



**ET TIRAŞLAMA ATIKLARINDAN ENZİMATİK
HİDROLİZ YÖNTEMİ İLE FARKLI PROSES
KOŞULLARI ALTINDA ÜRETİLEN PROTEİN
HİDROLİZATLARININ ÇEŞİTLİ FONKSİYONEL
ÖZELLİKLERİ VE GIDA TOKSİKANTLARI
AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Elif EKİZ

**Danışman: Prof. Dr. Fatih ÖZ
Doktora Tezi
Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı
2024
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

**ET TIRAŞLAMA ATIKLARINDAN ENZİMATİK HİDROLİZ YÖNTEMİ İLE
FARKLI PROSES KOŞULLARI ALTINDA ÜRETİLEN PROTEİN
HİDROLİZATLARININ ÇEŞİTLİ FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ VE GIDA
TOKSİKANTLARI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Evaluation of Protein Hydrolysates Produced by Enzymatic Hydrolysis of Meat Trimming
Wastes Under Different Process Conditions in Terms of Various Functional Properties and
Food Toxicants)

DOKTORA TEZİ

Elif EKİZ

Danışman: Prof. Dr. Fatih ÖZ

Erzurum
Eylül, 2024

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

ET TIRAŞLAMA ATIKLARINDAN ENZİMATİK HİDROLİZ YÖNTEMİ İLE FARKLI
PROSES KOŞULLARI ALTINDA ÜRETİLEN PROTEİN HİDROLİZATLARININ
ÇEŞİTLİ FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ VE GIDA TOKSİKANTLARI AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Prof. Dr. Fatih Öz danışmanlığında, Elif EKİZ tarafından hazırlanan bu çalışma, 10/10/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Gıda Mühendisliği Bilim Dalı'nda doktora tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (5./5.)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Sadettin TURHAN <i>Ondokuz Mayıs Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Fatih ÖZ <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Prof. Dr. Ahmet AKKÖSE <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN <i>İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Doç. Dr. Bilal NİŞANCI <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Enstitü Yönetim Kurulunun
.../.../.... tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Bu çalışma TÜBİTAK-1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı ve Atatürk Üniversitesi BAP-Diğer Kurumlarca Fonlanmış Araştırmaları Destekleme Projesi kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 122O450 ve FDA-2023-11977

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

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Doktora Tezi olarak *Prof. Dr. Fatih ÖZ* danışmanlığında sunulan “Et Tıraşlama Atıklarından Enzimatik Hidroliz Yöntemi ile Farklı Proses Koşulları Altında Üretilen Protein Hidrolizatlarının Çeşitli Fonksiyonel Özellikleri ve Gıda Toksikantları Açısından Değerlendirilmesi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	12	30
Kuramsal Temeller	3	30
Materyal ve Metot	10	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	7	20
Sonuçlar	14	20
Tezin Geneli	4	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Elif EKİZ	Prof. Dr. Fatih ÖZ
15.10.2024	15.10.2024
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ’de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince desteğini, hoşgörüsünü, bilgisini ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyduğum çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Fatih ÖZ'e içtenlikle teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Doktora tezimin projelendirilmesi, yürütülmesi ve sonuçlandırılması aşamalarında vermiş olduğu önemli desteklerinden dolayı Sayın Doç. Dr. Emel ÖZ'e sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmamın projelendirilmesi aşamasında desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sadettin TURHAN ve Doç. Dr. İbrahim GÜLSEREN'e teşekkür etmek isterim. Laboratuvar aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mehmet Murat KARAOĞLU'na emekleri için teşekkürü bir borç bilirim. Araştırmamızı fiilen gerçekleştirdiğimiz Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü, Ziraat Fakültesi Dekanlığı ve Gıda Mühendisliği Bölümü'nün tüm yönetici ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca araştırmanın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Eyad AOUDEH'e ve Zeynep ELBİR'e teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca sabırla yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli babam Mustafa EKİZ'e ve kıymetli annem Şerife EKİZ'e, abilerim Recep EKİZ ve Bilal EKİZ ile ikizim Erdi EKİZ'e ve desteğini ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen sevgili nişanlım Dr. Öğr. Üyesi Murat Emre TERZİOĞLU'na sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunar, doktora tezimi armağan etmekten gurur duyarım.

Projenin yürütülmesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK-1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (Proje No: 122O450) ve Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: FDA-2023-11977)'ne teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca, doktora eğitimim aşamasında, "100/2000 YÖK Doktora Bursu" kapsamında beni destekleyen Yükseköğretim Kurulu'na teşekkür ederim.

