

# Çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve alabalık (*Oncorhynchus mykiss*)'ların baş bölgesinden elde edilen protein hidrolizatlarının depolamadaki kararlılığı

## Stability of fish protein hydrolysate from heads of gilthead sea bream (*Sparus aurata*), european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during storage

Nida Demirtaş Erol<sup>1</sup> • Ömer Alper Erdem<sup>2</sup> • Şükran Çaklı<sup>2\*</sup> 

<sup>1</sup> Munzur Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Tunceli

<sup>2</sup> Ege Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Bornova-İzmir

\* Corresponding author: [sukrancakli@gmail.com](mailto:sukrancakli@gmail.com)

Received date: 06.06.2017

Accepted date: 18.08.2017

### How to cite this paper:

Demirtaş, N., Erdem, Ö.A. & Çaklı, Ş. (2017). Stability of fish protein hydrolysate from heads of gilthead sea bream (*Sparus aurata*), european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during storage. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(3): 327-336. doi:10.12714/egejfas.2017.34.3.12

**Öz:** Bu çalışma kapsamında, Türkiye'de kültüre edilen çipura (*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve alabalıkların (*Oncorhynchus mykiss*) fileto edilmesi sonucunda ortaya çıkan atıklarından olan baş bölgesinden, protein hidrolizati elde edilmiştir. Elde edilen ürünlerin bazı fonksiyonel ve antioksidan özellikleri tespit edildikten sonra dondurularak 6 ay süreyle depolanan protein hidrolizatlarının depolama sonrası kararlılığı analizlerle belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen hidrolizatlarda; hidroliz derecesinin ölçülmesi, fonksiyonel özellikler (protein çözünürlüğü, emülsiyon özellikleri, renk özellikleri, su tutma kapasitesi tespiti (WHC)), antioksidan özellikler (DPPH (1,1-diphenyl-2-pic-ryhidrayl) serbest radikali giderme kapasitesi, antioksidatif aktivite tespiti, metal şelatlama ve aminoasit diziliminin tanımlanması yapılmıştır. Üretimden sonra -18 °C' de depolamaya alınan balık protein hidrolizatlarında depolama süresinin etkisini değerlendirmek amacıyla, yukarıda açıklanan fonksiyonel ve antioksidatif özellikleri kapsayan analizler 6 aylık depolama periyodu sonunda tekrarlanmıştır. Tüm sonuçlar istatistiksel analizler kullanılarak yorumlanmıştır. Balık protein hidrolizatının fonksiyonel ve antioksidatif özelliklerine göre en yüksek antioksidan aktivitesi, çipura hidrolizatında belirlenmiştir. Tüm balık protein hidrolizatlarının üretim verimi % 5'tir. Balık protein hidrolizatlarının fonksiyonel ve antioksidan özellikleri balık türüne göre değişkendir.

**Anahtar kelimeler:** Protein hidrolizati, yan ürünler, çipura, levrek, alabalık, fonksiyonel özellikler, depolama kararlılığı

**Abstract:** In the present study, protein hydrolysate was obtained from the head region from the wastes produced during filleting of seabream (*Sparus aurata*), seabass (*Dicentrarchus labrax*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Turkey. After the functional and antioxidant properties of the obtained products were determined, the post-storage stability of the protein hydrolysates stored frozen for 6 months was determined by analysis.

In this study, degree of hydrolysis, functional properties (protein solubility, emulsion properties, foaming properties, color properties, water holding capacity (WHC)), antioxidant properties (DPPH (1,1 -diphenyl-2-pic-ryhidrayl) free radical scavenging capacity, antioxidative activity, metal chelating) and determination of aminoacid sequencing were carried out in protein hydrolysate. To evaluate the effect of storage time on fish protein hydrolysates stored at -18°C after production, the above-mentioned analyzes including functional and antioxidative properties were repeated at the end of the 6 month storage period. Results were interpreted using statistical analysis. According to the functional and antioxidative properties of fish protein hydrolysate, the highest antioxidant activity was determined in seabream head hydrolysate. The production yield of all fish protein hydrolysates is 5%. The functional and antioxidant properties of fish protein hydrolysates varied according to fish species.

**Keywords:** Protein hydrolyzate, by products, seabream, seabass, trout, functional properties, storage stability

## GİRİŞ

Balıkçılık yan ürünlerinin çoğunluğu Türkiye'de; balık yağı, balık unu, gübre, evcil hayvan yemi ve balık silajı üretmek için kullanılır. Ancak, bu geri kazanılan ürünlerin çoğu düşük ekonomik değere sahiptir. En yüksek karlılık günümüzde biyoaktif bileşiklerden beklenir. Bu biyoaktif bileşenler, basitten

karmaşığa doğru çeşitli teknolojiler ile ekstrakte edilebilir ve saflaştırılabilir. Böylesi bileşenler, biyoteknolojik ve farmasötik uygulamalar için biyoaktif peptitlerin, oligosakkaritlerin, yağ asitlerinin, enzimlerin, suda çözülen minerallerin ve biyopolimerlerin hazırlanması ve izolasyonunu içerebilir.

Proteinler biyolojik olarak aktif peptitler üreterek hidrolize olabilmektedir. Proteinlerin hidrolize edilmesi de bu biyoaktif bileşenleri ekstrakte etmenin bir yoludur. 2015 yılında Türkiye'de yetiştiricilik üretimi 240 344 ton olarak gerçekleşmiştir. Alabalık 100 411 ton; çipura 51 844 ton ve levrek 75 164 ton olarak yetiştirilmiştir (TÜİK, 2016). Ülkemizde üretilen çipura, levrek ve alabalıkların bir miktarı su ürünleri tesislerinde fileto olarak işlenmekte ve ihracat yapılmaktadır. Dolayısıyla çipura, levrek ve alabalıkların işlenmesi sırasında ortaya önemli miktarda omurga kemiği, iç organlar, deri ve baş bölgesi gibi yan ürünler ortaya çıkmaktadır. Bu yan ürünler günümüzde ya yem üretim tesislerine gönderilerek düşük kalitede balık unu üretilmektedir ya da atılarak çevre kirliliğine neden olmaktadır.

Balık protein hidrolizatları, proteince zengin balık ham materyalinin enzimatik hidrolizinden oluşan ürünlerdir. Balık proteinlerinin aminoasitlere parçalanması için enzimlerin kullanılmasıyla (proteoliz) üretilmektedirler. Oluşan ürün gıda ürünlerinde bir katkı maddesi olarak kullanıldığında çok işlevseldir. Belli enzimler ve/veya mikrobiyal başlangıç kültürler proteolizi hızlandırmak için eklenmektedirler. Zaman, sıcaklık ve pH gibi parçalanma parametreleri istenilen özelliklerdeki balık protein hidrolizatını üretmek için sıkı biçimde denetlenmektedir. Balık protein hidrolizatları özellikleri nedeniyle araştırmacılar için önemlidir ama maalesef acı tadı, balıksı koku ve lezzeti ile insanların tükettiği ürünlerde kullanımı için uygun bulunmayabilmektedir. Bu nedenle üretim metotları önemlidir. Birçok araştırmacı üründe değiştirilmesi önerilen bu unsurları kaldırmak ve değiştirmek için çalışmalarına devam etmektedir. Son 10 yıl içerisinde bu konuda önemli metotlar yayınlanmış olup, protein konsantreleri insan gıdasında katkı ve zenginleştirme maddesi olarak kullanılmaktadır (Kristinsson ve Rasco, 2000; Çaklı, 2008; Aylangan ve Öztan, 2008).

