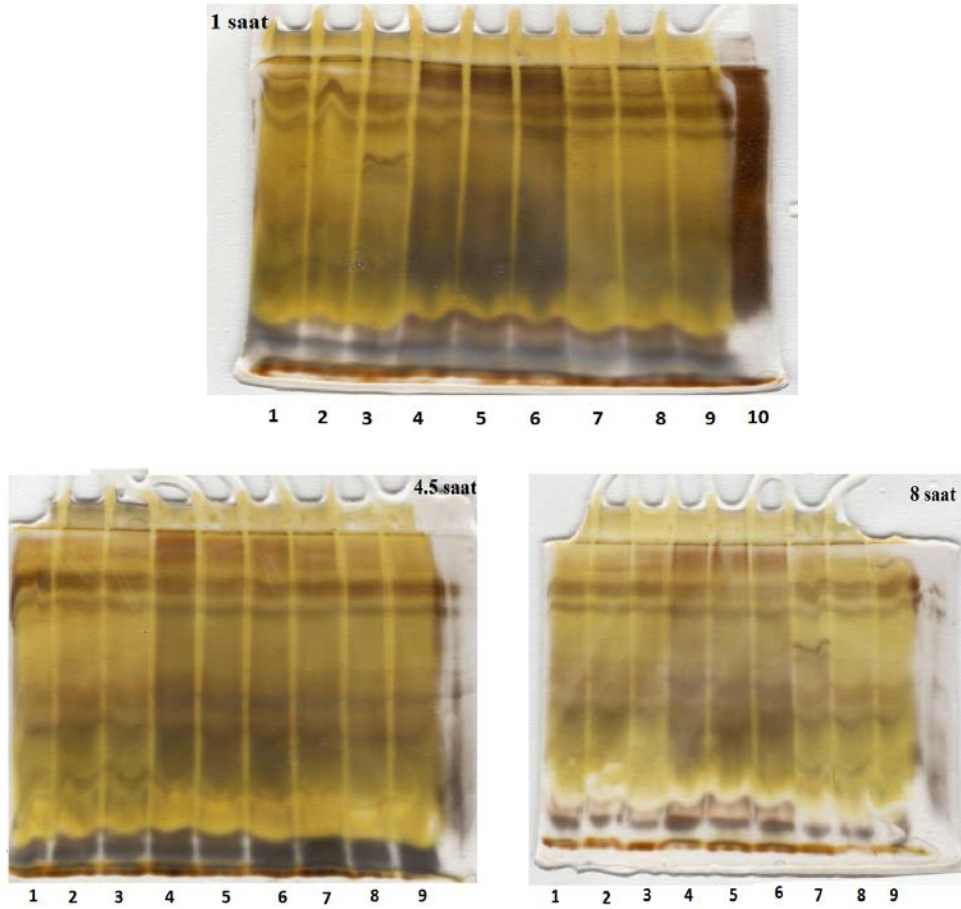
Şekil 4.14. Farklı sürelerde hidrolize edilen alabalık atığı protein hidrolizatlarına moleküler ağırlığına Alkali proteaz enziminin etkisi((1) 40°C %1 enzim oranı (EO), (2) 40°C %1.5 EO, (3) 40°C %2 EO, (4) 50°C %1 EO, (5) 50°C %1.5 EO, (6) 50°C %2 EO, (7) 60°C %1 EO, (8) 60°C %1.5 EO, (9) 60°C %2 EO, (10) 1 ve 4,5 saat için alabalık atığı tüm vücut proteinleri, 8 saat için standart

Alabalık atıklarının 1 saatlik hidrolizasyon süresinde sıcaklık ve enzim oranının hidrolizatların molekül ağırlıklarına olan etkisi incelendiğinde, 40°C sıcaklıkta tespit edilen 66.20 kDa ile 200 kDa arasında bulunan protein bantlarının 50 ve 60°C lik hidrolizasyonda yok olduğu ve/veya iz halinde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.14). Ayrıca, 200 kDa' nın üzerindeki molekül büyüklüğüne sahip proteinlerin, jellerin yükleme kuyucuklarında kalarak kalın ve koyu protein bantları oluşturduğu görülmüştür. 4.5 saatlik hidrolizasyon süresinde ise bu kuyucuklardaki protein bantlarının hidrolize olduğu ve daha küçük moleküler ağırlıklı protein bantlarına indirgeniği ve 6.5 kDa'dan daha küçük molekül ağırlığına sahip proteinlerin miktarının ise arttığı görülmektedir. 8 saatlik hidrolizasyonda ise 45 kDa'dan daha büyük molekül ağırlığına sahip protein bantlarının kaybolduğu görülmektedir. Alabalık atıklarından elde edilen hidrolizatlarda protein moleküllerinin enzim miktarından daha ziyade sıcaklık ve sürenin hidrolizasyon işlemine etki ettiği bulunmuştur. Bunun nedeninin, hidrolizin zamanla artan hidroliz derecesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Bakar ve ark., 2012).



Şekil 4.15. Farklı sürelerde hidrolize edilen mezgit atığı protein hidrolizatlarının moleküler ağırlığına Alkali proteaz enziminin etkisi ((1) 40°C %1 enzim oranı (EO), (2) 40°C %1.5 EO, (3) 40°C %2 EO, (4) 50°C %1 EO, (5) 50°C %1.5 EO, (6) 50°C %2 EO, (7) 60°C %1 EO, (8) 60°C %1.5 EO, (9) 60°C %2 EO, (10) 8 saat için hamsi atığı tüm vücut proteinleri)

Şekil 4.15'de farklı süre, sıcaklık, enzim oranı ile hidrolize olan mezgit atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının molekül ağırlıklarına göre dağılımı görülmektedir. Tüm vücut proteinleri (8 saat 10.band) dikkate alındığında, 1 saatlik hidroliz işlemi sonucunda, protein bantlarının büyük çoğunluğunun hidroliz olduğu görülmektedir. Özellikle 66.20 kDa 'nın üzerinde bariz iki protein bandının varlığı ve 6.5 kDa' nın altındaki proteinlerin bant yoğunluklarında da bir artışın olduğu (jelin alt tabanında oluşan koyu bant yoğunluğu) dikkati çekmektedir. 1 saatlik hidrolizasyon işlemi esnasında sıcaklık ve enzim miktarının mezgit atığı protein hidrolizatındaki protein bantlarının sayısı ve miktarı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Mezgit atıklarının 4.5 saatlik hidroliz işleminde,1 saatlik hidrolizasyon işlemine göre bant yoğunluklarının azaldığı, 40 °C 'lik hidrolizasyonda %2 lik enzim konsantrasyonunun ve 50 ile 60 °C' lik hidrolizasyon işleminin 66.20 kDa' nın üzerindeki 2 protein bandından ilkinin indirgenmesinde etkili olduğu anlaşılmaktadır. Mezgit atıklarının 8 saatlik hidrolizasyonları sonucunda, tüm bantların bant yoğunluklarının azaldığı ve özellikle jelin tabanında dikkate çeken bant yoğunluklarının önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu da, mezgit balığının özellikle hidrolizasyon süresi arttıkça hidroliz derecesinin arttığının bir göstergesi olduğu düşünülmektedir (Benjakul ve Morrissey,1997). Daha düşük moleküler ağırlıklı (10 kDa) benzer bir SDS PAGE profili *Meriga* protein hidrolizatında da görülmüştür (Chalamaiahve ark., 2010).



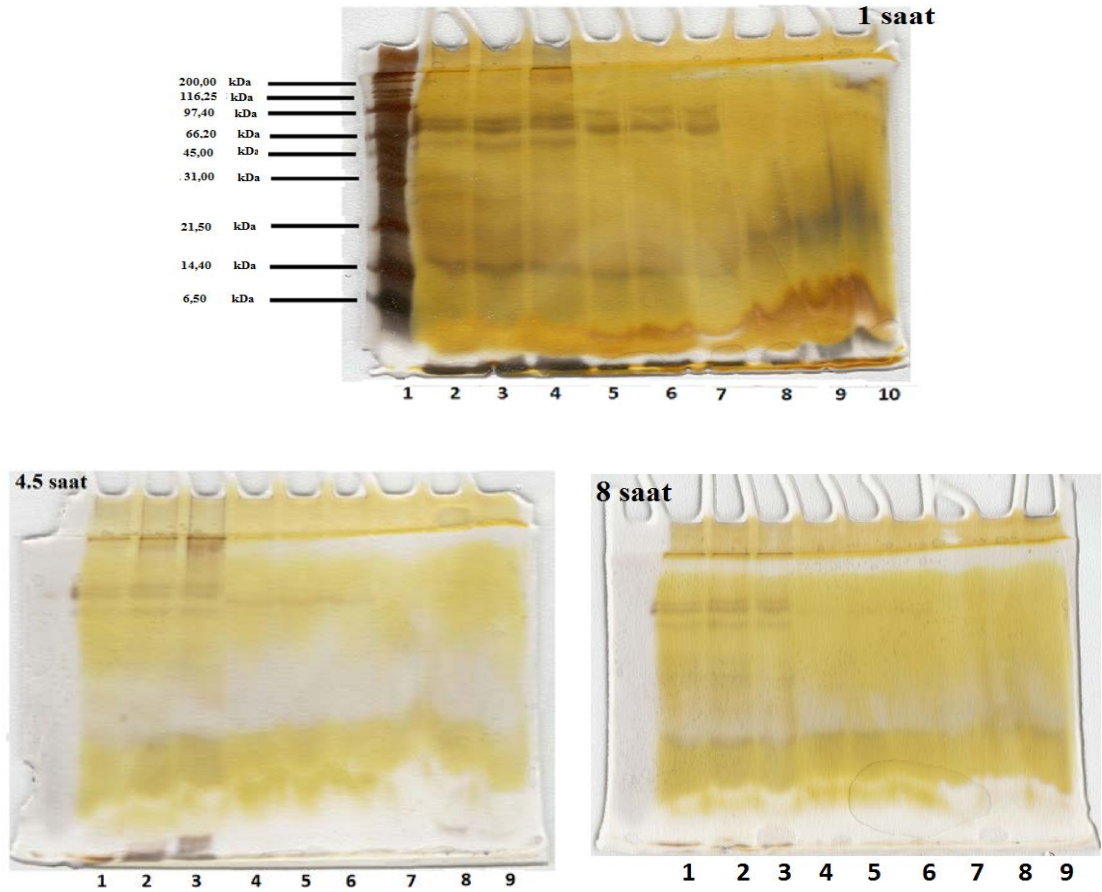
Şekil 4.16. Farklı sürelerde hidrolize edilen hamsi atığı protein hidrolizatlarına moleküler ağırlığına Alkali proteaz enziminin etkisi ((1) 40°C %1 enzim oranı (EO), (2) 40°C %1.5 EO, (3) 40°C %2 EO, (4) 50°C %1 EO, (5) 50°C %1.5 EO, (6) 50°C %2 EO, (7) 60°C %1 EO, (8) 60°C %1.5 EO, (9) 60°C %2 EO, (10) 1 için hamsi atığı tüm vücut proteinleri)

Şekil 4.16'da görülen en büyük eğilim hidroliz süresi arttıkça, > 6,5 kDa moleküler ağırlığa sahip protein bantlarının yoğunluğunda bir azalma görülmüştür. Bununla birlikte 6.5 kDa> moleküler ağırlığa sahip protein bantlarının yoğunluğunda ise 4.5 saatlik hidrolizasyon işleminde arttığı 8 saatlik hidrolizasyonda ise tekrar azaldığı tespit edilmiştir. Hamsi atıklarının 1 saatlik hidrolizasyon süresinde sıcaklık ve enzim oranının hidrolizatların molekül ağırlıklarına olan etkisi incelendiğinde, en büyük farklılığın 50 °C de yapılan hidrolizasyon aşamasında olduğu görülmektedir. Benzer etkinin hidrolizasyon işleminin 4.5 ve 8 saatlik süresinde de olduğu belirlenmiştir. Bu eğilim aynı zamanda somon (Kristinsson ve Rasco, 2000), sardalya (Quaglia ve Orban, 1990) ve Atlantik morina iç organlarından (Aspmo ve ark., 2005)

yapılan protein hidrolizatlarında da gözlenmiştir. Bhaskar ve ark. (2008), benzer şekilde Hindistan Tatlısu balığı sazının (*Catla catla*), iç organlarından elde edilen protein hidrolizatlarında hidrolizden dolayı 8 kDa' dan daha küçük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin oluştuğunu belirtmiştir.