Elif EKİZ

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ET TIRAŞLAMA ATIKLARINDAN ENZİMATİK HİDROLİZ YÖNTEMİ İLE FARKLI PROSES KOŞULLARI ALTINDA ÜRETİLEN PROTEİN HİDROLİZATLARININ ÇEŞİTLİ FONKSİYONEL ÖZELLİKLERİ VE GIDA TOKSİKANTLARI AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Elif EKİZ

Danışman: Prof. Dr. Fatih ÖZ

Amaç: Araştırmada, et tıraşlama atıklarından enzimatik hidroliz yöntemi ile farklı proses koşulları altında üretilen protein hidrolizatlarının çeşitli fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi ve hidrolizatların üretimi esnasında oluşabilecek gıda toksikantları açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Atıklardan farklı pH değerlerinde protein ekstraksiyonu yapılmış, protein ekstraktları alkalaz enzimi ile hidrolize edilmiş ve hidrolizatlar ultrafiltrasyon işlemine tabi tutularak protein hidrolizat fraksiyonları elde edilmiştir. Örneklerde kurumadde, ham protein, NPN-S içerikleri, hidroliz derecesi, protein verimi, toplam sülfidril miktarı, SDS-PAGE profili, antioksidan aktivite, köpürme kapasitesi ve stabilitesi, emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi, yığın yoğunluğu, çözünürlük, su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi ve ACE inhibitör aktivitesi ile kloropropanol esterleri ve heterosiklik aromatik amin analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Farklı pH değerlerinde protein ekstraksiyonu işleminin, örneklerin ham protein ve NPN-S içeriği, hidroliz derecesi, protein verimi, köpürme kapasitesi ve stabilitesi, emülsiyon aktivitesi, çözünürlük, su tutma kapasitesi ve ACE inhibitör aktivite değerleri üzerine çok önemli ($p<0,01$), toplam sülfidril içeriği üzerine ise önemli ($p<0,05$) etki ettiği belirlenmiştir. Örneklerin hiçbirinde 3-MCPD bileşiği belirlenemezken, 2-MCPD bileşiği ise sadece fraksiyonlanmamış protein hidrolizatlarında belirlenmiştir. Örneklerin tamamında IQx bileşiği belirlenirken, değişen düzeylerde IQ, MeIQx, MeIQ, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, AαC ve MeAαC bileşikler saptanmıştır.

Sonuç: Et tıraşlama atıklarından üretilen protein hidrolizatlarının çeşitli endüstri kollarında emülsifiye edici, köpük oluşturun, yağ tutucu ve su tutucu ajanlar olarak kullanım potansiyellerinin bulunduğu, ACE inhibitör aktivite ve antioksidan aktivite özellikleri nedeniyle sentetik antihipertansif ilaçlar ile antioksidan maddeler için ikame ürünler olabileceği değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, protein hidrolizatı üretim aşamalarında, anılan gıda toksikantlarının oluşabilmesi nedeniyle gıda güvenliği hususunun da dikkate alınması gerekmektedir.

Keywords: Protein hidrolizatı, et tıraşlama atığı, kloropropanol esterleri, heterosiklik aromatik aminler, gıda güvenliği, fonksiyonel özellik

Eylül 2024, 137 sayfa

ABSTRACT

DOCTORAL DISSERTATION

EVALUATION OF PROTEIN HYDROLYSATES PRODUCED BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF MEAT TRIMMING WASTES UNDER DIFFERENT PROCESS CONDITIONS IN TERMS OF VARIOUS FUNCTIONAL PROPERTIES AND FOOD TOXICANTS

Elif EKİZ

Supervisor: Prof. Dr. Fatih ÖZ

Purpose: In this study, the determination of various functional properties of protein hydrolysates produced from meat trimming wastes by enzymatic hydrolysis method under different process conditions and the evaluation of protein hydrolysates in terms of food toxicants which can be formed during the production were aimed.

Methods: Protein extraction was performed from the waste at different pH values, the protein extracts were hydrolyzed with alcalase enzyme and the hydrolysates were subjected to ultrafiltration process to obtain the protein hydrolysate fractions. Dry matter, crude protein, NPN-S content, hydrolysis degree, protein yield, total sulfhydryl amount, SDS-PAGE profile, antioxidant activity, foaming capacity and stability, emulsion activity and stability, bulk density, solubility, water holding capacity, fat retention capacity and ACE inhibitory activity as well as chloropropanol ester and heterocyclic aromatic amine analyses were performed on the samples.