Protein hidrolizatları, lezzet geliştirici, fonksiyonel ingrediyenler veya düşük kaliteli gıdalara beslenme katkısı olarak kullanılabilirler. Protein ilavesi olarak, enerji içeceklerinde, yaşlılık ürünlerinde, sporcuların beslenmesinde ve kilo-kontrolü diyetlerinde kullanılabilirler. Klinik olarak ise, fenilketonüri (PKL), hipoallerjenik bebek formüllerinde, akut ve kronik karaciğer hastalıklarında, bağırsak sendromunda, ateşli bağırsak hastalığında, pankreasla ilgili hastalıklarda ve kolon ve rektumun iç çeperinde ülserlere ve tahrişe neden olan tehlikeli bir hastalıkta kullanılabilirler. Ayrıca proteinler biyolojik olarak aktif peptitler üreterek hidrolize olabilmektedir. Biyolojik aktif peptitler, antioksidatif aktivite gösterebilmektedir. Hidrolizatın özellikleri doğrudan gıda bileşeni olarak kullanımını ve fonksiyonel özelliklerini etkilemektedir. Bu bağlamda, protein hidrolizatının fonksiyonel ve antioksidatif özelliklerini belirlemek üzere protein çözünürlüğü, emülsiyon özellikleri, köpürme özellikleri, renk özellikleri, su tutma kapasitesi (WHC), (DPPH (1,1-diphenyl-2-pic-ryhidrayl) serbest radikali giderme kapasitesi, antioksidatif aktivite tespiti ve metal şelatlama analizleri yapılmaktadır (Klompong vd., 2007; Nguyen vd., 2011).

Bu araştırma kapsamında Türkiye'de kültüre edilen çipura

(*Sparus aurata*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve alabalıkların (*Oncorhynchus mykiss*) fileto edilmesi sonucunda ortaya çıkan atıklarından olan baş bölgesinden protein hidrolizat elde edilerek, bazı fonksiyonel ve antioksidan özellikler tespit edilmiş ve dondurarak depolama sırasında bu özelliklerin kararlılığı tespit edilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

Araştırma için kullanılan ham materyal, Ege bölgesinde yetiştiriciliği yapılmakta olan alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), levrek (*Dicentrarchus labrax*) ve çipura (*Sparus aurata*) balıklarından elde edilmiştir. Hali hazırda derili ve derisiz fileto işlemi yapan bir ticari işletmede fileto artığı olan başlar ilgili tesis tarafından çıkarılmış ve kilitleli plastik poşetler içinde 250 g olacak şekilde gruplara ayrılarak işletmede dondurulmuş ve frigorifik taşıt ile E. Ü. Su Ürünleri İşleme Laboratuvarına donuk halde nakledilmiştir.

Donmuş halde getirilen balık başları bir gece soğuk depoda (+4°C) çözdürmeye bırakılmış ve çözdürülen örnekler parçalayıcı (Kitchen Aid marka; 2kg/min; model KPM5, St. Joseph, Michigan, USA) kullanılarak üretim için hazırlanmıştır.

## Üretim metodu

### Balık başlarından hidrolizat üretimi

Başlar (500g) 500 ml saf su eklenerek homojenizatöre aktarılmış ve ilk parçalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Akabinde 90°C'de 20 dakika süresince pişirilerek endojen enzimlerin inaktif hale geçmesi sağlanmıştır. Pişmiş olan başlar tekrar homojenizatöre alınarak 2 dakika boyunca parçalanmıştır. Örnekler daha sonra kullanılan enzim doğrultusunda optimal pH ve sıcaklığa getirilmiştir. Kullanılan enzim Alcalase<sup>®</sup>tr. pH 8.0 ve dengeleme için 4N NaOH kullanılmıştır, sıcaklık 50°C olarak sabitlenmiştir. Hidroliz işlemi için ham materyal miktarının % 0.1'i olarak hesaplanmış ve 50°C'da stabil olan karışıma eklenmiştir. Bekleme süresi 3 saattir. Bekleme süresi sonunda enzim aktivitesinin durdurulması için elde edilen karışıma 20 dakika süresince 80°C üzerinde ısı uygulanmıştır. Enzim aktivasyonunun durdurulmasını takiben karışım süzülerek sıvı kısım ve posa ayrılmıştır. Ayrım işleminden sonra örnekler 5000g de 20 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj işlemi sonunda 2 katman oluşmuştur. Bu noktada oluşan tortu faz (suda çözülmeyen faz) ve sıvı faz (suda çözülebilen faz) birbirinden ayrılmıştır. Sıvı faz +4°C'deki soğuk depoda hızlı bir şekilde soğutulmuş ve bu işlemi takiben liyofilizatör kullanılarak kurutulmuştur. Kurutma işlemi -20°C'de 24 saat süresince uygulanmıştır. Kurutulmuş olan örnekler öğütücü kullanılarak toz hale getirilmiş ve -18°C de derin dondurucuda analiz yapılmaya kadar muhafazaya alınmıştır (Bougatef vd., 2010).

### Balık protein hidrolizatların depolanması

Hidrolizatların depolamadaki kararlılığını tespit amacıyla üretilen balık protein hidrolizatları -18°C' de polietilen ambalajlar içerisinde muhafaza alınmıştır. 6 aylık depolama periyodu sonunda tüm gruplarda fonksiyonel ve antioksidan

özellikleri gösteren analizler ile aminoasit dizilim analizleri tekrarlanmıştır.

### Analiz metotları

#### Hidroliz derecesinin ölçülmesi

Hidroliz derecesinin ölçülmesi için kullanılan metot [Benjakul ve Morrissey \(1997\)](#) metodunun bazı modifikasyonlar ile uygulanan metodudur. Analiz liyofilize edilmeden önce elde edilen protein hidrolizat sıvı fazlarında uygulanmıştır. 60 dakika hidroliz işlemi sonunda değerler tespit edilmiştir.

Metot;  $\alpha$ -aminoasit miktarının hidroliz işlemi sonundaki kaybının oranlanmasına dayanmaktadır; elde edilmiş olan sıvı fazdan 125  $\mu$ l alınır ve 2ml 0.2125 M sodyum fosfat tamponunda (pH:8.2) eklenir bu karışıma 1ml % 0.01 lik TNBS (2,4,6 –tirinitrobenzensulfonik asit) eklenir. Karıştırılır ve bu karışım 20 dakika boyunca karanlık ortamda 50°C' ye ayarlanmış su banyosu içinde inkübe edilir. Sürenin bitiminde reaksiyonun tamamlanıp durdurulması için 2ml 0.1 M sodyum sülfid eklenir. Karışımın ısısının düşmesi için bir miktar beklenir, bu süre sabit oda sıcaklığına düşene kadar (yaklaşık 20 dakika) olmalıdır. Bu işlemi takiben 420 nm de spektrofotometrik ölçümler yapılır.

Maksimum  $\alpha$ -amino asit miktarının tespiti için yapılması gereken hidroliz işlemi: Ham materyaldeki maksimum  $\alpha$ -amino asit miktarının elde edilmesi için yapılması gereken ayrı bir hidroliz yöntemidir (Beak ve Cadwallader,1995). Bu işlem için balık başlarının 1:1 oranda 6N HCl solusyonu içinde 105°C'lik etüvde 24 saat tutulması gerekmektedir. Bu işlem sonunda asit-hidrolizi yapılan örnekler Whatman No. 1 filtre kağıdından geçirilerek hidrolize olmayan kısım ayrılır. Elde edilen sıvı hidrolizat 6N NaOH ile nötrülenir. Bu işlemi takiben 420 nm'de spektrofotometrik ölçümleri yapılır. Bu maksimum değerde  $\alpha$ -amino asit olarak ifade edilen L –Lösin amino asitidir.