4.5.2. Protameks Enziminin Alabalık, Hamsi ve Mezgit Atığı Hidrolizatlarına Etkisi

Farklı süre ve enzim oranı ile hidrolize olan alabalık, mezgit ve hamsi atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının molekül ağırlıklarına protameks enziminin etkisi Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) profilleri ile Şekil 4.17' de verilmiştir.

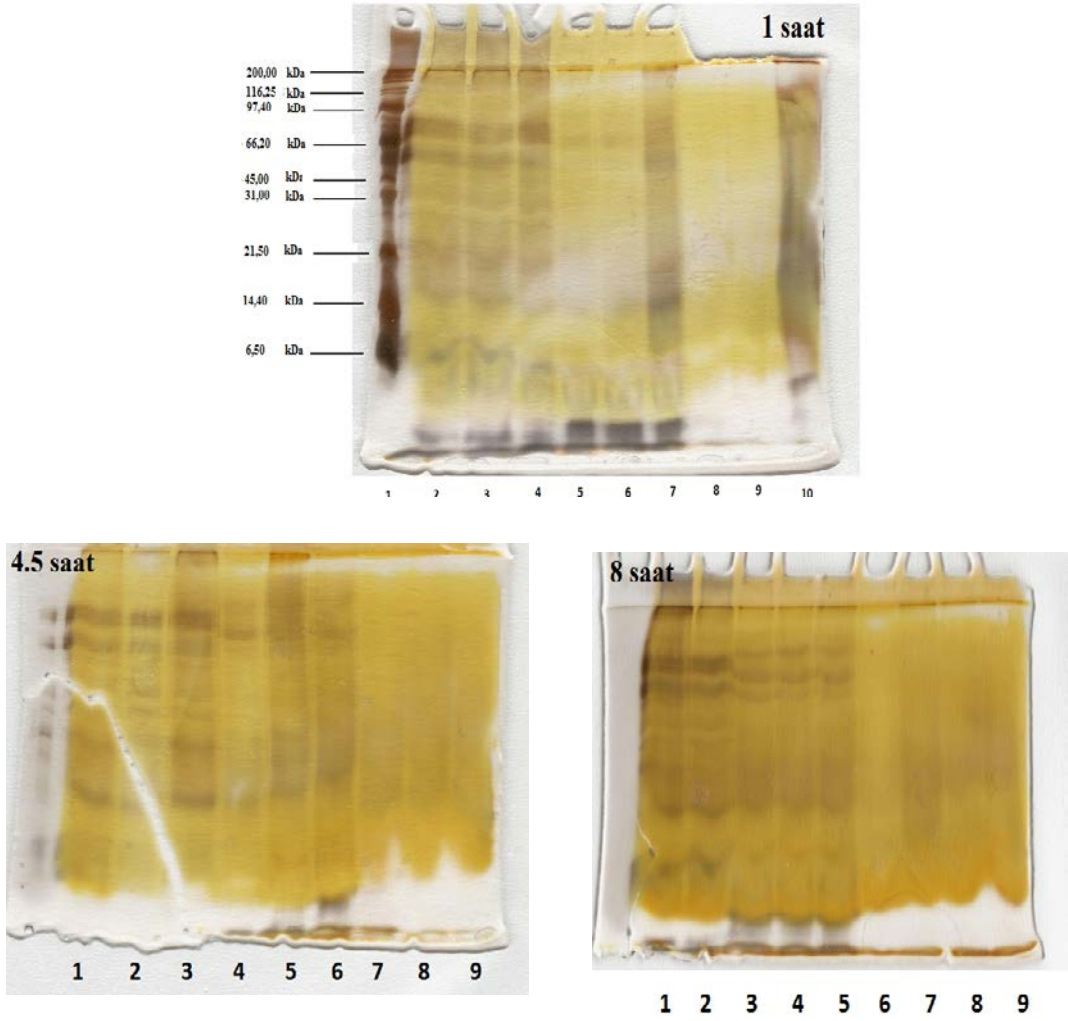


Şekil 4.17. Farklı süre, sıcaklık ve enzim oranı ile hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgit atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının molekül ağırlıklarına protameks enziminin etkisi ((1) %1 alabalık (2) alabalık %1.5 EO, (3) alabalık %2 EO, (4) mezgit%1 EO, (5) mezgit%1.5EO, (6) mezgit%2EO, (7) hamsi%1 EO, (8)hamsi% 1.5 EO, (9) hamsi%2EO)

Alabalık, mezgıt ve hamsi atıklarının protameks enzimi ile farklı sıcaklık ve enzim oranlarında 1 saatlik hidrolizinde, balık türlerinin protein bantlarının indirgenmesinde önemli bir etkisi olduğu görülmektedir. Alabalık atıklarının hidrolizasyon işleminde 66.20 kDanın üzerindeki protein bantlarının mezgıt atıklarının hidrolizasyon işleminde azaldığı ve hamsi atıklarının hidrolizasyonunda tamamen yok olduğu görülmektedir. Benzer etkinin 6.5 kDadan daha düşük moleküler ağırlığa sahip protein bantlarında da görüldüğü jelin taban bölümünde yoğunlaşan protein bantlarından anlaşılmaktadır. 1 saatlik hidrolizasyon süresi ile karşılaştırıldığında, 4.5 saatlik hidrolizasyon işlemi sonucunda da balık türlerine göre tüm protein bantlarının yoğunluğunun azaldığı görülmektedir. Diğerlerinden farklı olarak protameks enzim oranının özellikle 4.5 saat atığı hidrolizasyonunda 6.5 kDadan daha küçük moleküler ağırlığa sahip bant sayısının daha fazla olduğu (jelin tabanında 3 bant) görülmektedir. Şekil 4.17’de görüldüğü üzere, protameks enziminin hidrolizasyona etkisi balık türlerine ve hidrolizasyon süresine bağlı olarak değiştiği görülmektedir.

4.5.3. Flavourenzimin Alabalık, Hamsi Ve Mezgıt Atığı Hidrolizatlarına Etkisi

Farklı süre ve enzim oranı ile hidrolize olan alabalık, mezgıt ve hamsi atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının molekül ağırlıklarına flavourenzim enziminin etkisi Şekil 4.18’ de verilmiştir.



Şekil 4.18. Farklı süre, sıcaklık ve enzim oranı ile hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının molekül ağırlıklarına flavourenzim enziminin etkisi((1) %1 alabalık (2) alabalık %1.5 EO, (3) alabalık %2 EO, (4) mezgıt %1 EO, (5) mezgıt %1.5 EO, (6) mezgıt %2 EO, (7) hamsi %1 EO, (8) hamsi%1.5 EO, (9) hamsi %2 EO)

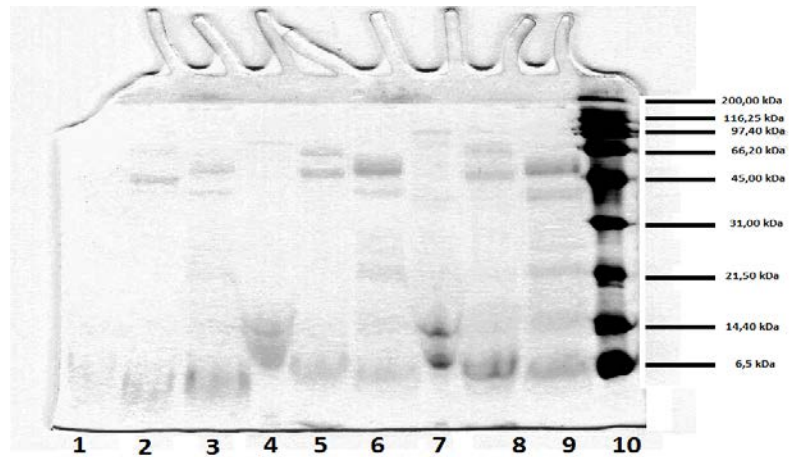
Farklı süre ve enzim oranı ile hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının moleküler ağırlıklarının SDS-PAGE ile karakterizasyonunda, 1 saatlik hidrolizin balık türlerine göre değişiklik gösterdiği ve %2 enzim konsantrasyonunun hamsi ve mezgıt atıklarının hidrolizasyonunda etkili olduğu görülmüştür. Mezgıt atıklarının hidrolizasyonunda özellikle 6.5 kDa'dan daha küçük moleküler ağırlığa sahip protein bantların varlığı ve yoğunluğunun diğer balık türlerine göre farklılık gösterdiği ve hidroliz süresi arttıkça bu bantların yoğunluğunun giderek azaldığı dikkati çekmektedir. Alabalık atıklarında 1 saatlik

hidrolizasyon süresinde var olan 6.5 kDadan daha küçük moleküler ağırlığa sahip protein bantlarının 4.5 saatlik hidrolizasyonda yok olduğu fakat 8 saatlik hidrolizasyon işlemi ile yeniden ortaya çıktığı görülmektedir. Diğer protein bantları için flavourenzim 4.5 ile 8 saat arasındaki hidrolizasyon işleminde çok büyük farklılık göstermediği görülmüştür. Birçok çalışma, proteazların yüksek oranda hidroliz ile düşük molekül ağırlıklı peptit üretme kabiliyetini göstermiştir (Benjakul ve Morrissey, 1997; Liaset ve ark., 2000; Lalasidis ve ark., 1978).

4.5.4. Optimizasyon Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının SDS-PAGE

Profilleri

Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim enzimi ile Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılarak optimize edilen alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının SDS-PAGE profilleri Şekil 4.19’ da gösterilmiştir.