Findings: It was found that protein extraction process at different pH values had a very significant effect ($p<0.01$) on crude protein and NPN-S contents, hydrolysis degree, protein yield, foaming capacity and stability, emulsion activity, solubility, water holding capacity and ACE inhibitory activity values of the samples and had a significant effect ($p<0.05$) on total sulfhydryl content. While 3-MCPD compound could not be detected in any of the samples, 2-MCPD compound was detected only in unfractionated protein hydrolysates. While IQx compound was detected in all samples, IQ, MeIQx, MeIQ, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, PhIP, AαC and MeAαC compounds were detected at varying levels.

Results: It is commented that protein hydrolysates produced from meat trimming wastes have the potential to be used as emulsifiers, foaming agents, fat and water retention agents in various industries, and can be used as substitutes for synthetic antihypertensive drugs and antioxidants due to their ACE inhibitory and antioxidant properties. However, food safety issues need to be considered during the production stages of protein hydrolysate due to the formation of the above mentioned food toxicants.

Keywords: Protein hydrolysates, meat trimming waste, chloropropanol esters, heterocyclic aromatic amines, food security

September 2024, 137 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
GİRİŞ.....	1
Protein Hidrolizatlarının Üretim Yöntemleri ve Özellikleri	2
Protein hidrolizatlarının antihipertansif aktivitesi.....	5
Protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesi	6
Protein hidrolizatlarının teknofonksiyonel özellikleri	7
Kloropropanoller	9
Kloropropanollerin oluşum mekanizmaları	11
Kloropropanoller ile ilgili yasal düzenlemeler.....	14
Kloropropanollerin sağlık üzerine etkileri	15
Heterosiklik Aromatik Aminler	15
KURAMSAL TEMELLER.....	20
MATERYAL VE METOT	26
Materyal	26
Metot	26
Materyalin kompozisyonu.....	26
Protein ekstraksiyonu ve hidrolizat üretimi	27
Protein hidrolizatlarında çeşitli kalite kriterlerinin belirlenmesi	28
Protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi	31
Protein hidrolizatlarında ısıt işlemler kontaminantlarının belirlenmesi	33
İstatistik Analiz	35
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	36
Et Tıraşlama Atıklarına Ait Analiz Sonuçları	36

Protein Hidrolizatlarının Kalite Kriterlerine Ait Analiz Sonuçları	36
Kurumadde içeriği.....	36
Ham protein içeriği	37
NPN-S içeriği	40
Hidroliz derecesi	42
Protein verimi.....	44
Toplam SH içeriği.....	47
SDS-PAGE profili.....	50
Protein Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özelliklerine Ait Analiz Sonuçları.....	52
Antioksidan aktivitesi	52
Köpürme özelliği (köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi).....	56
Emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi.....	61
Yığın yoğunluğu	65
Çözünürlük.....	66
Su tutma kapasitesi.....	70
Yağ tutma kapasitesi	72
ACE inhibitör aktivitesi	74
Protein Ekstraktı ve Protein Hidrolizatlarında Belirlenen Isıl İşlem Kontaminantlarına Ait Analiz Sonuçları.....	75
Kloropropanol esterleri	75
HAA içeriği	81
Protein Hidrolizatlarında Yapılan Analizlere Ait Temel Bileşen Analizi Sonuçları	87
SONUÇ VE ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	120

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Mevcut Araştırmada İncelenen Kloropropanol Bileşikleri ve Kimyasal Yapıları	11
Tablo 2. HAA Bileşiklerinin Kimyasal Yapıları	16
Tablo 3. Kloropropanol Esterlerinin Analizinde Kullanılan Standartlar ile İlgili GC-MS’te Belirlenen İyonlar (Hedef ve Referans İyonlar)	34
Tablo 4. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Kurumadde İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	36
Tablo 5. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Ham Protein İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	38
Tablo 6. Et tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının NPN-S İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	40
Tablo 7. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Derecelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	42
Tablo 8. Et tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Protein Verimlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	45
Tablo 9. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Toplam SH İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	48
Tablo 10. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının DPPH Radikal Giderme Aktivitesine Ait Varyans Analiz Sonuçları	53
Tablo 11. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının ABTS Radikal Giderme Aktivitelerine (IC ₅₀) Ait Varyans Analiz Sonuçları	55
Tablo 12. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Köpürme Kapasiteleri ve Köpürme Stabilitelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	57