Hidroliz derecesi şu formül kullanılarak hesaplanmıştır;

$$HD (\%) = [(L_t - L_o) / (L_{max} - L_o)] \times 100$$

L<sub>t</sub>: zamana bağlı kaybolan  $\alpha$ -amino asit miktarı

L<sub>o</sub>: ham maddenin sahip olduğu  $\alpha$ -amino asit miktarı

L<sub>max</sub>: maximum  $\alpha$ -amino asit miktarı

#### Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi

##### Protein çözünürlüğü

Protein çözünürlüğünü tespit etmek için 10mg hidrolizat tozu 8 ml deionize suya eklenmiştir. Bu karışımın pH'ı 3, 5, 7 ve 9 a sabitlenmiştir. pH stabilitesi için kullanılan dengeleyiciler 1M HCl (Hidroklorik asit) ve 1M NaOH (Sodyum hidroksit) solusyonlarıdır. Stabil hale gelen ve pH'ları sabitlenmiş olan solusyonlar 30 dakika manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu işlemi takiben karışım hacimleri saf su kullanılarak 10 ml ye tamamlanmıştır. Daha sonra ultra santrifüj ile 5000g de 15 dakika santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Protein miktarını tespit etmek için kullanılan metot [Lowry vd. \(1951\)](#)'dir ve bovin serum albumin standart olarak kullanılmıştır.

Materyaldeki toplam protein miktarı 0.5 M NaOH'te örneğin çözülmesinden sonra tespit edilmiştir.

Protein Çözünürlüğü için kullanılan formül;

$$\text{Çözünürlük (\%)} = \text{sıvı kısmın protein miktarı} \times 100$$

Örneğin toplam protein miktarı

##### Emülsiyon özellikleri

Hidrolizatın emülsiyon özelliklerini belirlemek için emülsiyon aktivite indeksi (EAI) ve Emülsiyon Stabilite İndeksi (ESI) analizleri [Pearce ve Kinsella \(1978\)](#) metoduna küçük modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Hidrolizat solusyonuna (6ml) soya yağı (2ml) eklenerek 1 dakika ultra turrax kullanılarak yüksek devirde karıştırılmıştır. Oluşan karışımın orta bölümündeki sıvıdan 2 örnek (50 $\mu$ l) alınmıştır. İlk alınan örnek karıştırma işlemi bittiği anda (50 $\mu$ l) ikinci örnek ise karışımın 10 dakika bekletilmesi sonucunda (50 $\mu$ l) alınmıştır. Alınan örnekler %0,1 sodyum dodesil sülfat (SDS) solusyonu ile 100 kat seyreltilmiştir. Elde edilen karışım vortex ile 10 sn karıştırılmıştır. Bu işlemi takiben 500 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Perkin Elmer, US) absorbans değerleri ölçülmüştür.

$$EAI (m^2/g) = (2 \times 2.303 \times A \times DF) / I \Phi C$$

$$A = A_{500}$$

$$DF = \text{Seyreltme faktörü (100)}$$

$$I = \text{spektro kuvvetinin taban tek kenar ölçüsü (m)}$$

$$\Phi = \text{Kullanılan yağ miktarı}$$

$$C = \text{Hidroliz derecesi}$$

$$ESI (\text{dakika}) = A_0 \times \Delta t / \Delta A$$

$$\Delta A = A_0 - A_{10}$$

$$\Delta t = 10 \text{ dakika}$$

##### Köpürme özellikleri

Köpürme özellikleri altında elde edilen hidrolizatların köpürme miktarı (FE) ve köpürme stabilitesi (FS) [Shahidi vd. \(1995\)](#) metodunun modifiye edilmiş şekli kullanılarak tespit edilmiştir. Hidrolizat solusyonundan 20 ml alınarak 100 ml'lik mezüre aktarılmıştır. 1 dakika boyunca 13,400 rpm hızda ultra turrax kullanılarak oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Örnekler anlık (0 dakika) ve 60 dakika süre ile bekletilmiştir. Formül hacimsel değerlere göre şu şekildedir.

$$\text{Köpürme miktarı} = FE (\%) = (V_T / V_0) \times 100$$

$$\text{Köpürme stabilitesi} = FS (\%) = (V_t / V_0) \times 100$$

$$V_T = \text{İşlem sonrası toplam hacim}$$

$$V_0 = \text{Köpürme öncesi normal hacim (0. dakika)}$$

$$V_t = 60 \text{ dakika bekleme sonrası tespit edilen hacim}$$

### Renk özellikleri

Spektropen (Hach-Lange GmbH & Co., Dusseldorf, Germany) renk ölçüm cihazı kullanılarak [Schubring \(2002\)](#) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Renk ölçümü toz haldeki hidrolizat örnekleri üzerinden 10 paralel ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar CIE Lab sisteminde L\* parlaklığı (0'dan 100'e kadar derecelendirme siyahtan beyaza); a\*, (+) kırmızı veya (-) yeşil ve b\*, (+) sarı veya (-) mavi skalasında verilmiştir.

### Su tutma kapasitesi (WCH)

Elde edilen toz balık hidrolizatı örneklerinin balık kıymasına eklenmesi sonucunda kıymanın su tutma kapasitesindeki değişim üzerine uygulanan ve [Eide vd. \(1982\)](#) referansına dayanarak uygulanan metottur. Kullanılacak balık kıyası miktarının %2'si kadar balık protein hidrolizat tozu eklenmiştir. Bu karıştırma işleminden sonra balık karışımının tartımı alınarak kaydedilmiştir. Bunu takiben 300g düşük devirde 10 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve işlem sonunda kıyım tartılarak kaybedilen su miktarı üzerinden su tutma kaybı tespit edilmiştir.

### Antioksidatif özelliklerin belirlenmesi

#### Dpph serbest radikali giderme kapasitesi

DPPH (1,1-diphenyl-2-pic-ryhidrayl) serbest radikali giderme aktivitesi [Yen ve Wu \(1999\)](#) metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Liyofilize edilmiş olan toz örnekler (3 mg toz/ml hidrolizat için) 0.05M fosfat tamponunda (pH: 6.5) çözündürülmüştür. Çözülme sonrasında bu solusyondan 4 ml alınarak ve üzerine 1 ml DPPH solusyonu ( %95 methanolde hazırlanan ve konsantrasyonu 0.2mM olmalıdır) eklenmiştir. Bu solusyon güçlü bir şekilde çalkalınıp 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Beklenen süre sonunda 517 nm de spektrofotometre ile ölçüm yapılmıştır. Hesaplama için bu oranlarda 3 ölçüm yapılmıştır. Bu 3 ölçümün grupları şunlardır; 1. grup sadece DPPH içermeli (kontrol), 2. grup örnek ve DPPH içermeli ve 3. grup da ise (DPPH olmamalı) sadece örnek bulunmalıdır. Hesaplama formülü şu şekildedir.

DPPH serbest radikali giderme kapasitesi (%)=[A<sub>0</sub>-(A<sub>1</sub>-A<sub>s</sub>)]/A<sub>0</sub>×100.

A<sub>0</sub>= Sadece DPPH içeren kontrol grubunun absorbans değeridir.

A<sub>1</sub>= Örnek ve DPPH içeren grubun absorbans değeridir.

A<sub>s</sub> = Sadece örnek içeren grubun absorbans değeridir (DPPH içermeyen).

#### Antioksidatif aktivite tespiti

Elde edilen hidrolizatların antioksidatif aktivite tespiti için kullanılan referans metot [Chen vd. \(1995\)](#)'nin metodudur. Analiz metoduna göre (3 mg toz/ml hidrolizat için, 1mg/ml jel filtrasyonu için, 150 µg/ml HPLC-1 saflaştırma için, 100 µg/ml HPLC-2 saflaştırma için) hidrolizat tozu içinde 1ml de-iyonize su, 1ml 0.1 M Sodyum fosfat tamponu (pH:7.0) ve 1 ml etanol

(%95) içinde bulunan 50 mM linoleik asit olan solusyona eklenmiş 5 ml'lik tüpe eklenerek karıştırılmış ve çözündürülmüştür. Deney tüpleri oksidasyonu hızlandırmak için karanlık ve 60°C' a ayarlanmış etüvde tutulmuştur. Elde edilen bu reaksiyon karışımından 50µl alınıp içinde 2.35 ml %75 etanol, 50µl %30 ammonium thiocyanate ve 50µl 20mM ferrous chloride (%3.5 HCl içinde çözündürülmüş) karışıma eklenmiştir. Karışım 3 dakika boyunca tüp karıştırıcısı ile (vortex) karıştırılmış ve bu işlemi takiben 500nm de spektrofotometrik ölçüm alınmıştır. Bu andan itibaren her gün karanlıkta bekletilen tüplerden 50µl den alınıp karışıma eklenmiş ve ölçüm alınmıştır. Spektrofotometrik absorbans değeri 0.3 görülene kadar devam etmiştir. [Chen vd. \(1995\)](#)'ne göre bu değer görülene kadar geçen süre indüksiyon süresidir. Bağlı anti-oksitatif değer bu değer yakalanana kadar geçen gün sayısı ile ifade edilmiştir.