Şekil 4.19. Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) kullanılarak optimize edilen alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının SDS-PAGE profilleri((1) alkali proteaz alabalık, (2) alkali proteaz mezgıt, (3) alkali proteaz hamsi, (4) protameks alabalık, (5) protameks mezgıt, (6) protameks hamsi, (7) flavourenzim alabalık, (8)flavourenzim mezgıt, (9) flavourenzim hamsi, (10) standart

Şekil 4.19’ da görüldüğü üzere, CYY’ e ile 3 farklı enzim kullanılarak üretilen hidrolizatların SDS-PAGE profillerinin enzim türü ve balık atığına göre farklılık gösterdiği bulunmuştur. Alkali proteaz kullanılarak üretilen alabalık atığı hidrolizatlarında (1 nolu sütun) 6.5 kDa’ dan daha küçük moleküler ağırlığa sahip protein bantları tespit edilirken protameksle üretilen alabalık atığı hidrolizatında (4 nolu sütun) 6.5 kDa ile 21.50 kDa arasında küçük moleküler ağırlıklı proteinler ile

66.20 kDa molekül ağırlığına yakın bir bant oluşturduğu bulunmuştur. Flavourenzim ile üretilen hidrolizatlarda ise (7nolu sütun) 14.40 kDa ve 6.5 kDa moleküler ağırlığa yakın iki adet protein bandı ile 66.20 kDa ve 97.40kDa molekül ağırlığına yakın birer adet bant olduğu görülmüştür.

Alkali proteaz kullanılarak üretilen mezgıt hidrolizatlarında (2 nolu sütun) 6.5 kDa' dan daha küçük ve jelin tabanına daha yakın bir protein bantı, 45 kDa 'a yakın kalın bir protein bandı ile 66.20 kDa 'a yakın iz halinde bir protein bandı gözlenirken, protameksle üretilen mezgıt hidrolizatında (5 nolu sütun) 6.5 kDa 'a yakın bir bant, 45.00 kDa ve 66.20 kDa 'a yakın kalın bir bant oluşturduğu bulunmuştur. Flavourenzim ile üretilen hidrolizatlarda ise (8 nolu sütun) protameksle üretilen hidrolizatın sahip olduğu protein bantlarına yakın bir bant oluşumu meydana geldiği görülmektedir. Alkali proteaz kullanılarak üretilen hamsi hidrolizatlarında (3 nolu sütun) 6.5 kDa' dan daha küçük ve jelin tabanına daha yakın bir protein bantı, 45 kDa 'nın hemen altında ve üstünde belirgin iki adet protein bantı gözlenirken, protameksle üretilen hamsi hidrolizatında (6 nolu sütun) 6.5 kDa, 14.40 kDa, 21.50 kDa ve 31.00 kDa 'a yakın birer bant, 45.00 kDa 'nın hemen altında ince ve 45.00 kDa 'nın hemen üstünde kalın bir bant oluşturduğu bulunmuştur. Flavourenzim ile üretilen hidrolizatlarda ise (9 nolu sütun) protameksle üretilen hidrolizatın sahip olduğu protein bantlarına yakın ve daha kalın bir bant oluşumu meydana geldiği görülmektedir.

Benjakul ve Morrissey (1997), alkalaz ve nötraz enzimlerinin pasifik mezgiti atığı hidrolizatlarının protein profillerine olan etkisini incelemiş ve sonuçta alkalaz enziminin nötraz enzimine göre daha yüksek hidrolitik aktiviteye sahip olduğunu bulmuştur. Bunun sebebinin ise pasifik mezgiti atığının alkalazla hidrolizinden sonra sağlanan hidrolizattaki R-amino asitlerin fazla olmasından kaynaklanabileceğini öne sürmüştür. Bu çalışmada, balık türlerine göre elde edilen farklılıkların her bir enzimin hidroliz aktivitesinin proteinlerin sahip olduğu peptit ve amino asit kompozisyonuna bağlı olarak değişebileceğinden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bakar ve ark. (2012) tarafından tilapialarda Alkalaz, Flavourenzim ve Protameks enzimi ile 5 saatlik hidrolizasyon işleminde tüm hidrolizatların SDS-PAGE profillerinde zamana bağlı olarak bant sayısında ve yoğunluğunda bir azalma tespit edilmiştir. Flavourenzimin ise diğer enzimlere göre daha düşük hidrolitik aktivite

gösterdiğini bulmuşlardır. Bu çalışmada da SDS profiline göre en iyi hidrolitik aktivitenin alkali proteaz enzimi ile sağlandığı bulunurken protameks ve flavourenzim in benzer hidrolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.6. Protein Hidrolizatlarının Besinsel Kalitesi

4.6.1. Protein Hidrolizatlarının Kimyasal Kompozisyonu

Üç farklı enzimle CYY sonuçlarına göre üretilen alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının kimyasal kompozisyonu Çizelge 4.47' de verilmiştir.

Alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarında ham protein içeriği kuru madde bazında %77.03 ile %88.54 olarak bulunmuştur. Bu değerler, Sathivel ve ark (2003) tarafından bulunan ringa hidrolizatları (%77 ile %87.9) ile Kristinsson ve Rasco (2000) tarafından bulunan Atlantik somonu protein hidrolizatlarının (72%-88%) protein değerlerine hemen hemen benzerdir. En yüksek protein içeriği, %88.54 ile flavourenzim kullanılarak hidrolize olan alabalık atığı hidrolizatlarında bulunmuştur ($p<0.05$). Bunu sırasıyla %86.78 ile alkali proteaz ve %86.36 ile protameks ile hidrolize olan alabalık atığı hidrolizatları izlemiştir. Bu iki grup dışında kalan tüm grupların kuru madde bazında ham protein değerleri istatistiksel olarak 0.05 önem düzeyinde farklı bulunmuştur.

Alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarında lipit içeriği kuru madde bazında %3.28 ile %6.12 arasında bulunmuştur. Hidrolizatlar içinde en yüksek lipit içeriği %6.12 ile flavourenzim ile elde edilen hamsi atığı hidrolizatlarında ($p<0.05$), en düşük lipit içeriği %3.28 ile flavourenzim ile elde edilen alabalık atığı hidrolizatlarında bulunmuştur ($p<0.05$). Kuru ağırlığa göre hesaplanan hidrolizat içeriklerindeki lipit miktarları işlem görmemiş atıkların lipit içeriklerinden oldukça düşük bulunmuştur. Bunun nedeninin hidroliz işlemi esnasında, atıkların üç kez ısıl işleminden geçmesi (endojen enzimlerin inaktivasyonunu, hidroliz aşaması, santrifüjle lipit fazının ayrılması ve eksojen enzim inaktivasyonu) sonucu yağ fazının proteinli hidrolizat sıvısından ayrılmasından kaynakladığı düşünülmektedir (Ovissipour ve ark.,2012). Benzer sonuçlar, farklı balık atıklarından elde edilen hidrolizatlarda da elde edilmiştir (Benjakul ve Morrissey, 1997; Bhaskar ve ark., 2008; Gbogourive ark., 2004; Hoyle ve Merritt, 1994; Kristinsson ve Rasco, 2000).Chalamaiah ve ark. (2012) birçok çalışmada lipit içeriğinin %5' in altında elde edildiğini buna karşın

%5' in üzerinde yağ içeriği olan çalışmalarında olduğunu belirtmektedir. Bu çalışmada da elde edilen lipit içeriği flavourenzyme ve protameks ile elde edilen hamsi atığı hidrolizatları hariç diğerlerinin %5' in altında lipit içerdiği bulunmuştur. Hidrolizatlar içinde en düşük kül içeriği %8.18 ile flavourenzim ile elde edilen alabalık atığı hidrolizatlarında ($p<0.05$), en yüksek ham kül içeriğinin %17.6 ile protameks ile elde edilen hamsi atığı hidrolizatlarında bulunmuştur ($p<0.05$). Chalamaiah ve ark. (2012), bir çok araştırıcının araştırma sonucuna göre balık hidrolizatlarındaki kül miktarının %0.45 ile 27 arasında değiştiğini belirtmektedir. Balık protein hidrolizatların bu değişiminin, atık profiline, balık türüne ve yöntemde pH düzenlenmesi için kullanılan kimyasallardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.47. Üç farklı enzimle CYY sonuçlarına göre üretilen alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının kimyasal kompozisyonu¹

Hidrolizatlar*	Nem	Ham Protein		Lipit		Ham Kül	
		g/100 g hidrolizat	g/100 g kuru ağırlık	g/100 g hidrolizat	g/100 g kuru ağırlık	g/100 g hidrolizat	g/100 g kuru ağırlık
Alkali proteaz							
AAH	95.51±0.88 ^{de}	82.13±1.07 ^d	86.78±0.38 ^d	3.82±0.02 ^{ab}	4.02±0.08 ^{ab}	8.93±0.60 ^{ab}	9.20±0.46 ^b
MAH	95.63±1.09 ^{de}	76.83±0.61 ^c	82.23±0.20 ^c	3.85±0.10 ^{ab}	4.12±0.07 ^{abc}	12.91±0.31 ^{de}	13.65±0.13 ^{de}
HAH	94.04±1.22 ^{cd}	74.93±0.08 ^{bc}	80.47±0.30 ^b	4.46±0.33 ^{bc}	4.79±0.37 ^{bc}	13.71±0.49 ^e	14.74±0.67 ^f
Protameks							
AAH	99.1±0.86 ^f	84.858±0.09 ^e	86.36±0.01 ^d	3.31±0.07 ^{ab}	3.37±0.07 ^a	10.22±0.23 ^c	10.27±0.08 ^c
MAH	91.81±1.09 ^b	72.505±0.13 ^a	79.79±0.97 ^b	3.09±1.27 ^a	3.39±1.36 ^a	15.38±0.22 ^f	16.82±0.39 ^g
HAH	96.27±0.52 ^e	73.406±0.56 ^{ab}	77.03±0.33 ^a	5.10±0.36 ^c	5.35±0.31 ^{cd}	16.8±0.15 ^f	17.62±0.01 ^h
Flavourenzim							
AAH	92.79±0.26 ^{bc}	81.954±0.65 ^d	88.54±0.26 ^c	3.02±0.09 ^a	3.28±0.03 ^a	7.39±0.35 ^a	8.18±0.22 ^a
MAH	89.5±0.68 ^a	72.14±1.62 ^a	81.65±0.04 ^c	3.74±0.13 ^{ab}	4.23±0.04 ^{abc}	12.59±0.28 ^d	14.13±0.00 ^{ef}
HAH	94.69±1.14 ^{de}	72.73±1.31 ^a	80.59±0.74 ^b	5.52±0.56 ^c	6.12±0.67 ^d	12.01±0.04 ^d	13.29±0.07 ^d

*AAH (Alabalık Atığı Hidrolizatı), MAH (Mezgıt Atığı Hidrolizatı), HAH (Hamsi Atığı Hidrolizatı)

¹Aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar istatistikî açıdan önemlidir (p<0.05)

4.6.2. Optimizasyon Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Aminoasit Kompozisyonu

Farklı enzimlerle CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezigit atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının toplam amino asit içerikleri (g/100 g) Çizelge 4.48' de verilmiştir.