Tablo 13. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Emülsifiye Edici Aktivite ve Emülsiyon Stabilité İndekslerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	62
Tablo 14. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Yıgın Yoğunluklarına Ait Varyans Analiz Sonuçları	65
Tablo 15. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Çözünürlüğüne Ait Varyans Analiz Sonuçları	67
Tablo 16. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Su Tutma Kapasitelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	70
Tablo 17. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Yağ Tutma Kapasitelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	72
Tablo 18. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının ACE İnhibitör Aktivitelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	74
Tablo 19. 3-MCPD ve 2-MCPD Bileşiklerinin LOD ve LOQ Değerleri ile Regresyon Katsayıları ve Geri Kazanım Oranları	76
Tablo 20. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Elde Edilen Protein Ekstraktları, Fraksiyonlanmamış Protein Hidrolizatları ve Fraksiyonlanmış Protein Hidrolizatlarının (<3 kDa) 3-MCPD ve 2-MCPD İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları	77
Tablo 21. Örneklerin 3-MCPD ve 2-MCPD İçerikleri Üzerine Üretim İşlem Basamaklarının Etkisini Gösteren Duncan Çoklu Karşılaştırma Test Sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)	77
Tablo 22. Örneklerin 3-MCPD ve 2-MCPD İçerikleri Üzerine Protein Ekstraksiyonunda Uygulanan pH Değerinin Etkisini Gösteren Duncan Çoklu Karşılaştırma Test Sonuçları ($\bar{x} \pm SD$).....	79
Tablo 23. Standart Karışımında Yer Alan Bireysel HAA Bileşiklerinin LOD ve LOQ Değerleri ile Regresyon Katsayıları ve Geri Kazanımları	81
Tablo 24. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Elde Edilen Protein Ekstraktları, Fraksiyonlanmamış Protein Hidrolizatları ve Fraksiyonlanmış Protein Hidrolizatlarının (<3 kDa) Toplam HAA İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları.....	84

Tablo 25. Örneklerin Toplam HAA İçerikleri Üzerine Üretim İşlem Basamaklarının Etkisini Gösteren Duncan Çoklu Karşılaştırma Test Sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)	84
Tablo 26. Mevcut Araştırmada Üretilen Örneklerin Toplam HAA İçerikleri Üzerine Protein Ekstraksiyonunda Uygulanan pH Değerinin Etkisini Gösteren Duncan Çoklu Karşılaştırma Test Sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)	86



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Protein hidrolizi neticesinde oluşan moleküller	2
Şekil 2. Proteazların aktif bölgeleri	4
Şekil 3. Kloropropanol bileşiklerinin monodiester ve diester yapısal formülü	10
Şekil 4. Kloropropanol esterlerinin HCl ile lipidlerden oluşum reaksiyonu	12
Şekil 5. Kloropropanol esterlerinin gliserolden oluşum mekanizması	13
Şekil 6. Kloropropanollerin allil alkolden oluşum reaksiyonu	14
Şekil 7. HAA'ların serbest radikal ve karbonil yolu ile oluşum mekanizmaları	17
Şekil 8. Araştırmada materyal olarak kullanılan et tıraşlama atıklarının hazırlanması	26
Şekil 9. Bradford yöntemiyle protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan sığır serum albümini ile çizilen kalibrasyon eğrisi	27
Şekil 10. Protein hidrolizatı üretim akış şeması	28
Şekil 11. Üretilen protein hidrolizatlarına ait görseller	28
Şekil 12. L-lösin ile çizilen kalibrasyon eğrisi	30
Şekil 13. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının kurumadde içeriklerine ait ortalama sonuçlar ($\bar{x} \pm SD$)	37
Şekil 14. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ham protein içeriklerine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)	39
Şekil 15. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının NPN-S içeriklerine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)	41
Şekil 16. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının hidroliz derecesine (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)	43
Şekil 17. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının protein verimlerine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)	46
Şekil 18. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının protein toplam SH içeriğine ($\mu\text{mol/g}$) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)	49

Şekil 19. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının SDS-PAGE profili...	51
Şekil 20. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının DPPH radikal giderme aktivitesine (IC ₅₀) ait ortalama sonuçlar ($\bar{x} \pm SD$).....	53
Şekil 21. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ABTS radikal giderme aktivitesine (IC ₅₀ , µg/mL) ait ortalama sonuçlar ($\bar{x} \pm SD$)	55
Şekil 22. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesine (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$).....	58
Şekil 23. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının 30 dk'da köpürme stabilitesine (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$).....	59
Şekil 24. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının 60 dk'da köpürme stabilitesine (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$).....	60
Şekil 25. Ekstraksiyonun pH değeri x analizin pH değeri interaksiyonunun et tıraşlama atıklarından ekstrakte edilen protein hidrolizatlarının 30. dk'daki köpürme stabilitesi üzerine olan etkisi	61
Şekil 26. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivitesi indeksine (m ² /g) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)	63
Şekil 27. Emülsifiye edici aktivitesinin analizi esnasında uygulanan farklı pH değerlerinde ölçülen protein hidrolizatlarının emülsifiye edici aktivite indeksine (m ² /g) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$).....	63
Şekil 28. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının yığın yoğunluğuna (g/mL) ait ortalama sonuçlar ($\bar{x} \pm SD$)	66
Şekil 29. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının çözünürlüğüne (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$).....	68
Şekil 30. Çözünürlük analizi esnasında uygulanan farklı pH değerlerinde ölçülen protein hidrolizatlarının çözünürlüğüne ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$).....	69