### Metal şelatlama

Fe<sup>2+</sup> şelatlama aktivitesi [Chung vd. \(2002\)](#)'nin uyguladığı metoda bağlı kalınarak yapılmıştır. Metoda göre 800 µl örnek hidrolizat 10 µl, 2mM FeCl<sub>2</sub> ve 20 µl, 5mM ferrozin içeren karışıma eklenerek ve vortex kullanılarak karıştırılmıştır. Ölçüm öncesi 10 dakika oda sıcaklığında tutularak reaksiyonun tamamlanması beklenmiştir. Takiben 562 nm'de spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Kontrol örneği için 800 µl saf su, 10 µl, 2mM FeCl<sub>2</sub> ve 20 µl, 5mM ferrozin karışımına eklenerek, 562 nm'de spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Analiz 3 paralel olarak yapılmıştır. Hesaplama formülü aşağıdaki gibidir.

Şelatlama Kabiliyeti (%)= [1-(Absorbans örnek/Absorbans kontrol)]x100.

### Aminoasit diziliminin tanımlanması

Elde edilen balık protein hidrolizatlarında aminoasit diziliminin tanımlanması protein analizi yapılarak (D .05.G105, işletme içi metot- HPLC UV) TÜBİTAK-MAM'dan hizmet alınarak yapılmıştır. Aminoasit tanımlanması, üretilen balık hidrolizatlarında, üretimden hemen sonra ve balık hidrolizatlarının -18°C'de 6 aylık depolama periyodu sonunda, amino asitlerde değişiminin olup olmadığını tespit edebilmek amacı ile tekrarlanmıştır.

### İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme için her bir gruptaki analizler 3 paralel olarak yapılmıştır. İstatistiksel analiz, SPSS for Windows 9.0 istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar, ortalama ± standart sapma (SD) olarak verilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için parametrik varsayımların gerçekleştirildiği verilerde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Bu test ile fark bulunan gruplarda farklılığın nereden kaynaklandığını bulmak için, Post-hoc Tukey HSD testi ve Duncan testi kullanılmıştır. Gruplar arası ve depolamaya bağlı parametrelerde değerlendirmeler ve parametreler arası ilişki P<0,05 olması anlamlı kabul edilmiştir.

**BULGULAR****Hidroliz derecesi (%)**

Üretilen protein hidrolizatlarındaki hidroliz derecesine ait bulgular [Tablo 1](#)'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Hidroliz derecesinde değişimler  
**Table 1.** Changes of the degree of hydrolysis

Hidroliz Süresi/ Tür	Çipura	Levrek	Alabalık
60 Dk	25,5102 <sup>a</sup>	28,40705 <sup>a</sup>	21,30584 <sup>b</sup>
90 Dk	30,5295 <sup>a</sup>	34,9528 <sup>b</sup>	26,48454 <sup>c</sup>
120 Dk	35,71429 <sup>a</sup>	39,19841 <sup>b</sup>	32,99656 <sup>c</sup>
180 Dk	36,34859 <sup>a</sup>	40,49062 <sup>b</sup>	33,17869 <sup>c</sup>

\*Aynı sıradaki farklı harfler gruplar arası farklılıkları göstermektedir (p < 0.05)

Hidroliz derecesi (H.D.) 60 dk.'dan başlamak üzere 3 türde de ayrı ayrı 90, 120, 180. dk'larda alınan örneklerle tespit edilmiştir. Buna göre 60. dk' daki balık protein hidrolizatındaki en yüksek H.D. 'si levrekten elde edilen balık protein hidrolizatında tespit edilmiştir. Hidroliz işleminin sonlandırıldığı 180. dk'da ise en yüksek H.D. yine levrekten elde edilen balık protein hidrolizatında tespit edilmiştir. Hidroliz derecelerinin tespit edildiği tüm dakikalarda türler arası anlamlı istatistiksel fark bulunmuştur (p<0.05). Tüm gruplarda hidroliz derecelerinin, hidroliz süresi artışına bağlı olarak arttığı gözlemlenmiştir.

**Fonksiyonel özelliklerin belirlenmesi****Protein çözünürlüğü (%)**

Üretilen protein hidrolizatlarındaki protein çözünürlüğüne ait bulgular [Tablo 2](#)'de verilmiştir.

**Tablo 2.** Protein çözünürlüğünde değişimler  
**Table 2.** Changes of protein solubility

(%)	Çipura	Levrek	Alabalık
0.Gün	90,82±5,21 <sup>a</sup>	94,07±2,27 <sup>a</sup>	96,71±4,2 <sup>a</sup>
6.Ay	70,21±3,65 <sup>a</sup>	75,83±2,49 <sup>a</sup>	83,14±2,3 <sup>a</sup>

\*Aynı sıradaki farklı harfler gruplar arası farklılıkları göstermektedir (p < 0.05)

Yapılan protein çözünürlüğü tespiti analizinde 0.günde en yüksek değer alabalıktan elde edilen protein hidrolizatında tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalarda protein çözünürlüğünün özellikle dondurarak depolamada azalma gösterdiği bildirilmektedir. 6 aylık depolama periyodu sonunda yapılan analizlerde 0.günde yapılan analizlere göre tüm grupların protein çözünürlüğü değerlerinin azaldığı gözlemlenmiştir. 6 aylık depolama periyodu sonunda yapılan protein çözünürlüğü analizinde ise en yüksek değer yine alabalıktan elde edilen protein hidrolizatında tespit edilmiştir. Ancak gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunamamıştır.

**Emülsiyon özellikleri**

Üretilen protein hidrolizatlarındaki Emülsiyon Aktivite İndeksi ve Emülsiyon Stabilite İndeksi'ne ait bulgular [Tablo 3](#) ve [4](#)'te verilmiştir.

**Emülsiyon aktivite indeksi (EAI) (m<sup>2</sup>/g)**

**Tablo 3.** Emülsiyon Aktivite İndeksindeki değişimler (EAI) (m<sup>2</sup>/g)  
**Table 3.** Changes of Emulsion Activity Index (EAI) (m<sup>2</sup>/g)

	Tür/Enzim kons.(%)	0.1	0.5	1.0	3.0
0.Gün	Çipura	0,77	4,31	6,09	20,99
	Levrek	0,09	-1,48	-4,83	-12,91
	Alabalık	0,55	2,35	2,85	-0,91
6.Ay	Çipura	1,05	4,70	8,83	19,08
	Levrek	0,67	2,29	3,85	9,06
	Alabalık	0,48	2,29	3,03	9,65

0.günde ve 6 aylık depolama sonunda her 3 türden de üretilen protein hidrolizatlarında enzim konsantrasyonuna bağlı olarak EAI ve ESI tespit edilmiştir. 0.günde yapılan analizde çipuradan elde edilen protein hidrolizatında enzim konsantrasyonu artışına bağlı olarak EAI'nin arttığı tespit edilmiştir. Levrekten elde edilen protein hidrolizatında enzim konsantrasyonu artışına bağlı olarak EAI'de doğrusal bir azalma tespit edilirken, alabalıktan elde edilen protein hidrolizatındaki değişimler düzensizdir. 6 aylık depolama sonunda enzim konsantrasyonu artışına bağlı olarak her 3 türden elde edilen balık protein hidrolizatlarının EAI değerlerinde artış tespit edilmiştir. 0.günde yapılan ESI analizinde enzim konsantrasyonu artışına bağlı olarak çipuradan ve levrekten elde edilen protein hidrolizatında doğrusal olmayan bir azalma, alabalıktan elde edilen protein hidrolizatında ise doğrusal olmayan bir artış tespit edilmiştir. 6 aylık depolama sonunda yapılan analizde enzim konsantrasyonu artışına bağlı olarak çipura ve levrekte doğrusal olmayan bir azalma, alabalıkta ise artış tespit edilmiştir.