Alabalık, hamsi ve mezigit atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının toplam amino asit içerikleri incelendiğinde (g/100 g), en yüksek miktarda bulunan amino asitin tüm balık ve enzim gruplarında aspartik asit ve glutamik asit olduğu görülmektedir. Benzer sonuçlar diğer balık atıklarından elde edilen hidrolizatlarda da saptanmıştır (Benjakul ve Morissey, 1997; Bhaskar ve ark., 2008; Wisuthiphaet ve ark. 2016). Esansiyel amino asitler bakımından alabalık atığı hidrolizatlarında sistin ve histidin en yüksek alkali proteazda bulunurken, isolosin ve lösin, fenilalanin ve valin flavourenzim enzimi ile üretilen hidrolizatlarda saptanmış ve diğer esansiyel aminoasitler olan lizin, methionin ve treoninin ise protameks enzimi ile üretilen amino asitlerde önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Esansiyel amino asitler bakımından mezigit atığı hidrolizatlarında sistin, lizin, treonin ve histidin en yüksek alkali proteazda bulunurken isolosin + lösin ve valin flavourenzim ile üretilen hidrolizatlarda önemli oranda yüksek tespit edilmiştir ($p<0.05$). Esansiyel amino asitler bakımından hamsi atığı hidrolizatlarında sistin, histidin, lizin ve metiyonin en yüksek flavourenzim de bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.48. Farklı enzimlerle CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgit atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının toplam amino asit içerikleri (g/100 g)

	AP.A.	PMX.A	FLV.A.	AP.M	PMX.M	FLV.M.	AP.H.	PMX.H	FLV.H
EAA*									
*Histidin	0.66±0.01 ^c	0.62±0.01 ^b	0.45±0.00 ^a	0.69±0.00 ^b	0.29±0.00 ^a	0.34±0.00 ^a	0.55±0.00 ^a	0.55±0.00 ^a	0.61±0.00 ^b
*İzolösin+lösin	1.03±0.00 ^a	1.04±0.01 ^a	1.2±0.02 ^b	0.99±0.00 ^a	1.08±0.02 ^b	1.31±0.01 ^c	1.1±0.02 ^a	1.27±0.02 ^b	1.26±0.01 ^b
*Lizin	1.29±0.00 ^b	1.35±0.00 ^c	1.16±0.01 ^a	1.28±0.00 ^c	1.08±0.01 ^a	1.17±0.00 ^b	1.1±0.00 ^a	1.21±0.01 ^b	1.34±0.01 ^c
*Metiyonin	0.76±0.03 ^a	0.8±0.01 ^b	0.76±0.03 ^a	0.75±0.00 ^b	0.71±0.00 ^a	0.74±0.05 ^{ab}	0.68±0.01 ^a	0.83±0.03 ^b	0.9±0.00 ^c
*Fenilalalin	0.64±0.04 ^a	0.62±0.01 ^a	0.72±0.00 ^b	0.62±0.00 ^a	0.69±0.02 ^b	0.7±0.02 ^b	0.67±0.01 ^a	0.82±0.01 ^b	0.83±0.02 ^b
*Valin	0.84±0.00 ^b	0.63±0.00 ^a	1.06±0.01 ^c	0.87±0.01 ^a	1.05±0.05 ^b	1.12±0.02 ^c	1.19±0.00 ^a	1.29±0.01 ^c	1.23±0.01 ^b
*Sistin	0.27±0.00 ^b	0.2±0.00 ^a	0.21±0.01 ^a	0.42±0.00 ^c	0.23±0.01 ^a	0.3±0.00 ^b	0.34±0.00 ^a	0.38±0.01 ^b	0.49±0.01 ^c
EOAA*									
arginin	1.25±0.01 ^b	1.3±0.00 ^c	1.19±0.00 ^a	0.77±0.00 ^c	0.63±0.00 ^a	0.67±0.00 ^b	0.62±0.00 ^b	0.57±0.00 ^a	0.63±0.00 ^b
aspartik_asit	6.33±0.02 ^c	5.91±0.12 ^a	6.04±0.06 ^b	7.58±0.02 ^c	4.83±0.16 ^a	5.5±0.10 ^b	5.44±0.45 ^a	6.42±0.11 ^b	6.91±0.19 ^c
glutamik_asit	8.07±0.16 ^c	7.39±0.27 ^b	6.9±0.27 ^a	7.8±0.00 ^b	6.93±0.13 ^a	8.44±0.21 ^c	6.14±0.09 ^a	8.37±0.04 ^b	8.63±0.02 ^c
Prolin	1.63±0.08 ^a	1.93±0.04 ^b	1.89±0.02 ^b	0.93±0.00 ^a	1.15±0.01 ^b	1.42±0.02 ^c	0.88±0.01 ^a	1.35±0.01 ^b	1.37±0.00 ^c
Serin	4.19±0.01 ^b	4.46±0.06 ^c	3.63±0.03 ^a	4.57±0.00 ^c	3.49±0.01 ^a	3.85±0.06 ^b	3.26±0.01 ^a	4.27±0.00 ^c	3.97±0.02 ^b
Tirozin	0.45±0.00	0.31±0.00	0.34±0.00	0.35±0.00 ^a	0.41±0.01 ^c	0.37±0.02 ^b	0.51±0.01 ^b	0.47±0.01 ^a	0.55±0.01 ^c

*EAA, esansiyel amino asitler, EOAA: Esansiyel olmayan amino asitler.

*Aynı sütun içindeki farklı harfler 0.05 önem düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Bir gıdanın protein kalitesini ve organizmaların ihtiyaçlarını karşılama kapasitesini o gıdanın sahip olduğu esansiyel amino asitler belirler. Bir maddenin besleyici değerini belirlemek için test ve standart protein kaynakları arasındaki amino asit seviyeleri karşılaştırarak değerlendirilen kimyasal skor, bir çok araştırmacı tarafından kabul edilen bir yöntemdir (Sgarbieri, 1987; Bhaskar, ve Mahendrakar, 2008; Seligson ve Mackey, 1984; Ovissipour ve ark., 2009). Bu çalışmada, hesaplanan kimyasal skorlar FAO / WHO'nun (1990) erişkinler için referans protein değerlerine göre belirlenmiştir. Referans protein miktarlarına göre (FAO/WHO, 1990) elde edilen kimyasal skorlarda balık türlerine ve kullanılan enzime göre esansiyel aminoasitlerin kimyasal skorlarının değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.49). Tüm esansiyel amino asitler değerlendirildiğinde, lizin için en yüksek kimyasal skor alabalıklarda (%85.14) protameks, mezgitlerde (%83.66) alkali protez ile elde edilirken hamsilerde (%88.45) lizin için flavourenzim en yüksek kimyasal skor değerini vermiştir (Çizelge 4.49).

Bu çalışmada, protein hidrolizatlarının balıkların türüne ve enzim çeşidine göre değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Benzer şekilde, birçok araştırmacı balık protein hidrolizatlarının amino asit kompozisyonlarında değişiklik sergilediğini bildirmişlerdir (Bhaskar ve ark., 2008; Ovissipour ve ark., 2009; Wasswa ve ark., 2007). Shahidi ve ark. (1995), protein hidrolizatlarının bileşiminin, kullanılan enzim türüne göre değiştiğini belirtmişlerdir. Bunun yanında, balık protein hidrolizatlarının amino asit kompozisyonundaki varyasyonun esas olarak hammadde, enzim kaynağı ve hidroliz gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak farklılık gösterdiği belirtilmektedir (Benjakul ve Morissey, 1997; Klompongve ark., 2009b; Klompong ve ark., 2009a).

Amino asitlerin ve küçük peptitlerin kompozisyon, büyüklük ve seviyelerinin hidrolizatın fonksiyonel özelliklerini etkilediği belirtilmektedir (Wu ve ark., 2003). Aromatik amino asitler (tirozin, histidin, triptofan, ve fenilalanin) (Rajapakse ve ark., 2005), hidrofobik amino asitler (valin, lösin ve alanin) (Rajapakse ve ark., 2005) ve ayrıca metiyonini (Mendis ve ark., 2005) antioksidatif faaliyetlerde hayati rol oynadığı bildirilmiştir. Balık protein hidrolizatlarından örneğin hoki (Mendis ve ark., 2004), morina (Guerard ve Sumaya-Martinez, 2003)ve uskumru (Wu ve ark., 2003)' nun, yaygın olarak kullanılan sentetik anti-oksidanlar olan α -tokoferol ve bütillenmiş hidroksi anisol' den daha yüksek anti-oksidatif aktivite sergilediği bulunmuştur.

Bunun hidrolizatların serbest radikallerin eşlenmemiş elektronları ile pozitif yüklü proton veya hidrojenin vericileri olan Tirosin, Triptofan, Metiyonin, Lizin, Sistin'i yüksek içeriğinden kaynaklandığı öne sürülmektedir. (Sarmadi ve İsmail, 2010). Bu çalışmada her ne kadar hidrolizatların aminoasit miktarları referans protein kaynağının içerdiğiinden daha düşükte olsa tamamlayıcı veya fonksiyonel olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.49. Farklı enzimlerle CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezzgit atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının referans protein değerlerine göre kimyasal skorları

Aminositler(g/100 g kuru madde)	AP.A.	PMX.A	FLV.A	AP.M	PMX.M	FLV.M.	AP.H.	PMX.H	FLV.H	Referans protein ^a
Esansiyel Aminoasitler										
*Histidin	0.69	0.63	0.48	0.72	0.32	0.38	0.58	0.57	0.64	1.60
*İzolösin+lösin	1.08	1.05	1.29	1.04	1.18	1.46	1.17	1.32	1.33	3.20
*Lizin	1.35	1.36	1.25	1.34	1.18	1.31	1.17	1.26	1.42	1.60
*Metiyonin	0.80	0.81	0.82	0.78	0.77	0.83	0.72	0.86	0.95	1.70
*Fenilalalin	0.67	0.63	0.78	0.65	0.75	0.78	0.71	0.85	0.88	
*Valin	0.88	0.64	1.14	0.91	1.14	1.25	1.27	1.34	1.30	1.30
*Sistin	0.28	0.20	0.23	0.44	0.25	0.34	0.36	0.39	0.52	
Kimyasal skorlar										
*Histidin	43.19	39.10	30.31	45.10	19.74	23.74	36.55	35.71	40.26	
*İzolösin+lösin	33.70	32.80	40.41	32.35	36.76	45.74	36.55	41.23	41.58	
*Lizin	84.42	85.14	78.13	83.66	73.52	81.70	73.11	78.56	88.45	
*Metiyonin	46.81	47.49	48.18	46.13	45.49	48.64	42.54	50.72	55.91	
*Fenilalalin										
*Valin	67.65	48.90	87.87	69.98	87.97	96.26	97.34	103.08	99.92	
*Sistin										

^aYetişkinlerin ihtiyaç duyduğu esansiyelamino asit miktarları (FAO/WHO, 1990)

4.6.3. Optimizasyon Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının İz Element İçerikleri

Farklı enzimlerle CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, mezgıt ve hamsi atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının iz element içerikleri (%) Çizelge 4.50' de gösterilmiştir.

CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, mezgıt ve hamsi atıkları hidrolizatlarının iz element içerikleri değerlendirildiğinde; aynı enzim grubu içindeki farklı balık atıklarından elde edilen hidrolizatlar arasında önemli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.50). Özellikle alabalık atıklarından elde edilen hidrolizatların iz element içeriklerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu farklılıkların nedeninin balık atığı grupları arasındaki vücut parçalarının, beslenmelerinin ve çevre koşullarının etkisiyle oluştuğu düşünülmektedir. Çalışmada, flavourenzim ile hidrolize olan alabalık hidrolizatları hariç en yüksek iz element içeriğinin tüm gruplarda Cu olduğu ve bununda alkali protez enzimi ile hidroliz olan mezgıt atığı hidrolizatlarında (6.01mg) belirlendiği saptanmıştır ($p<0.05$).

CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, mezgıt ve hamsi atıkları hidrolizatlarının iz element içerikleri değerlendirildiğinde; aynı balık atıklarından elde edilen hidrolizatlar içindeki farklı enzimlerin hidrolizatların iz element içeriklerine önemli farklılıklar oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.51).Çalışmada bulunan bulgularla benzer şekilde Sathivel ve ark (2005), alkalaz, flavourenzim, proteks, palataz 2000 L, GC 106, ve nötraz enzimleri ile hidrolize olan kırmızı somon kafası hidrolizatlarının iz element içeriklerinde farklılıklar bulmuşlardır. Ayrıca bu hidrolizatların K, P, Ca,ve Mg kadar Zn ve Fe gibi mikronutrientler bakımından zengin olduğunu ve Pb, Sr ve Cd ise ağır metal içeriklerinde düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Sathivel ark., (2003) ringa balıklarının farklı vücut parçalarından elde edilen hidrolizatlarda (vücut, gonad, baş ve tüm vucüt hidrolizatları) iz element içeriklerini araştırmış ve sonuçta ringa balıklarının gonatlarından elde edilen hidrolizatlarda Cu, Fe ve Zn bakımından en yüksek içeriğe sahip olduğunu bulmuşlardır.

Çizelge 4.50. Farklı enzimlerle CYY ine göre optimize edilerek hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgit atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının iz element içerikleri (%)

Ağır Metal	AP.A.	AP.M	AP.H.	PMX.A	PMX.M	PMX.H	FLV.A.	FLV.M.	FLV.H
Cr	3,013±0,768 ^a	2,707±0,492 ^a	2,639±0,858 ^a	2,797±0,907 ^b	2,749±0,128 ^b	1,003±1,048 ^a	1,725±1,942 ^a	1,631±1,987 ^a	2,601±0,181 ^a
Cu	3,183±0,049 ^a	6,012±0,397 ^c	5,080±0,052 ^b	2,434±0,099 ^a	4,402±2,101 ^a	2,412±2,894 ^a	1,060±1,226 ^a	2,333±2,295 ^{ab}	3,690±1,491 ^b
Ni	0,460±0,136 ^a	0,913±0,131 ^b	1,224±0,068 ^c	0,581±0,033 ^a	0,697±0,017 ^a	0,654±0,750 ^a	0,364±0,415 ^a	0,517±0,626 ^a	1,263±0,085 ^b
Co	0,259±0,002 ^b	0,141±0,059 ^a	0,311±0,006 ^c	0,232±0,002 ^b	0,081±0,007 ^a	0,135±0,151 ^{ab}	0,122±0,138 ^{ab}	0,039±0,041 ^a	0,220±0,036 ^b
Pb	0,189±0,008 ^a	0,238±0,020 ^b	0,187±0,005 ^a	0,147±0,024 ^b	0,125±0,081 ^{ab}	0,057±0,063 ^a	0,048±0,067 ^a	0,232±0,298 ^a	0,169±0,110 ^a
As	0,174±0,245 ^a	0,286±0,204 ^a	0,234±0,303 ^a	0,318±0,449 ^a	0,118±0,166 ^a	0,531±0,419 ^a	0,414±0,585 ^a	0,017±0,024 ^a	TEDB

*TEDB: Tespit edilebilir düzeyde bulunamamıştır.

*Aynı satır içindeki farklı harfler 0.05 önem düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.51. Farklı enzimlerle hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgit atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının iz element içerikleri (mg/kg)

Ağır Metal	AP.A.	PMX.A	FLV.A.	AP.M	PMX.M	FLV.M.	AP.H.	PMX.H	FLV.H
Cr	3,013±0,768 ^a	2,797±0,907 ^a	1,725±1,942 ^a	2,707±0,492 ^a	2,749±0,128 ^a	1,631±1,987 ^a	2,639±0,858 ^b	1,003±1,048 ^a	2,601±0,181 ^b
Cu	3,183±0,049 ^b	2,434±0,099 ^b	1,060±1,226 ^a	6,012±0,397 ^b	4,402±2,101 ^{ab}	2,333±2,295 ^a	5,080±0,052 ^a	2,412±2,894 ^a	3,690±1,491 ^a
Ni	0,460±0,136 ^a	0,581±0,033 ^a	0,364±0,415 ^a	0,913±0,131 ^a	0,697±0,017 ^a	0,517±0,626 ^a	1,224±0,068 ^a	0,654±0,750 ^a	1,263±0,085 ^a
Co	0,259±0,002 ^b	0,232±0,002 ^{ab}	0,122±0,138 ^a	0,141±0,059 ^b	0,081±0,007 ^a	0,039±0,041 ^a	0,311±0,006 ^b	0,135±0,151 ^a	0,220±0,036 ^{ab}
Pb	0,189±0,008 ^b	0,147±0,024 ^b	0,048±0,067 ^a	0,238±0,020 ^a	0,125±0,081 ^a	0,232±0,298 ^a	0,187±0,005 ^b	0,057±0,063 ^a	0,169±0,110 ^b
As	0,174±0,245 ^a	0,318±0,449 ^a	0,414±0,585 ^a	0,286±0,204 ^a	0,118±0,166 ^a	0,017±0,024 ^a	0,234±0,303 ^{ab}	0,531±0,419 ^b	TEDB

* Aynı sütun içindeki farklı harfler 0.05 önem düzeyindeki farklılıkları göstermektedir.

*TEDB: Tespit edilebilir düzeyde bulunamamıştır.

Avrupa Komisyonu Yönetmeliği'nde önemli öğeler için yasal eşikler mevcut değildir (EC, 2006). AB düzeyinde gıdalardaki As için belirlenmiş maksimum seviye de yoktur. Bununla birlikte, Avrupa Komisyonu Tüzüğü (EC, 2006), Hg, Pb ve Cd'nin maksimum seviyesinin sırasıyla, 0.5, 0.30 ve 0.05 mg / kg yaş ağırlık olduğunu göstermektedir. Buna göre bu çalışmada Pb içeriğinin tüm hidrolizatlarda yasal sınırları aşmadığını göstermektedir. Hg ve Cd' nin tüm hidrolizatlarda tespit edilememiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, alabalık (*Onchoryncus mykiss*), hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve mezigit (*Merlangius merlangus*) atıkları, alkali proteaz (pH 8) üç farklı enzim oranı (%1, %1.5 ve %2), üç farklı süre (1, 4 ve 8 saat) ve üç farklı sıcaklık (40, 50 ve 60 °C) uygulanarak, protameks (pH 7.0) ve flavourenzim (pH 7.0) ise üç farklı süre (1, 4 ve 8 saat) ve üç farklı enzim oranı (%1, %1.5 ve %2) uygulanarak hidroliz edilmiştir. Buna göre çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. Alabalık, mezigit ve hamsi atıklarının kimyasal kompozisyonu kuru maddeye göre en yüksek protein içeriği %56.25 ile mezigit atığında ($p<0.05$), en yüksek lipit içeriği %57.71 ile alabalık atığında ve en yüksek kül içeriği %17.37 ile hamsi atığında tespit edilmiştir ($p<0.05$). Çalışmada balık atıklarının kimyasal kompozisyonunun balığın türüne, atığın vucüt parça oranlarına ve balığın büyüklüğüne göre değişebileceği belirlenmiştir.
2. Optimum hidroliz prosesinde alkali proteaz enzimi için en uygun süre, sıcaklık ve enzim oranı hidroliz derecesine(HD%) göre alabalık atığında 60°C, 1,0 saat ve %1 enzim oranı, mezigit atığında 60°C, 1,0 saat ve %1.27 enzim oranı ve hamsi atığında 44.06°C, 1,0 saat ve %1.05 enzim oranı olarak bulunmuştur.
3. Optimum hidroliz prosesinde en uygun süre, sıcaklık ve enzim oranı hidroliz derecesine(HD%) göre protameks için alabalık atığında 50°C, 1,0 saat ve %1.00 enzim oranı, mezigit atığında 50°C, 1,0 saat ve %1.0 enzim oranı ve hamsi atığında 50°C, 1.37 saat ve %1.01 enzim oranı olarak bulunmuştur.
4. Optimum hidroliz prosesinde flavourenzim için en uygun süre, sıcaklık ve enzim oranı hidroliz derecesine göre alabalık atığında 50°C, 1.30 saat ve %1.00 enzim oranı, mezigit atığında 50°C, 1.03 saat ve %1.0 enzim oranı ve hamsi atığında 50°C, 1.48 saat ve %1.00 enzim oranı olarak bulunmuştur.
5. Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezigit ve hamsi atığı hidrolizatlarının hidroliz dereceleri(HD%) incelendiğinde en yüksek hidroliz derecesi %74.30 ile

alabalık atığının protameks ile hidrolizatından elde edilirken, en düşük hidroliz derecesi %50.92 ile mezgıt atığının flavourenzim ile hidrolizinden elde edilmiştir. Bu çalışma ile, balık atığı türü ve enzim türüne göre hidroliz derecesinde değişebileceği belirlenmiştir.