Şekil 31. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesine (g su/g protein) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$).....	71
Şekil 32. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesine (g yağ/g protein) ait ortalama sonuçlar ($\bar{x} \pm SD$).....	73
Şekil 33. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitesine (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)	75
Şekil 34. Protein ekstraktı ve protein hidrolizatlarının üretiminde uygulanan işlem $\times$ pH değeri interaksiyonunun toplam HAA içeriği üzerine etkisi (ng/g) ($\bar{x} \pm SD$).....	87
Şekil 35. Temel bileşen analizi.....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
µL	: Mikrolitre
1,3-DCP	: 1,3-dikloropropan-2-ol
2-MCPD	: 2-monokloropropan-1,3-diol
3-MCPD	: 3-kloropropan-1,2-diol
ABTS	: 2,20-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin)-6-sülfonik asit
AU	: Anson Birimleri
cm	: Santimetre
Da	: Dalton
DCP	: Dikloropropandiol
dk	: Dakika
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EFSA	: European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
FDA	: U.S. Food and Drug Administration (ABD Gıda ve İlaç Dairesi)
g	: Gram
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
H ₂ SO ₄	: Sülfirik asit
HCl	: Hidroklorik asit
HFBI	: Heptaflorobütirilimidazol
Hg	: Civa
HPLC-DAD	: Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi-Diode Array Dedektör
IARC	: International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı)
IC ₅₀	: Half maximal inhibitory concentration
JECFA	: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi)
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
KOH	: Potasyum hidroksit

L	: Litre
LDL	: düşük yoğunluklu lipoprotein
LOD	: Limit of detection
LOQ	: Limit of quantification
M	: Molar
MCPD	: Monokloropropandiol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
N	: Normal
NaCl	: Sodyum klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
Nd	: Not Detected
ng	: Nanogram
°C	: Santigrat derece
ppb	: Milyarda bir
s	: Saniye
v	: Hacim
w	: Ağırlık
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
µmol	: Mikromol

GİRİŞ

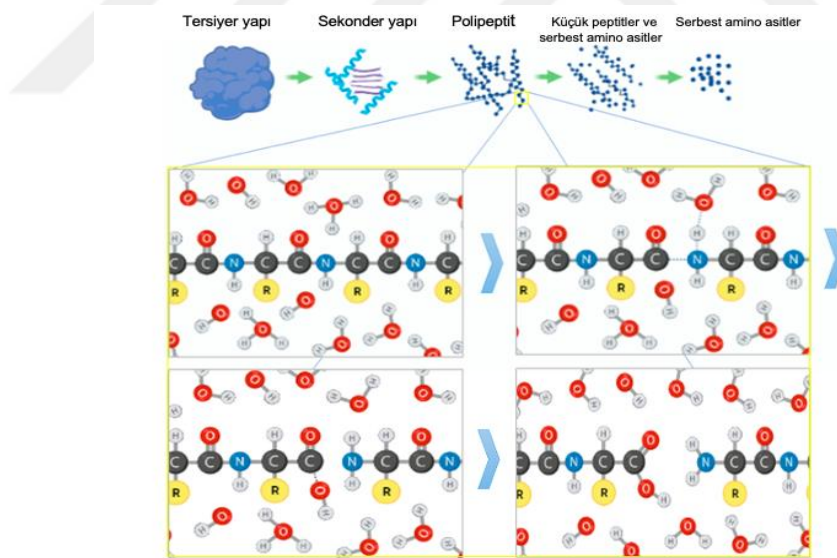
Vücutta hücrelerin temel yapısal bileşenlerini oluşturan proteinler, amino asitlerin peptit bağlarıyla oluşturdukları biyopolimerdir. Enzimler, hormonlar ve taşıyıcıların yapılarını oluşturan proteinler hücrelerin gelişimi, metabolizması ve işlevleri gibi çeşitli vücut fonksiyonları üzerinde de önemli rol oynarlar (Anonymous 2005; Hettiarachchy 2012; Khan *et al.* 2017; Chalamaiah *et al.* 2018; Wu *et al.* 2020). Bu nedenle, proteinlerin günlük olarak alınması ve alım miktarının ise günlük ortalama 0,8 g/kg vücut ağırlığında olması gerektiği tavsiye edilmektedir (Anonymous 2005).