**Emülsiyon stabilite indeksi (ESI) (dk)**

**Tablo 4.** Emülsiyon Stabilite İndeksindeki değişimler (ESI)  
**Table 4.** Changes of Emulsion Stability Index (ESI)

	Tür/Enzim kons.(%)	0.1	0.5	1.0	3.0
0.Gün	Çipura	-1,84	3,57	-1,54	-4,76
	Levrek	0,02	0,74	-11,23	-9,22
	Alabalık	-6,92	0,43	0,046	-0,63
6.Ay	Çipura	4,00	-4,14	1,13	0,50
	Levrek	11,90	2,69	1,00	0,36
	Alabalık	0,32	0,15	0,55	5,03

### Köpürme özellikleri

Üretilen protein hidrolizatlarındaki Köpürme Miktarı (%) ve Köpürme Stabilitesi (%)'ne ait bulgular Tablo 5 ve 6'da verilmiştir.

**Tablo 5.** Köpürme miktarındaki değişimler  
**Table 5.** Changes of foaming amounts

(%)	Çipura	Levrek	Alabalık
0. Gün	17,33	4,00	2,33
6. Ay	57,67	50	5,67

Tüm grupların köpürme miktarlarına bakıldığında 0.günde tespit edilen en yüksek köpürme miktarı çipuradan elde edilen protein hidrolizatındadır. 6 aylık depolamanın sonunda yapılan analizde ise en yüksek köpürme miktarı yine çipuradan elde edilen protein hidrolizatında tespit edilmiştir.

**Tablo 6.** Köpürme stabilitesindeki değişimler  
**Table 6.** Changes of foaming stability

(%)	Tür/Süre (dk)	5	10	40	60
0.Gün	Çipura	2,33	2	0,33	0
	Levrek	17,33	16,66	13,66	11,33
	Alabalık	4	3,66	3	2,33
6.Ay	Çipura	57,66	45,33	34,66	31,66
	Levrek	50	62,66	27,66	20
	Alabalık	5,66	5,66	5,33	5,33

Köpürme özelliği protein hidrolizatının fiziko-kimyasal özelliklerinden biridir. Proteinlerde yüksek köpürme kapasitesi olması proteinin daha elastiki olmasını sağlar ve yüzey gerilimini azaltma kapasitesini artırır. Yüksek molekül ağırlığına sahip peptidler protein hidrolizatının köpürme stabilitesi ile pozitif olarak ilişkilidir (Klompong vd., 2007). Süreye bağlı olarak tespit edilen köpürme stabilitesi 0.günde ve 6 aylık depolamanın sonunda tespit edilmiştir. Buna göre 0. günde yapılan analizde en yüksek köpürme stabilitesi levrekten elde edilen protein hidrolizatında tespit edilmiştir. Ancak tüm gruplarda köpürme stabilitesinin zamana bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

### Renk ölçümü

Üretilen protein hidrolizatlarındaki renk ölçümüne ait bulgular Tablo 7'de verilmiştir.

**Tablo 7.** Renk özelliklerindeki değişimler  
**Table 7.** Changes of colour properties

		L*	a*	b*
0.Gün	Çipura	89,51±2,39 <sup>a</sup>	-1,64±0,13 <sup>a</sup>	19,25±0,59 <sup>a</sup>
	Levrek	82,78±2,03 <sup>a</sup>	-0,71±0,26 <sup>a</sup>	27,19±1,71 <sup>a</sup>
	Alabalık	85±1,53 <sup>a</sup>	-1,37±0,08 <sup>a</sup>	20,21±0,69 <sup>a</sup>
6. Ay	Çipura	82,07±2,63 <sup>a</sup>	-0,6±0,21 <sup>a</sup>	20,11±1,85 <sup>a</sup>
	Levrek	79,81±5,15 <sup>a</sup>	-0,5±0,3 <sup>a</sup>	28,18±2,26 <sup>a</sup>
	Alabalık	75,68±5,06 <sup>a</sup>	-0,59±0,3 <sup>a</sup>	16,85±1,67 <sup>a</sup>

\*Aynı sıradaki farklı harfler gruplar arası farklılıkları göstermektedir (p < 0.05)

Her 3 grupta da L\*, a\* ve b\* değerleri ölçülmüştür. 0. Gündeki en yüksek parlaklık (L\*) değeri çipuradan elde edilmiş olan balık protein hidrolizatında olup diğer gruplarla arasında istatistiksel bir fark tespit edilememiştir (p>0.05). 6 ay depolama sonunda yapılan ölçümde parlaklık değeri yine çipuradan elde edilmiş olan balık protein hidrolizatında en yüksek tespit edilmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir (p> 0.05). 6 aylık depolama süresi boyunca L\* parlaklık değeri her 3 türden elde edilen balık protein hidrolizatlarında da düşüş göstermiştir. Tüm gruplardaki a\* değerleri yeşile dönük (-) değerler olarak tespit edilmiştir. 0. günde en yüksek a\* değeri çipuradan elde edilmiş olan balık protein hidrolizatında tespit edilmiştir. 6. ayın sonunda tespit edilen en yüksek a\* değeri yine çipurada olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ( p> 0.05). b\* değeri tüm gruplarda sarıya yakın (+) değerler almıştır. En yüksek değerler 0. günde ve 6 aylık depolamanın sonunda levrekten elde edilmiş olan balık protein hidrolizatında tespit edilmiş olup gruplar arası istatistiksel fark tespit edilememiştir (p> 0.05).

### Su tutma kapasitesi (WHC) (g protein/mL su)

Üretilen protein hidrolizatlarında Su Tutma Kapasitesine ait bulgular Tablo 8'de verilmiştir.

**Tablo 8.** Su tutma kapasitesindeki değişimler  
**Table 8.** Changes of water binding capacity

Su tutma kapasitesi g protein/mL su	Çipura	Levrek	Alabalık
0.Gün	1,0±0,0 <sup>a</sup>	2,0±0,0 <sup>a</sup>	0,4±0,2 <sup>a</sup>
6.Ay	-3,0±0,0 <sup>a</sup>	-2,5±0,35 <sup>a</sup>	-2,0±0,0 <sup>a</sup>

\*Aynı sıradaki farklı harfler gruplar arası farklılıkları göstermektedir (p < 0.05)

Birçok çalışma göstermektedir ki balık protein hidrolizatları mükemmel bir su tutma kapasitesi gösterirler ve kıymalara eklendiğinde pişirme verimini arttırabilir. Su tutma kapasitesi hidroliz derecesi arttıkça artmaktadır (Wasswa vd., 2007). 0. günde ve 6 aylık depolama periyodu sonunda yapılan analizlerle tüm gruplarda su tutma kapasitesi tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar her bir ml suyu bağlayan 1 g protein olarak verilmiştir. 0. günde yapılan analize göre en yüksek değer levrekten elde edilmiş olan balık protein hidrolizatında tespit edilmiştir. 6 aylık depolama periyodu sonunda yapılan analizlerde ise tüm gruplarda su tutma kapasitesinin azaldığı tespit edilmiştir. En fazla azalma çipurada tespit edilmiştir. Buna paralel olarak tüm gruplarda su tutma kapasitesinin negatif değerler almıştır. Bununla birlikte depolamanın su tutma kapasitesi üzerine negatif bir etkisi olduğu söylenebilir.