6. Alkali proteaz, protameks ve flavourenzim kullanılarak CYY ile optimize edilmiş alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarının protein geri kazanımları incelendiğinde; en yüksek protein geri kazanımı %95.76 ile mezgıt %95.73 ile hamsi atığının protameks ile hidrolizine, mezgıt atığının alkali proteaz ile hidrolizatından %95.22 elde edilirken en düşük protein geri kazanımı %73.54 ile mezgıt atığının flavourenzim ile hidrolizinden elde edilmiştir. Bu çalışma ile, elde edilen farklı değerlerin balık türlerine, atık kompozisyonuna, enzim türüne, hidroliz yöntemine (sıcaklık, süre ve enzim oranı) göre değişik oranlarda elde edilebileceğini göstermiştir.
7. Farklı süre, sıcaklık ve enzim oranı ile hidrolize olan alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının moleküler ağırlıklarının sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile karakterizasyonu sonucunda, hidroliz süresi arttıkça büyük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin yoğunluklarında azalış, buna karşılık küçük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin yoğunluklarında ise artış görülmüştür.
8. Alabalık atıklarından elde edilen hidrolizatlarının SDS-PAGE ile karakterizasyonunda alkali proteaz enziminin, protein moleküllerinin enzim miktarından daha ziyade sıcaklık ve sürenin hidrolizasyon işlemine etki ettiği bulunmuştur. Mezgıt atıklarından elde edilen hidrolizatlarda alkali proteaz enziminin hidrolizasyon süresi arttıkça hidroliz derecesinde(HD %) arttığı belirlenmiştir. Hamsi atıklarından elde edilen hidrolizatlarda alkali proteaz enziminin etkisine bakıldığında, en büyük farklılığın sıcaklığın özellikle 50°C de yapılan hidrolizasyon ile elde edildiği görülmektedir.
9. Bu çalışmada, SDS profiline göre en iyi hidrolitik aktivitenin alkali proteaz enzimi ile sağlandığı bulunurken protameks ve flavourenzimin benzer hidrolitik aktiviteye sahip olabileceği tespit edilmiştir.
10. Alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarında ham protein içeriği kuru

madde bazında en yüksek %88.54 ile flavourenzim ile hidrolize olan alabalık atığı hidrolizatlarında bulunmuştur ($p<0.05$). Bunu sırasıyla %86.78 ile alkali proteaz ve % 86.36 ile protameks ile hidrolize olan alabalık atığı hidrolizatları izlemiştir ($p<0.05$).

11. Alabalık, mezgıt ve hamsi atığı hidrolizatlarında lipit içeriği kuru madde bazında en yüksek %6.12 ile flavourenzim ile elde edilen hamsi atığı hidrolizatlarında ($p<0.05$), en düşük lipit içeriği %3.28 ile flavourenzim ile elde edilen alabalık atığı hidrolizatlarında bulunmuştur ($p<0.05$).
12. Hidrolizatlar içinde en düşük kül içeriği %8.18 ile flavourenzim ile elde edilen alabalık atığı hidrolizatlarında ($p<0.05$), en yüksek ham kül içeriğinin %17.6 ile protameks ile elde edilen hamsi atığı hidrolizatlarında bulunmuştur ($p<0.05$).
13. Alabalık, hamsi ve mezgıt atıklarından elde edilen protein hidrolizatlarının toplam amino asit içerikleri incelendiğinde (g/100 g), en yüksek miktarda bulunan amino asitin tüm balık ve enzim gruplarında aspartik asit ve glutamik asit olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).
14. Esansiyel amino asitler bakımından alabalık atığı hidrolizatlarında sistin ve histidin miktarlarının en yüksek alkali proteaz ile hidroliz edilen hidrolizatlarda bulunurken, lizin, methionin ve treoninin ise protameks enzimi ile üretilen hidrolizatlarda önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Mezgit atığı hidrolizatlarında sistin, lizin, treonin ve histidin en yüksek alkali proteazda bulunurken ($p<0.05$), isolosin + lösin ve valin flavourenzim ile üretilen hidrolizatlarda tespit edilmiştir ($p<0.05$). Hamsi atığı hidrolizatlarında sistin, histidin, lizin ve metiyonin en yüksek flavourenzim de bulunmuştur ($p<0.05$).
15. Tüm esansiyel amino asitler değerlendirildiğinde, lizin için en yüksek kimyasal skor alabalıklarda (%85.14) protameks ile mezgıtlerde (%83.66) alkali protez ile elde edilirken, hamsilerde (%88.45) flavourenzim ile elde edilmiştir.
16. Bu çalışmada her ne kadar hidrolizatların aminoasit miktarları referans protein kaynağının içerdiğiinden daha düşükte olsa tamamlayıcı veya fonksiyonel olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.
17. Özellikle alabalık atıklarından elde edilen hidrolizatların iz element

içeriklerinin daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu farklılıkların nedeninin balık atığı grupları arasındaki vücut parçalarının, beslenmelerinin ve çevre koşullarının etkisiyle oluştuğu düşünülmektedir.

18. Flavourenzim ile hidrolize olan alabalık hidrolizatları hariç en yüksek iz element içeriğinin tüm gruplarda Cu olduğu ve en yüksek bakır içeriğinin alkali proteaz enzimi ile hidroliz olan mezigit atığı hidrolizatlarında (6.01mg) belirlendiği saptanmıştır.
19. Aynı balık türü atıklarından elde edilen hidrolizatlar içindeki farklı enzimlerin hidrolizatların iz element içeriklerine önemli farklılıklar oluşturduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre, balık atıklarından protein hidrolizatı üretilmesi konusunda şu öneriler sıralanabilir;

1. Balık atıklarından protein hidrolizatı üretiminde, atığın besin kompozisyonunun mevsimsel değişiminin gözönüne alınması,
2. Ülkemizde su ürünlerinden protein hidrolizatının ticari bir ürün haline dönüştürülebilmesi için değerlendirilemeyen ve avcılık yoluyla üretim miktarı yüksek olan türlerin tespitine yönelik çalışmaların yapılması,
3. Bu çalışmada optimizasyonunu sağlanan hidrolizatların fonksiyonel özelliklerinin ve farklı alanlarda kullanımlarının incelenmesi,
4. Elde edilen protein hidrolizatlarının depolamaya bağlı kalite değişimlerinin incelenmesi,
5. Balık atıklarının enzimatik hidrolizinde alkalın proteaz enziminin fiyat/fayda bakımından fizibilite raporunun araştırılması,
6. Balık protein hidrolizatlarının üretiminde ortaya çıkan yan ürünlerin (1. ve 4.fazda bulunan bileşeneler) değerlendirilmesine yönelik çalışmaların yapılması,
7. Hidrolizat üretiminde önemli bir basamak olan kurutma, ürün kalitesinin korunması amacıyla çoğunlukla liyofilizasyon ile gerçekleştirilmekte, bu durum zaman ve maliyet açısından sıkıntı yaratmaktadır. Bu nedenle kurutma işleminde liyofilizasyonla kalite açısından rekabet edecek, daha hızlı ve düşük maliyetli yöntemlerin araştırılması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. J. Agric.
- Adler-Nissen, J., 1984. Control of the proteolytic reaction and the level of bitterness in protein hydrolysis processes, J. Chem. Technol. Biotechnol., 34B, 215.
- Althouse, P.J., Dinakar, P., Kilara, A. 1995. Screening of proteolytic enzymes to enhance foaming of whey protein isolates. J Food Sci 60:1110–2.
- Amago, T. 2001. Sizing optimization using response surface method in FOA, R & D Review of Toyota CRDL, Vol. 37, Nummber 1, pp. 1-7.
- Amiza, M. A., Kong, Y. L., Faazaz, A. L. 2012. Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of *Cobia (Rachycentron canadum)* frame hydrolysate. International Food Research Journal, 19(1).
- Anonim, 2006. Miyosin ve aktinin yapısal şekli http://education-portal.com/cimages/multimages/16/actin_filament.PNG- (Erişim tarihi: 20.12.2017).
- Anonim, 2009. Proteinler www.lisebiyoloji.com/protein.html- (Erişim tarihi: 20.12.2017).
- AOAC, 1990. In Helrich K. (Ed.), Official methods of analysis. (15th ed.). Arlington, VA, USA.
- AOAC, 1998. Official Methods of Analysis, 16 th Ed., Chapter 39. (Chapter editor D.L., Soderberg) In: Official Methods of Analysis of AOAC International (Edited by P. Cunniff). Gaithersburg, MD.
- Aspmo, S.I., Horn, S.J, Eijsink, V.G.H. 2005. Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. Journal of Applied Microbiology 99: 1082–1089.
- Baek, H.H., Cadwaller, K.R. 1995. Enzymatic Hydrolysis of Crayfish Processing By-products. Journal Food Science, 60(5): 929-935.
- Baharuddin, N.A., Halim, N.R.A., Sarbon, N. M. 2016. Effect of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of eel (*Monopterus Sp.*) protein hydrolysate. International Food Research Journal, in press.
- Bakar, J., Shamloo, M., Mat Hashim, D., Khatib, A. 2012. Biochemical properties of red Tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. International Food Research Journal 19(1): 183-188.
- Baş, C., 2010. Cevap Yüzeyi Tasarımları ve Sinir Ağları Yaklaşımı. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İstatistik Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi.
- Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. 2004. Fish, wales, crustaceans, mollusks. Food chemistry. Berlin, Heidelberg:Springer, 619–642.

- Benjakul, S., Morrissey, M. T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solidwastes. *Journal of Agricultural ve Food Chemistry*, 45(9): 3423–3430.
- Bhaskar, N., Benila T., Rahda, C., Lalitha R.G. 2008. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Catla (*Catla catla*) For Preparing Protein Hydrolysate Using a Commercial Protease. *Bioresource Technology*, 99: 335-343.
- Bhaskar, N., Mahendrakar, N.S. 2008. Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresource Technology*, 99: 4105–4111.
- Blaber, M., 2001. Skeletal Muscle Myosin and Muscle Contraction <http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture31/Lecture31.htm>- (Erişim tarihi: 20.12.2017).
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phy.* 37: 911-917.
- Box, G.E.P., Behnken, D.W. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2:455–475.
- Bucher, C., Most, T. 2008. A comparison of approximate response functions in structural reliability analysis. *Probabilistic Engineering Mechanics*, 23(2-3): 154-163.
- Byun H.G., Kim, S.K. 2001. Purification ve Characterization of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) Skin. *Process Biochemistry*, 36: 1155-1162.
- Carjaval, A.K. 2013. Utilization of by-products from Norwegian springspawning herring for human consumption. PhD thesis, NTNU, Faculty of Natural Sciences ve Technology, Department of Biotechnology, PhD thesis.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Nokihara, K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem*, 44(9):2619–2623.
- Chan, P. T., Matanjun, P. 2017. Chemical composition ve physicochemical properties of tropical red seaweed, *Gracilaria changii*. *Food Chemistry*, 221, 302-310.
- Chalamaiah, M., Narsing Rao, G., Rao, D. G., & Jyothirmayi, T. (2010). Proteinhydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg ve evaluation of theirfunctional properties. *Food Chemistry*, 120, 652–657.
- Chalamaiah, M., Dinesh K. B., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T.. 2012. Fish Protein Hydrolysates: Proximate Composition, Amino Acid Composition, Antioxidant Activities ve Applications: A Review. *Food Chemistry*, 135: 3020-3038.
- Cho, S. M., Kwak, K. S., Park, D. C., Gu, Y. S., Ji, C. I., Jang, D. H. 2004. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. *Food Hydrocolloids*, 18: 573–579.
- Chotikachinda, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Rustad, T., Kumarnsit, E. 2013. Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*)