Beslenmeye proteinlerin dahil edilmesinde kaliteli hayvansal protein kaynakları olarak et ve et ürünleri önemli bir yere sahiptir. Öte yandan, tüketime hazır hale getirilmesi amacıyla karkasa/ete uygulanan kesim, parçalama, ürünlere dönüştürme vb. işlemler esnasında insan tüketimine uygun olan/olmayan ve atık olarak nitelendirilen birtakım ürünler meydana gelmektedir. Et sanayisinde oluşan hayvansal kaynaklı yan ürünler karkasın yaklaşık %60'ını oluşturmakta (yaklaşık %40'ı yenilebilir ve %20'si yenilemez yan ürün) ve bu yan ürünlerin bir kısmı nispeten düşük fiyatlı bazı ürünlere işlenmektedir. Diğer taraftan, yan ürünlere işlenemeyen diğer hayvansal kaynaklı atıklar ise işletmelerce ek bir maliyetle imha edilmekte veya uygun şekilde imha edilmeden doğrudan çöpe atılarak çevre kirliliğine neden olmaktadır (Bhaskar *et al.* 2007; Martínez-Alvarez *et al.* 2015; Etemadian *et al.* 2021).

Hayvansal kaynaklı atıklar; bozulmaya karşı hassas bileşime sahip olmalarının yanı sıra toprak, yüzey suları ve yer altı sularının potansiyel kirliliğine neden olan patojen mikroorganizmalar açısından da risk teşkil eden kontaminasyon kaynaklarıdır. Bu nedenle hayvansal atıkların uygun bir şekilde bertaraf edilmemesi çevre kirliliği ve halk sağlığı sorunlarını da beraberinde getirmektedir (Cheng *et al.* 2021). Ayrıca gıda kaynaklı atıkların doğrudan çöpe atılmasının metan emisyonlarını ve iklim değişikliğini beraberinde getirmesi iklim değişikliği ile mücadelede “gıda kaynaklı atıkların azaltılması” hedefi doğrultusunda atıkların değerlendirilmesini veya doğru şekilde bertarafını zorunlu kılmaktadır (Babbitt *et al.* 2022; Mouat 2022). Son yıllarda çevre kirliliği, iklim değişikliği ve küresel ısınma sorunlarına ilaveten yenilenebilir kaynakların giderek azalması sürdürülebilir tedarik zincirleri faaliyeti gibi çevre dostu faaliyetlerin kullanımını da gündeme getirmektedir (Heydari *et al.* 2023). Bu bağlamda dünya çapında hayvansal yan ürünlerin yıllık hacminin 60 milyon ton ve bu yan ürünlerin değerinin 54 milyar pound (yaklaşık 69,1 milyar dolar) olduğu düşünüldüğünde bu ürünlerin katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi önem arz etmektedir (Martínez-Alvarez

et al. 2015; Etemadian *et al.* 2021). Aynı zamanda dünya nüfusunun giderek artmasına karşın gıda temininin zorlaşması önemli miktarlarda oluşan atıkların değerlendirilerek çeşitli ürünlere dönüştürülmesini de zorunlu kılmaktadır. Büyükbaş hayvanların kesimi sonrasında oluşan yan ürünlerin ortalama oranları %18 kan, %16 iç organlar, %6 post ya da deri, %4 yağlı doku, %2 ayak, %0,1 kuyruk ve %0,1 beyin olarak sıralanabilmektedir (Jayathilakan *et al.* 2012). İlaveten, sığır kesimi sonrasında oluşan yan ürünlerin %66'ya kadar çıkabildiği de bildirilmekte olup, canlı ağırlığın yarısından fazlasını oluşturan bu ürünlerin değerlendirilmemesinin işletmelere potansiyel gelir kaybı ve imha işleminin ekstra maliyet olarak yansıdığı vurgulanmaktadır (Jayathilakan *et al.* 2012).

Bahsedilen tüm bu nedenlerden dolayı, son yıllarda bilimsel çalışmalarda hayvansal kaynaklı atıkların değerlendirilmesi büyük ilgi görmekte ve bu anlamda zengin biyoaktif bileşik içeriğiyle protein hidrolizati üretimi oldukça popüler bir değerlendirme yöntemi olarak görülmektedir. Protein hidrolizati; bitkisel veya hayvansal protein kaynaklarından kimyasal, enzimatik veya mikrobiyal hidroliz yöntemleri vasıtasıyla üretilen oligopeptitler, peptitler ve serbest amino asitlerden oluşan karmaşık yapılar olarak tanımlanmaktadır (Abeer *et al.* 2021, Şekil 1).