### Antioksidatif özellikler

Üretilen protein hidrolizatlarında Antioksidatif Özelliklere ait bulgular Tablo 9, 10 ve 11'de verilmiştir.

### DPPH (serbest radikali giderme kapasitesi)

**Tablo 9.** Serbest radikali giderme kapasitesi deęişimleri  
**Table 9:** Changes of free radical scavenging capacity

(%)	Çipura	Levrek	Alabalık
0. Gün	12,85±0,34 <sup>a</sup>	71,3981±30,9 <sup>a</sup>	74,23247±9,07 <sup>a</sup>
6. Ay	-100,54±1,51 <sup>a</sup>	-109,87±8,32 <sup>a</sup>	13,89±15,42 <sup>a</sup>

\*Aynı sıradaki farklı harfler gruplar arası farklılıkları göstermektedir (p &lt; 0.05)

Çalışmada 0. günde ve 6 aylık depolama sonunda yapılan analizlerde en yüksek serbest radikali giderme kapasitesi (DPPH) değerleri alabalıktan elde edilen protein hidrolizatında tespit edilmiş olup 0. günde ve 6 aylık depolama sonunda gruplar arasında istatistiksel fark tespit edilememiştir (p < 0.05). Tüm gruplarda DPPH değerlerinde 6 aylık depolamanın sonunda tüm gruplarda DPPH'ın azaldığı, düşüşlerle birlikte depolama sonunda en yüksek DPPH alabalıkta tespit edilmiştir.

### Antioksidatif aktivite

**Tablo 10.** Antioksidatif aktivitedeki değişimler  
**Table 10.** Changes of antioxidative activity

Absorbans (nm)	Çipura	Levrek	Alabalık	BHA	Kontrol
0.Gün	0,19±0,08 <sup>a</sup>	0,1±0,06 <sup>a</sup>	0,14±0,03 <sup>a</sup>	0,14±0,02 <sup>a</sup>	0,16±0,01 <sup>a</sup>
6.Ay	2,12±0,88 <sup>a</sup>	2,59±0,34 <sup>a</sup>	2,7±0,13 <sup>a</sup>	0,15±0,01 <sup>a</sup>	2,85±0,02 <sup>a</sup>

\*Aynı sıradaki farklı harfler gruplar arası farklılıkları göstermektedir (p &lt; 0.05)

Her 3 türden de elde edilen balık protein hidrolizatlarının antioksidatif aktiviteleri tespit edilmiş ve sentetik antioksidan olan bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) ve kontrol grubuna karşı aktiviteleri değerlendirilmiştir. Buna göre 0.günde yapılan

analizde en düşük antioksidatif aktivite sırasıyla levrekten elde edilen protein hidrolizatında ve BHA'da tespit edilmiştir, ancak gruplar arası istatistiksel fark tespit edilememiştir. 6 ay depolama sonunda yapılan analize göre BHA en düşük değere sahip olmakla birlikte deneme gruplarında en düşük değer ise çipuradan elde edilen balık protein hidrolizatında tespit edilmiştir. Depolama süresi sonunda kontrol grubuyla birlikte her 3 türdeki antioksidatif aktivite sonlanmıştır.

### Metal şelatlama Fe<sup>2+</sup> (%)

**Tablo 11.** Metal şelatlamadaki değişimler  
**Table 11.** Changes of metal chelating

(%)	Çipura	Levrek	Alabalık
0.Gün	0,630043±6,59 <sup>a</sup>	73,30442±24,59 <sup>a</sup>	15,59835±36,95 <sup>a</sup>
6.Ay	-83,0889±5,53 <sup>a</sup>	-58,3615±17,25 <sup>a</sup>	-41,4771±1,62 <sup>a</sup>

\*Aynı sıradaki farklı harfler gruplar arası farklılıkları göstermektedir (p &lt; 0.05)

0. günde yapılan metal şelatlama analizinde en yüksek değer levrekten elde edilen protein hidrolizatında tespit edilmiştir. 6 aylık depolama sonunda yapılan analizlerde ise en yüksek değer alabalıktan elde edilen protein hidrolizatında tespit edilmiştir. 6. ay sonunda yapılan analizlerde metal şelatlama özelliğinin aşırı bir düşüş gösterdiği tespit edilmiş olup tüm gruplarda negatif değerler bulunmuştur. 0. ve 6. ay sonunda yapılan analizlerde gruplar arası istatistiksel fark tespit edilememiştir.

### Aminoasit diziliminin tanımlanması

Üretilen protein hidrolizatlarında protein miktarı ve aminoasit diziliminin tanımlanması **Tablo 12**'de verilmiştir.

**Tablo 12.** Balık protein hidrolizatlarının protein miktarı ve aminoasit kompozisyonları  
**Table 12.** Protein content and amino acid compositions of fish protein hydrolysates

	Alabalık		Çipura		Levrek	
	0.Gün	6.Ay	0.Gün	6.Ay	0.Gün	6.Ay
% Protein	78,03	70,56	80,87	74,63	83,84	81,00
<b>Aminoasit kompozisyonu (mg/100 g protein hidrolizatı)</b>						
L-Alanin	5854	4107,5	5633	5804	8903	7653,5
L-Aspartik asit	8629	5083	10216,5	3454	7400	2816,5
L-Metionin	2523,5	2321	2432,5	2494	2680	2776,5
L-Glutamik asit	8729	9231	10218,5	5847,5	7495,5	5580
L-Fenilalanin	3303,5	2796	3207	3349	3766,5	4188
L-Lizin	5071,5	8018,5	5454,5	5329	3694,5	5762
L-Histidin	3442	1810	3378,5	2052	2348	2170
L-Tirozin	2275	1727	2279,5	2314,5	2651,5	2633
Glisin	9693,5	8023,5	9087,5	10404,5	12415,5	13303
L-Valin	3766,5	3007,5	3792,5	3170	4097	3588,5
L-Lösin	5646	5020,5	5525,5	5743	6205	6545
L-İsolösin	3418	2865,5	3291,5	3282,5	3787	3939
L-Treonin	2949	2370	2778,5	3025,5	3296	3077
L-Serin	4272	3751,5	4226	3770	4065	4320,5
L-Prolin	5648,5	5234,5	5547,5	6278,5	6450,5	7287
L-Arjinin	1864	3235,5	2366	1466	1503	1895

Üretimden hemen sonra 0. günde levrek protein hidrolizatının protein içeriği çipura ve alabalık protein hidrolizatından daha yüksek tespit edilmiştir. Yine, 6 aylık depolama sonunda yapılan analizlerde levrek protein hidrolizatının protein içeriği çipura ve alabalık protein hidrolizatından daha yüksek tespit edilmiştir.