- viscera as feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition*, 19(5): 773-784.
- Değirmencioglu, A. ve Yazgi, A. 2006. Tepki Yüzeyleri Metodolojisi Optimizasyon Esaslı Çalışmalara İlişkin Teorik Esaslar ve Tarımsal Mekanizasyon Uygulamaları. *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi*, 2(2): 111-115.
- Detkamhaeng, N., Warawattanamateekul, W., Hinsui, J. 2016. Production of Protein Hydrolysate from Yellowfin (*Thunnus albacares*) Skipjack Tuna (*Katsuwonous pelamis*) Viscera. *Kasetsart Universty Fisheries Research Bulletin* 40(2):52.
- Diniz, F. M., Martin, A.M. 1997. Effects of the Extent of Enzymatic Hydrolysis on Functional Properties of Shark Protein Hydrolysate. *Lebensm. Wiss. U.Technol.*, 30: 266-272.
- Disney, J.G., Tatterson, I. N., Oley, J. 1977. Recent development in fish silage In: proceedings of the conference on the handling, processing and marketing of tropical fish. London: 273- 275.
- Doucet, D., Gauthier, F.S., Otter, E.D., Foegeding, A.E. 2003. Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: comparison with the plastein reaction and characterization of interactions. *J Agric Food Chem*, 51: 6036–42.
- Dumay, J. 2006. Extraction de lipides en voie aqueuse par bioréacteur enzymatique combiné à l'ultrafiltration : application à la valorisation de co-produits de poisson (*Sardina pilchardus*). Ph.D. Thesis.
- Duncan, O. D., Beverly, D. 1955. A methodological analysis of segregation indices. *American Sociological Review*, 20: 210-7.
- Eryilmaz, E. B., Dursun, D., Dalgic, A. C. 2016. Multiple optimization and statistical evaluation of astaxanthin production utilizing olive pomace. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7: 224-227.
- Esteban, M. B., Garcia, A. J., Ramos, P., Marquez, M. C. 2007. Evaluation of fruit–vegetable and fish wastes as alternative feedstuffs in pig diets. *Waste Management*, 27: 193–200.
- European Commission Regulation (EC) (2006). Setting maximum levels for certain contaminants in food stuffs, No 1881.
- Kechaou, E. S., Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Jaouen, P., Gouygou, J.P., Berge, J. P., Amar, R. B. (2009). Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (*Sepia officinalis*) and sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution ve amino acid composition. *Journal of Bioscience ve Bioengineering* ,107(29): 158–164.
- Falveysz, J., Szymczyk, K., Ichihashi, H., Bielawski, L., Gucia, M., Frankowska, A., Yamasaki, S. 2001. ICP/MS ve ICP/AES elemental analysis (38 elements) of edible wild mushrooms growing in Polve. *Food Addit. Contam.*,18(6):503-13.
- FAO/WHO (1990). Energyve protein requirements. Report of joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series, 724: 116–129.

- Feng, J. Xion, Y.L. 2003. Interaction and functionality of mixed myofibrillar and enzyme-hydrolyzed soy proteins. *J Food Sci* 68:803–9.
- Five, K. 2012. Enzymatic hydrolysis of salmon frames - effect of process conditions on ACE-inhibiting activities of fish protein hydrolysates. NTNU, Department of Biotechnology, Master's thesis.
- Gao, M., Hirata, M., Toorisaka, E., Hano, T. (2006). Acid-hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*, 97(18): 2414–2420.
- Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69: 615–622.
- Ghaedian, R., Coupland, J.N., Decker, E.A., McClements, D.J. 1998. Ultrasonic determination of fish composition. *J. Food Eng.* 323-337.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., Gómez-Guillén, M. C. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114: 976–983.
- Gomes, A.M., Malcata, F.X. 1998. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. *Journal of dairy science*, 81(6): 1492-1507.
- Guerard, F., Dufosse, D., De La Broise, D., Binet, A. 2001. Enzymatic Hydrolysis of Proteins from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Wastes Using Alkalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11: 1051-1059.
- Guerard, F., Guimas, L., Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19, 489-498.
- Guerard, F., Sumaya-Martinez, M. T. 2003. Antioxidant effects of protein hydrolysates in their reaction with glucose. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(5): 467–470.
- Hasmann, F.A., Cortez, D.V., Junior, A.P., Roberto, I.C. 2003. Optimization of β -xylosidase recovery by reversed micelles using response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(2): 153-160.
- He, S., Franco, C., Zhang, W., 2013. Functions, Applications ve Production of Protein Hydrolysates from Fish Processing Co-Products (FPCP). *Food Research International*, 50: 289-297.
- Herpvei, N. H., Rosma, A., Wan Nadiyah, W.A. 2011. The Tuna Fishing Industry: A New Outlook on Fish Protein Hydrolysates. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 195-207.
- Hinsui, J., Detkamhaeng, N., Worawattanamatekul, W. 2016. Production of protein hydrolysate from yellowfin (*Thunnus albacares*) and skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera. *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin*, 40(2): 51-67.
- Hordur, G., Kristinsson, B., Rasco, A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical ve functional properties. *Food Science ve Nutrition*, 40(1): 43–81.

- Hoskin, D.W., Ramamoorthy, A. 2008. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys.* 1778: 357–375.
- Hou, H., Li, B., Zhao, X., Zhang, Z., Li, P. 2011b. Optimization of enzymatic hydrolysis of Alaska pollock frame for preparing protein hydrolysates with low bitterness. *LWT–Food Science ve Technology*, 44: 421–428.
- Hoyle, N.T., Merritt, J.H., 1994. Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59 (1): 76-79.
- Hultin, H. O., Kelleher, S. D. 2000. Surimi processing from dark muscle fish. *Food Science And Technology-New York-Marcel Dekker*, 59-78.
- Hultman, L. 2004. Endogenous proteolytic enzymes - Studies of their impact on fish muscle proteins ve texture. NTNU, Faculty of Natural Sciences ve Technology, Department of Biotechnology, PhD thesis.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W. 2011. Chemical compositions of the roes from skipjack, tongol ve bonito. *Food Chemistry*, 15: 1328-1334.
- Jung, W., Mendis, E., Je, J., Park, P., Son, B. W., Kim, H. C., Choi, Y. K., Kim, S. 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 94: 26–32.
- Kaymaz, I., Mc Mahon, C.A. 2005. A response surface method based on weighted regression for structural reliability analysis. *Probabilistic Engineering Mechanics*, 20(1): 11-17.
- Kent, L., 2008. Çoklu doymamış Yağ Asitleri Eldesi: Tepki Yüzey Metodolojisi ile Optimizasyonu, Doktora Tezi, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kıvrak, İ. 2015. Chemical constituents: water-soluble vitamins, free amino acids ve sugar profile from *Ganoderma adspersum*. *Nat Prod Res.* 2015 Mar;29(6):518-23.
- Kim, S.K., Mendis, E. 2006. Bioactive Compounds from Marine Processing Byproducts-A Review. *Food Research International*, 39: 383-393.
- Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., Hayes, K.D. 2009a. Amino acid composition and antioxidant and peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *Journal of Food Science*, 74: 126–133.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F. 2009b. Characteristics ve use of Yellow Stripe Trevally hydrolysate as culture media. *Journal of Food Science*, 74: 219–S225.
- Koç, B. ve Kaymak-Ertekin, F., Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları, *Gıda*, 35 (1), 63-70, 2009.
- Koç, S. 2016. Hamsi (*Engraulis encrasicolus*) ve İşleme Atıklarından Elde Edilen Protein Hidrolizatlarının Besleyici, Fonksiyonel Ve Biyoaktif Özelliklerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ç.O.M.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.

- Kong, M., Lee, J. 2006. A Generalized Response Surface Model with Varying Relative Potency for Assessing Drug Interaction, *Biometrics*, 62: 986-995.
- Köksoy, O. 2001. Taguchi ve Cevap Yüzeyi Felsefelerinin Birleştirilmesi: Problem ve Çözüm Teknikleri Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A., 2000a. Biochemical ve Functional Properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 657-666.
- Kuipers, B.J.H., Van Koningsveld, G.A., Alting, A.C., Driehuis, F., Gruppen, H., Voragen, A.G.J. 2005. Enzymatic hydrolysis as a means of expanding the cold gelation conditions of soy proteins. *J Agric Food Chem* 4: 1031-8.
- Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noë 1, J., Fleurence, J. 2003. In vitro proteolysis of myofibrillar ve sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Effects of cathepsins B, D ve L. *Food Chemistry*, 81: 517-525.
- Lalaidis, G., Bostrom, S., Sjoberg, L.B. 1978. Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: Chemical composition and nutritive value. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (3): 751-756.
- Laemli. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* 227: 680-685.
- Lee, Y., Hwang, K. T. 2017. Changes in physicochemical properties of mulberry fruit (*Morus alba* L.) during ripening. *Scientia Horticulturae*, 217: 189-196.
- Liaset, B., Lied, E., Espe, M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry: Chemical characterisation ve nutritional evaluation. *Journal of the Science of Food ve Agriculture*, 80: 581-589.
- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., Espe, M. 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex protease. *Process Biochem.*, 37: 1263-9.
- Liceaga-Gesualdo, A. M., Li-Chan, E.C.Y. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64: 1000-1004.
- Lin, S., Chiang, W., Cordle, C.T., Thomas, R.L. 1997. Functional and immunological properties of casein hydrolysates produced from a two-stage membrane system. *J Food Sci.*, 62: 480-3.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Rveall, R.J., 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Meldstad, F. 2015. Hydrolysis of Marine Cod (*Gadus Morhua*) Head-Utilization of rest raw material from cod for production of ingredients for human consumption Master's thesis, NTNU.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S. 2004. Antioxidant properties of a radicals scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatine hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3): 581-587.

- Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K., 2005. Antioxidant Properties of a Radical-Scavenging Peptide Purified from Enzymatically Prepared Fish Skin Gelatin Hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 581-587.
- Mohr, V. 1977. Fish protein concentrate production by enzymatic hydrolysis. *The Federation of European Biochemical Societies*, 44: 53–62.
- Murray, J., Burt, J.R. 2001. The Composition of Fish. Ministry of Technology, Torry Research Station, Torry Advisory Note No. 38. Retrieved March 19, 2016, from <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5916e/x5916e00.htm>.
- Myers, R.H., Khuri, A.I. 1981. Design Related Robustness of Tests in Regression Models. *Commun. Statist.*, 10: 223-235.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C. 2002. *Response Surface Methodology Process ve Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley & Sons; Inc. New York.
- Nakai, S., Li-Chan, E. C. Y. ve Dou, J. 2006. Experimental Design ve Response-Surface Methodology, in *hand book of Food ve Bioprocess Modeling Techniques*, 294-317, Eds.
- Neter, J., Wassermann, W., Whitmore, G. A. 1999. *Applied Statistics*, Allyn ve Bacon, New York.
- Neil, D., Guy, S. 2013. *Handbook of proteolytic enzymes*, volume 2. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 3rd edition.
- Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M., Keshavarz, M. 2012. A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes.
- Nguyen, H.T.M., Sylla, K.S.B., Randriamahatody, Z., Donnay-Moreno, C., Moreau, J., Tran, L.T., Bergé, J.P. 2011. Enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by-products using Protamex protease. *Food Technology and Biotechnology*, 49 (1): 48–55.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., Assavanig, A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, 70: 571–578.
- Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., Shahiri, H. 2009a. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238–242.
- Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Regenstein, J. M., Gildberg, A., Rasco, B. 2012. Use of hydrolysates from Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, 5: 73–79.
- Pastoriza, L., Sampedro, G., Cabo, M. L., Herrera, J. J. R., Bernardez, M. 2003. Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 83–88.