Şekil 1. Protein hidrolizi neticesinde oluşan moleküller

Protein Hidrolizatlarının Üretim Yöntemleri ve Özellikleri

Protein hidrolizatlarının üretimi başlıca kimyasal (asidik ve alkali hidroliz) ve enzimatik olmak üzere iki yöntemle gerçekleştirilmektedir. Ayrıca protein hidrolizatlarının proteolitik mikroorganizmalar aracılığıyla fermantasyon yöntemi kullanılarak üretilbildiği de belirtilmektedir (Kurbanoğlu and Algur 2004; Heffernan *et al.* 2021). Kimyasal hidroliz yönteminde, belirli sıcaklık ve basınç altında, yöntemine göre asit (HCl, H₂SO₄ vb.) veya alkali

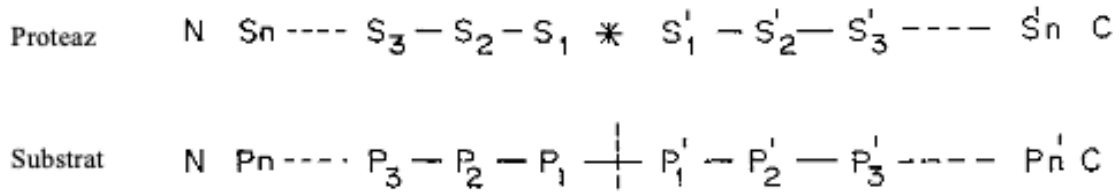
(NaOH, KOH vb.) çözeltilerle muamele edilen protein kaynağı, hidroliz edildikten sonra santrifüj, evaporasyon ve kurutma gibi çeşitli işlemlere tabi tutulmakta ve böylece protein hidrolizatı elde edilmektedir. Kimyasal yöntemin basit ve düşük maliyetli olmasına karşın sistem kontrolünün zorluğu, verimin düşük olması, standart özelliklere sahip olmayan nihai ürün ve ürünün besin değerinde meydana gelen kayıplar gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır (Kristinsson and Rasco 2000; Pasupuleti and Braun 2008; Heffernan *et al.* 2021). Bir diğer protein hidrolizatı üretim yöntemi olan enzimatik hidrolizde ise protein kaynağı, proteolitik enzimin optimum sıcaklık ve pH şartlarının sağlanması ile hidroliz edilmekte ve kimyasal yöntemde olduğu gibi hidroliz sonrası filtrasyon, santrifüjleme, kurutma vb. işlemlere tabi tutulmaktadır. Bununla birlikte, protein hidrolizatı üretiminde enzimatik hidroliz yönteminin, diğer yöntemlere kıyasla toksik/kimyasal/mikrobiyal kontaminant içermemesi, hidroliz sırasında arzu edilmeyen ürünlerin oluşmaması, çevre dostu ve kontrollü reaksiyon şartları, nihai ürünün yüksek kalite ve besin değerine sahip olması ve üretimin tekrarlanabilir olması gibi çeşitli üstünlüklerinden dolayı daha sık tercih edildiği belirtilmektedir (Kristinsson and Rasco 2000; Pasupuleti and Braun 2008; Halim *et al.* 2016; Villamil *et al.* 2017; Wu *et al.* 2020; Abeer *et al.* 2021; Cheng *et al.* 2021; Etemadian *et al.* 2021; Heffernan *et al.* 2021).

Protein hidrolizatlarının fermantasyon yöntemiyle üretilmesi ise proteinlerin proteolitik bakteriler veya mantar suşlarının salgıladıkları proteazlar vasıtasıyla parçalanması esasına dayanmaktadır. Fermantasyon yönteminde protein hidrolizatının nutrasötik ve reolojik özellikleri üzerinde mikrobiyal suşun seçimi ile sergilediği proteolitik aktivite ve spesifikliği önem arz etmektedir. Et, süt veya tahıl gibi çeşitli hayvansal veya bitkisel kaynaklardan fermantasyon yöntemiyle protein hidrolizatı üretiminde genellikle laktik asit bakterileri (*Lactobacillus* ve *Lactococcus* türleri) tercih edilse de *Bacillus*, *Aspergillus* ve *Saccharomyces* gibi mikroorganizmaların kullanıldığı bildirilmektedir (Hou *et al.* 2022; Nasri *et al.* 2022).