Alabalık, çipura ve levrek protein hidrolizatlarının aminoasit kompozisyonlarının glutamik asit, aspartik asit, glisin, lösin ve alanin hariç benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Esansiyel(EAA)/esansiyel olmayan aminoasit (NEAA) oranı çipura, levrek ve alabalık protein hidrolizatlarında sırasıyla 0,50, 0,52 ve 0,53 olarak tespit edilmiştir. Alabalık protein hidrolizatının 0. günde glisin, aspartik asit, glutamik asit, alanin, lösin ve prolince zengin olduğu gözlemlenmiştir. Gruplar arası inceleme yapıldığında histidin alabalık ve çipura protein hidrolizatında diğerlerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. 6 aylık depolama sonunda; gruplar arası karşılaştırma yapıldığında glutamik asit, lizin ve glisinin en yüksek değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Levrek protein hidrolizatı 0.günde glisin, alanin, glutamik asit, prolin ve lösince zengindir. 6 aylık depolama sonunda alanin, aspartik asit, glutamik asit, histidin ve vlin dışında bahsedilen aminoasitlerde artış gözlemlenmiştir.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Hidroliz süresince tüm yan ürünler kahverengimsi sıvılara dönüşmektedir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, hidroliz derecesi her bir metoda özgü olarak belirlenen hidrolize olma süreleri boyunca zamana bağlı olarak artış göstermekte ve bir süre sonra kararlı hale geçmektedir (Bougatef vd., 2010; Nguyen vd., 2011). Bu çalışmada da hidroliz süresinin başlangıcından sonlandırılmasına kadar geçen sürede hidroliz derecesi zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Başlangıçta hızlı bir şekilde ilerleyen hidroliz derecesi daha sonra azalan oranlarda artış göstermiş ve bir süre sonra kararlı duruma gelmiştir. Protein çözünürlüğü analizi proteinin depolama boyunca kalitesinin izlenmesine kullanılan parametrelerden biridir. Yüksek protein çözünürlüğü jel, köpük ve emülsiyon oluşumunda gereklidir (Muzaiifa vd., 2012). Yüksek protein çözünürlüğü formüle edilebilen gıda sistemlerinde etkileyici görünüm ve düzgün yapıya sahip ürün geliştirilmesinde potansiyel uygulamaları işaret eder (Thiansilakul vd., 2007a). Enzimatik hidroliz protein hidrolizatının polar ve iyonlaşabilen gruplarında olduğu gibi molekül büyüklüğü ve hidrofobikliği etkiler. Daha küçük peptitler içeren iyi hidrolize olmuş protein hidrolizatları daha yüksek hidroliz derecelerine sahiptir ve daha çözünürdür. Bu çalışmada da protein çözünürlüğü değerleri hidroliz derecesiyle levrekten elde edilen protein hidrolizatında paralellik göstermektedir. Ayrıca depolamaya bağlı olarak protein yapısında meydana gelen değişimler nedeniyle çözünürlük azalmıştır. Mikroskobik peptidler stabil bir köpük oluşturmak için gerekli olan güce sahip değildirler. Genel olarak proteinlerin aşırı hidroliz olması nedeniyle emülsiyon stabilitesinde daha az etki gösteren küçük peptidlerin oluşmasından dolayı EAI ve ESI azalır (Klompong vd., 2007; Wasswa vd., 2007). Bu nedenle düşük hidroliz derecelerinde

hidrolizatlar daha güçlü emülsiyonlaştırma özelliği gösterirler. Çipura ve levrekten elde edilen protein hidrolizatında yüksek miktarda hidroliz işlemi gerçekleştiğinden dolayı bu türlerin protein hidrolizatlarının ESI'inde azalma, alabalıktan elde edilen protein hidrolizatında ise daha düşük oranda hidroliz gerçekleşmesinden dolayı ESI'nin yükselme görülmektedir. EAI ise levrek ve alabalıktan elde edilen hidrolizatlarda azalma gösterirken, çipuradan elde edilen hidrolizatta artış göstermiştir. Diğer yandan EAI ve ESI enzimin spesifikliğinden de etkilenmektedir. EAI'nin protein konsantrasyonuna bağlı olduğu adsorpsiyon kinetiği ile açıklanır. Yapılan çalışmalar da göstermektedir ki hidroliz derecesinin artmasıyla köpürme stabilitesi azalmaktadır. 6 aylık depolamanın sonunda yapılan analizde en yüksek köpürme stabilitesi çipuradan elde edilen protein hidrolizatında tespit edilmiştir. Protein hidrolizatının köpürme stabilitesi karıştırmadan sonra 60 dk süresince izlenerek tespit edilir. Tüm gruplarda, alabalıkta daha az olmak üzere, 0 ile 60.dk arasında süre artışına bağlı olarak köpürme stabilitesinin azalma gösterdiği tespit edilmiştir. Thiansilakul vd., (2007a) göstermektedir ki ilk karıştırmadan sonra 60.dk'ya kadar geçen sürede köpürme stabilitesi azalmıştır. Renk gıda ürünlerindeki genel kabul beğeniyi etkileyen önemli parametrelerden biridir (Wasswa vd., 2007). Buna paralel olarak bu çalışmada elde edilen balık protein hidrolizatlarının renkleri birbirine yakın olmakla birlikte sarının farklı tonlarını sergilemektedir ve elde edilen tüm balık protein hidrolizatlarının renkleri diğer bitkisel ve hayvansal protein tozu kaynaklarına benzer şekilde ve kabul edilebilirdir. Buna göre b değeriyle ifade edilen sarılık değerlerinin tüm gruplarda (+) olduğu ve en yüksek sarı rengin levrekten elde edilmiş olan balık protein hidrolizatında olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra elde edilen sonuçlara bakılarak düşüğe olsa balık protein hidrolizatlarının yeşil rengi barındırdığı ve depolama sonunda azalma gösterdiği söylenebilir. Wasswa vd. (2007) hidroliz arttıkça protein hidrolizatının su tutma kapasitesinin arttığını bildirmişlerdir. Su absorpsiyonunda benzer bir eğilimin peynir altı suyu protein hidrolizatında gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da en yüksek su tutma kapasitesi hidroliz derecesinin en yüksek olduğu levrek protein hidrolizatında tespit edilmiştir.

Düşük protein konsantrasyonlarında yağ-su ara yüzündeki protein adsorpsiyonu yayılımı denetimlidir. Yüksek protein konsantrasyonlarında aktivasyon enerji bariyeri proteinlerin sulu fazda birikimlerine önderlik eden difüzyona bağlı gerçekleşen protein göçüne izin vermez (Thiansilakul vd., 2007a). Lipit oksidasyonu gıdaların lezzetini, rengini ve besinsel kalitesini etkilemektedir. Bu nedenle doğal ve etkili antioksidanlar gıda endüstrisinde önemli bir role sahiptir. Bazı balık protein hidrolizatlarının da antioksidan etki gösterdiği bildirilmektedir (Thiansilakul vd., 2007a). Antioksidatif aktivitenin linoleik oksidasyon sisteminde tespiti de antioksidatif özelliklerin tespitinde kullanılan yöntemlerdendir. Doymamış yağ asidi linoleik asit lipid oksidasyonunda ve emülsiyon sistemlerinin antioksidasyon ilişkili tespitinde sıklıkla kullanılan model bir bileşiktir (Yen vd., 2007). Linoleik asit oksidasyonunun çipura, levrek ve alabalık hidrolizatları



tarafından engellenmesi izlenmiştir. En yüksek antioksidatif aktivite levrek balığından elde edilen hidrolizatta tespit edilmiştir. Antioksidatif peptitler yağ-su arayüzüne yerleşebilir ve antioksidan olarak fonksiyon sergileyebilir. DPPH antioksidatif özelliğın tespitinde kullanılan yöntemlerden birisidir. DPPH stabil bir serbest radikaldır ve antioksidan gibi antioksidana benzeyen proton veren bir substratla karşılaştığında, radikaller süpürür ve absorban düşer. Absorbansın düşüşü radikal giderme aktivitesinin bir ölçümü olarak alınır (Bougatef vd., 2010). Buna göre alabalıktan elde edilen hidrolizat içindeki bazı peptitlerin güçlü radikal süpürücü oldukları söylenebilir. Thiansilakul vd., (2007a)'nin bildirdiğine göre 25°C ve 4°C'de depolama süresince ilk haftadan sonra DPPH'nin bir miktar azalmıştır. Metal şelatlama aktivitesi artan hidroliz derecelerine paralel olarak artmaktadır. Hidrolizatlardaki peptitler lipit oksidasyonunun azalmasını sağlayan prooksidanları şelatlayabilir. Demir, bakır, kobalt gibi gıdalarda bulunan geçiş metalleri hem otooksidasyon oranını hemde hidroperoksitlerin uçucu bileşiklere bozulmasını etkiler. Bu nedenle geçiş metal iyonlarının antioksidanlar yada antioksidatif peptitler tarafından şelatlanması oksidasyon reaksiyonunu geciktirecektir (Klompong vd., 2007). Buna göre en yüksek metal şelatlama aktivitesinin levrekten elde edilen hidrolizatta olduğu tespit edilmiştir. Thiansilakul vd. (2007a) balık protein hidrolizatlarının depolanmasındaki ilk iki haftalık sürede metal şelatlamada değişiklik gözlenmezken 2 haftadan sonra azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun depolama süresinin artmasıyla birlikte antioksidatif bileşiklerin tahrip olmasına bağlı olabileceğini bildirmektedirler. Bu bağlamda, 6 aylık depolama sonunda tüm gruplarda hidrolizatların metal şelatlama aktivitesi düşmüştür. Tanuja vd., (2012)'ye benzer şekilde, glutamik asit, aspartik asit, glisin, lösin, alanin ve prolin elde edilen balık protein hidrolizatlari aminoasit kompozisyonunun büyük bir oranını oluşturmaktadır. Balık protein hidrolizatlarında hafif acı tat oluşumu mevcuttur. Buna göre her 3 protein hidrolizatında da prolin miktarı yüksektir. Prolin aminoasitinin protein hidrolizatlarında acılıktan sorumlu olabileceği bildirilmiştir (Thiansilakul vd., 2007b; Tanuja vd.,