- Pasupuleti, V. K., Braun, S. 2010. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, 11–32.
- Raghavan, S., Kristinsson, H.G. 2008. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (4) : 1434-1441.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y., Kim, S. K. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussels and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38: 175–182.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 597-635.
- Roslan, J., Yunus, K.F., Abdullah, N., Mazlina, S., Kamal, M. 2014. Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-Product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2: 312-319.
- Roslan, J., Mustapa Kamal, S. M., Yunus, K. F., Abdullah, N. (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product using response surface methodology. *International Food Research Journal*, 22(3): 1117–1123.
- Rustad, T., Storror, I., and Slizyte, R. 2011. Possibilities for the utilisation of marine by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, 46: 2001–2014.
- Quaglia, G. B., Orban, E. 1987. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 38(3): 271–276.
- Quaglia, G. B., Orban, E. 1990. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates, *J. Food Sci.*, 55(6): 1571.
- Sanmartin, E., Arboleya, J. C., Villamiel, M., Moreno, J. 2009. Recent advances in the recovery and improvement of functional proteins from fish processing by-products: Use of protein glycation as an alternative method. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(4): 332–344.
- Santos, S.D.A., Martins, V.G., Salas-Mellado, M., Prentice, C., 2011. Evaluation of Functional Properties in Protein Hydrolysates from Bluewinged Teal (*Prioniturus punctatus*) Obtained with Different Microbial Enzymes. *Food Bioprocess Technol.*, 4: 1399-1406.
- Sarmadi, B.H., Ismail, A. 2010. Anti-oxidative peptides from food proteins: A review. *Food Science and Technology*, 31(10): 1949–1956.
- Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K.D., Prinyawiwatkul, W. 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) by product hydrolysates. *J Food Sci.*, 68: 2196–200.
- Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W., Bechtel, P. J. 2005. Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 70(6): 401–406.

- Seligson, F. H., Mackey, L. N. 1984. Variable predictions of protein quality by chemical score due to amino acid analysis and reference pattern. *The Journal of Food Nutrition*, 114: 682–691.
- Sgarbieri, V.C. 1987. *Alimentação e Nutrição: fator de saúde e desenvolvimento*. UNICAMP, Campinas, Brazil.
- Shahidi, F. 1994. 16 Seafood processing by-products. *Seafoods: Chemistry, Processing Technology and Quality*, 320.
- Shahidi, F., Han, X.Q., Synowiecki, J. 1995. Production ve Characteristics of Protein Hydrolysates from Capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53: 285-293.
- Simpson, B. K., Nayeri, G., Yaylayan, V., Ashie, N. A. 1998. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chemistry*, 61(1/2): 131–138.
- Slizyte, R. 2004. Hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Influence of raw material composition ve process conditions. PhD thesis, NTNU, Faculty of Natural Sciences ve Technology, Department of Biotechnology.
- Slizyte, R., Rustad, T., Storro, I. 2005. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by products: Optimization of yield ve properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, 40: 3680–3692.
- Slizyte, R., Dauks̄as, E., Falch, E., Storro, I., Rustad, T. 2005a. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40: 1415–1424.
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. 2007. Biochemical and functional properties of Sardinelle (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*. 45: 187–194.
- Sugiyama, K., Takada, K., Egawa, M., Yamamoto, I., Onzuka, H., Oba, K. 1991. Hypotensive effect of fish-protein hydrolysate. *J Japan Soc Biosci Biotechnol Agrochem*, 65:35– 43.
- Suvanich, V., Ghaedian, R., Chanamai, R., Decker, E.A.E.A., McClements, DJ. 2006. Prediction of proximate fish composition from ultrasonic properties: catfish, cod, flounder, mackerel and salmon. *Journal of Food Science*, 63: 966-968.
- Şehirlioğlu, A.K. 1997. Ürün ve süreç kalitesini iyileştirmede kullanılan istatistiksel modelleme teknikleri üzerine bir araştırma, 362 sayfa, Ankara.
- Theodore, A. E. 2005. Bioactive and functional properties of catfish protein hydrolysates and catfish protein isolates .Doctoral dissertation, University of Florida.
- Trinh, T.K., Kang, L.S. 2010. Application of response surface method as an experimental design to optimize coagulation tests, *Environ. Eng. Res.* 15: 63–70.
- Tveit, G. M. 2014. Enzymatic hydrolysis of chicken rest raw material. Master's thesis, NTNU, Department of Biotechnology.

- Tzia, C., Liadakis, G. 2003. Extraction Optimization in Food Engineering. CRC Press, USA., 170-171.
- Vareltzis, K. 2000. Fish proteins from unexploited veunderdeveloped sources. Novel macromolecules in food systems. Elsevier, 133–159.
- Venugopal, V. 2009b. Seafood proteins: Functional properties and protein supplements. Marine products for healthcare.
- Vercruyssen, L., Camp, J. V., Smagghe, G. 2005. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(21): 8106–8115.
- Viera, G. H. F., Martin, A. M., Sampaio, S. S., Omar, S., Gonsalves, R. C. F. 1995. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus* spp.) processing wastes. *Journal of Food Science and Agriculture*, 69: 61–65.
- Wangtueai, S., Noomhorm, A. 2009. Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida* spp.) scales. *Food Science and Technology*, 42(4) :825-834.
- Wasswa, J., Tang, J., Gub, X., Yuan, X. 2007. Influence of the Extent of Enzymatic Hydrolysis on the Functional Properties of Protein Hydrolysate from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Skin. *Food Chemistry*, 104: 1698-1704.
- Wisuthiphaet, N., Klinchan, S., Kongruang, S. 2016. Fish protein hydrolysate production by acid and enzymatic hydrolysis. *KUMTNB Int J Appl Sci Technol.*, 9(4): 261-270.
- Wu, H., Chen, H., Shiau, C. 2003. Free amino acids ve peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of Mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, (36): 949–957.
- Xu, X. 2003. Engineering of enzymatic reactions ve reactors for lipid modification ve synthesis, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105: 289-304.
- Yin, Y., Carter, C.W. 1996. Incomplete factorial and response surface methods in experimental design: yield optimization of TRNATrp from in vitro T7 RNA polymerase transcription, *Oxford University Press Nucleic Acids Research*, 24(7): 1279–1286.
- Yoon, S., Watanabe, E., Ueno, H., Kishi, M.J. 2015. Potential habitat for chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in the Western Arctic based on a bioenergetics model coupled with a three-dimensional lower trophic ecosystem model. *Prog. Oceanogr.* 131: 146–158.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Koray KORKMAZ
Doğum Yeri :Ordu
Doğum Tarihi :25.05.1981
Yabancı Dili :İngilizce
E-mail :koraykorkmazodu@gmail.com
İletişim Bilgileri :0 505 713 00 81

Öğrenim Durumu :

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Su Ürünleri	Çukurova Üniversitesi	2003
Y. Lisans	Su Ürünleri	Çukurova Üniversitesi	2008

İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl
Öğretim Görevlisi	Ordu Üniversitesi Fatsa Meslek Yüksekokulu	2009-

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

1. Tokur, B., Korkmaz, K., Ayas, D., 2006 Comparison of Two Thiobarbituric Acid (TBA) Method for Monitoring Lipid Oxidation in Fish Ege Üniversitesi Journal of Fisheries&Aquatic Science
2. Tokur, B., Korkmaz, K., 2007 The effects of an iron-catalyzed oxidation system on lipids ve proteins of dark muscle fish Food Chemistry
3. Tokur, B., Korkmaz, K., 2007 The effects of fenton type (Fe+2/H2O2) oxidation system on lipid ve protein oxidation of grey mullet(Mugil cephalus) Journal of Fisheries Sciences

4. Özyurt, G., Tokur, B., Özoğul, Y., Korkmaz, K., ve Polat, A.,2007 İnce dudaklı kefal (*Liza ramada*)'in yağ asidi muhafazası (4°C) sırasında lipid oksidasyonu
Journal of Fisheries Sciences

b) Bildiriler -Uluslararası –Ulusal

1. Tokur Bahar, Korkmaz Koray (2017). Bioactive Fish Peptides Derived from Fishery by Products. International Congress of Agriculture and Environment (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4087248)

2. Korkmaz Koray, Tokur Bahar (2017). Proximate Composition of Three Different Fish (Trout, Anchovy and Whiting) Waste In Different Month. International Congress of Agriculture and Environment (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4087216)

3. Tokur Bahar, Korkmaz Koray (2017). Tetrodotoxin Binding Protein In the Marine Puffer Fish. International Symposium on Pufferfish (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4060383)

4. Tokur Bahar, Korkmaz Koray (2017). Electrophoretic Patterns of Liver and Muscle Proteins of Pufferfish, *Torquigener flavimaculosus* (Hardy Randall, 1983). International Symposium on Pufferfish (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4060415)

5. Karakaya Bahar, Polat Abdurrahman, Korkmaz Koray (2008). The changes of protein quality and lipid oxidation during frozen storage 18 °C of rainbow trout (*onchrynchus mykiss*) fed with suplementation of selenomethionine. ICST (Özet Bildiri/) (Yayın No:2440856)

6. Korkmaz Koray (2007). Selenometiyonin katkılı yem ile beslenen gökkuşağı alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) buzda depolanması esnasında protein kalitesi ve lipid oksidasyonunda meydana gelen değişimler. Çukurova (6461), 31 (Kontrol No: 537821)

7. Özyurt Gülsün, Karakaya Bahar, Özkütük Ali Serhat, Korkmaz Koray (2009). Kekik İlavesinin Sardalyanın (*Sardina pilchardus*) Buzda Depolanma Süresi Üzerine Etkilerinin Duyusal ve Kimyasal Yönden Değerlendirilmesi. 15. Su Ürünleri Sempozyumu (Yayın No:2441332)

c) Katıldığı Projeler

1. Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Protein Hidrolizatı ve Yan Ürünlerinin Kalitelerinin Kimyasal ve Fiziksel Olarak Değerlendirilmesi ODÜ/BAP (BD-1701)
2. Balık Atıklarından Elde Edilen Protein Hidrolizatı Yan Ürünü Balık Yağının Yem sektörü İçin Değerlendirilmesi ODÜ/BAP (AR-1646)
3. Hasat Sonrası Sodyum Bikarbonat Enjeksiyonunun Alabalıkların (*Onchoryncus mykiss*), Rigor Mortis Sürecine Etkisi ODÜ/BAP (HD-1710)
4. Kızartma Yağına Eklenen Antioksidanların Balıkların Et Kalitesine Etkisinin Belirlenmesi ODÜ/BAP (HD-1715)