2012). Acılığa katkı yapan temel tripeptidlerin analizinde, tripeptitlerin ikincil ve C-terminal rezidü olarak asparjin ve lizin, N-terminal rezidü olarak lösin ve glisin içerdiği bulunmuştur (Tanuja vd., 2012). Buna ilave olarak acı tadın bu çalışmada elde edilen hidrolizatlarda da bulunan lösin, izolösin, valin ve fenilalanin gibi hidrofobik peptidlerin ortaya çıkmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Balık ve kabuklu deniz ürünlerinin yüksek esansiyel (EAA) / esansiyel olmayan aminoasit (NEAA) oranına sahip olduğu bildirilmiştir (Thiansilakul vd., 2007b). Ayrıca, FAO/WHO'ya göre yetişkinler için EAA/NEAA oranı 0,6'dan düşük olmalıdır (Deraz, 2015). Sonuçlara göre her 3 türden elde edilen protein hidrolizatlarının 0,5 civarında EAA/NEAA oranlarına sahip olduğu bu bağlamda nispeten zayıf bir aminoasit kararlılığına sahip olsa da zayıf dengeli protein diyetlerine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler ışığında levrek başlarından elde edilen protein hidrolizatının en yüksek fonksiyonel ve antioksidatif özellikleri sergilediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda levrek başlarından elde edilen protein hidrolizatının gıda sistemlerinde doğal katkı maddesi olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Ancak protein hidrolizatında tespit edilen acı (bitter) tadın giderilmesi ve dondurularak depolamanın dışında, depolama süresicaklıklarının çoğaltılarak bu depolama sürelerince ki fonksiyonel ve antioksidan özelliklerin değerlendirilmesi amacıyla ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir. Bu kaynak ve yöntemin ülkemiz su ürünleri yetiştiriciliği işleme yan ürünlerinin değerlendirilebilmesi için iyi bir seçenek olacağı düşünülmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma sonuçları TÜBİTAK 1120925 No'lu proje tarafından desteklenmiştir. Ayrıca bu proje sonuçları 43. WEFTA Meeting, 9-11 October Tromso, Norway ve 44. WEFTA Meeting, 9-11 June Bilbao, Spain'de sözlü ve poster sunumlar olarak sunulmuştur.

## KAYNAKÇA

- Aylangan A. & Öztan A. (2008). Hayvansal gıda sanayisi yan ürünleri kullanılarak protein hidrolizatları üretimi. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs 2008, Erzurum.
- Beak H.H. & Cadwallader K.R. (1995) Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products, *Journal of Food Science* 60 (5): 929-935. doi: 10.1111/j.1365-2621.1995.tb06264.x
- Benjakul S. & Morrissey, M.T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(9) : 3423-3430. doi: 10.1021/jf970294g
- Bougatef A., Nedjar-Arroume N., Manni L., Ravallec R., Barkia A. Guillochon D. & Nasri M. (2010) Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins, *Food Chemistry*, 118(3): 559-565. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.05.021
- Çaklı, Ş., (2008). Su Ürünleri İşleme Teknolojisi 2. Ege Üniversitesi Yayınları, Su Ürünleri Fakültesi Yayın No: 77.
- Chen H.M. Muramoto K. & Yamaguchi F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (3), :574-578. doi: 10.1021/jf00051a004
- Chung Y.C. Chang C.T. Chao W.W., Lin C.F. & Chou, S.T (2002). Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2454-2458. doi: 10.1021/jf011369q
- Deraz S., (2015). Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Bolti fish (*Tilapia nilotica*): chemical and nutritional variations as affected by processing pHs and time of hydrolysis, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 24(6): 614-631. doi: 10.1080/10498850.2013.797534
- Eide O, Borresen T. & Strom T. (1982). Minced fish production from capelin (*Mallotus villosus*). A new method of gutting, skinning and removal of fat from small fatty fish species. *Journal of Food Science* 47(2): 347-349. doi: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb10078.x
- Klompong V., Benjakul S., Kantachote D. & Shahidi S. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe

- trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry* 102: 1317–1327. doi: [10.1016/j.foodchem.2006.07.016](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016)
- Kristinsson H.G. & Rasco B.A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1): 43–81. doi: [10.1080/10408690091189266](https://doi.org/10.1080/10408690091189266)
- Lowry O.H. Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265–275.
- Nguyen H.T., Sylla B.S.K., Randriamahatody Z., Donnay-Moreno C., Moreau J., Tran T.L. & Berge P.J. (2011). Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) By-Products Using Protamex Protease. *Food Technol. Biotechnol.*, 49: 48–55.
- Muzaifa M., Safriani N. & Zakaria F. (2012). Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. *International Journal of the Bioflux Society*, 5(1): 36-39.
- Pearce K.N. & Kinsella J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26(3): 716-723. doi: [10.1021/jf60217a041](https://doi.org/10.1021/jf60217a041)
- Schubring, R. (2002). Influence of freezing/thawing and frozen storage on the texture and colour of brown shrimp (*Crangon crangon*). *Archiv für Lebensmittel hygiene*. 53: 25-48
- Shahidi F., Han X.-Q. & Synowiecki J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*), *Food Chemistry*, 53(3): 285–293. doi: [10.1016/0308-8146\(95\)93934-J](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)93934-J)
- Tanuja S., Viji P., Zynudheen A.A. & Joshy C.G. (2012). Composition, functional properties and antioxidative activity of hydrolysates prepared from the frame meat of Striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Egyptian Journal of Biology*, 2012, 14: 27-35. doi: [10.4314/ejb.v14i1.3](https://doi.org/10.4314/ejb.v14i1.3)
- Thiansilakul Y., Benjakul B. & Shahidi F. (2007a). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruads*). *Food Chemistry*. 103: 1385–1394. doi: [10.1016/j.foodchem.2006.10.055](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.055)
- Thiansilakul Y., Benjakul B. & Shahidi F. (2007b). Antioxidative Activity Of Protein Hydrolysate From Round Scad Muscle Using Alcalase. *Journal of Food Biochemistry* 31: 266–287. doi: [10.1111/j.1745-4514.2007.00111.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2007.00111.x)
- TÜİK, (2016). Su ürünleri İstatistikleri, Ankara
- Yen G.C. & Wu J.Y. (1999). Antioxidant and radical properties of extracts from *Ganoderma tsugae*, *Food Chemistry* 65(3): 375–379. doi: [10.1016/S0308-8146\(98\)00239-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00239-8)
- 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. doi: [10.1016/j.foodchem.2007.03.044](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.044)