Enzimatik hidroliz yöntemi ile protein hidrolizatı üretiminde alkalaz, protamex ve nötraz gibi mikrobiyal orjinli enzimler tercih edilebildiği gibi bromelain ve papain gibi bitkisel kaynaklı ve kimotripsin, tripsin, pepsin ve pankreatin gibi hayvansal kaynaklı proteolitik enzimler de tercih edilebilmektedir (Chalamaiah *et al.* 2012; Etemadian *et al.* 2021). Enzimatik hidroliz yöntemiyle elde edilen protein hidrolizatlarının sahip olacağı özellikleri üzerinde seçilen enzim, hidroliz süresi ve enzim/substrat oranı gibi bazı parametreler etkili olmaktadır. Bu bağlamda alkalaz, pepsin, kimotripsin, tripsin ve proteinaz K gibi farklı kaynaklardan elde edilen enzimlerin protein hidrolizatlarına sağladıkları katkılar nedeniyle sıklıkla tercih edildiği bildirilmektedir (Villamil *et al.* 2017; Rani *et al.* 2018). Alkalaz gibi mikrobiyal orjinli enzimlerin ise diğer kaynaklardan elde edilen enzimlere kıyasla genellikle yüksek ısı ve pH

dirençleri nedeniyle son ürünlerdeki etkinliği bakımından daha uygun proteolitik özellikler sergilediği belirtilmektedir (Etemadian *et al.* 2021).

Bacillus licheniformis'ten elde edilen, 23,7 kDa molekül ağırlığında ve 275 amino asit kalıntısından oluşan alkalaz enzimi, klasik katalitik amino asit üçlüsünün katalitik yapısı hakkında bilgiler sağlayan serin endopeptidazı olarak tanımlanmaktadır (dos Santos *et al.* 2020; Li *et al.* 2022). Alkalaz optimum alkali pH değerinde geniş bir spektruma sahip olup, alkalaz gibi alkali proteazlar stabiliteleri ve aktiviteleri nedeniyle endüstriyel açıdan önemli avantajlar sağlamaktadır. Alkalazın etkinliği Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi (JECFA) ve Gıda Kimyasal Kodeksi (Food Chemical Codex, FCC) tarafından gıdalarda kullanılabilecek saflık spesifikasyonuna sahip olup, Anson Birimleri (AU) cinsinden $\geq 2,4$ U/g olarak bildirilmektedir (Tacias-Pascacio *et al.* 2020; Li *et al.* 2022). Alkalaz hayvansal protein ekstraksiyonuna uygun enzimler arasında yer alan çok yönlü bir endoproteaz olarak nitelendirilmektedir. Substrattaki amino asitlerin hidroliz bölgesi etrafındaki konumları bölünebilir bağın solunda P1, P2, P3 olarak, hidroliz bölgesinin sağında ise P1', P2', vb. olarak ifade edilmektedir (Şekil 2) (Tacias-Pascacio *et al.* 2020).



Şekil 2. Proteazların aktif bölgeleri

* : Proteazların katalitik bölgesi

† : Bölünebilir bağ

S₁-S_n ve S'₁-S'_n: Enzim üzerindeki özgüllük alt bölgeleri

P₁-P_n ve P'₁-P'_n: Enzim üzerindeki alt bölgeler tarafından barındırılan substrat üzerindeki kalıntılar (Rao *et al.* 1998)

Protein zincirinde yer alan ilk amino asidin N-terminaline ve zincirde yer alan son amino asidin ise C-terminaline sahip olduğu düşünüldüğünde, peptit bağının kırılması halinde, P1'e karşılık gelen amino asit, koparılan parçanın veya yeni oluşturulan peptidin C-terminalini oluşturan ilk amino asit olacaktır. Bu bağlamda, P1' kısmında bulunan amino asit ise salınan yeni peptidin N-terminali olacaktır. Alkalazın özgünlüğünün P1'de büyük yüksüz bir amino asit kalıntısı (valin, lösin, izolösin, fenilalanin, tirozin, triptofan) olduğu belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada P1 konumunda glutamik asit, metiyonin, lösin, tirozin, lisin ve glutamin amino asitleri yer aldığı, glutamik asidin P1'de olduğu ve P2' ve P3' bölgelerinde ise diğer hidrofobik amino asitlerden varsa peptit bağlarının parçalandığı belirlenmiştir (Rao *et al.* 1998; Tacias-Pascacio *et al.* 2020; Sujitha and Shanthi 2023).

Gıdalardan elde edilen protein hidrolizatları ile biyoaktif peptitler birbirinin yerine kullanılan terimler olsa da aslında bu hususun doğru bir yaklaşım olmadığı değerlendirilmektedir. Biyoaktif peptitler; “proteinlerin hidrolizi ile insan vücudunda besin değeri katkısından ziyade olumlu fizyolojik işlevlere sahip, 2-20 amino asit kalıntısı içeren bileşenler” olarak tanımlanmaktadır (Chalamaiah *et al.* 2019; Abeer *et al.* 2021). Protein hidrolizatları ise; insan sağlığı üzerinde potansiyel olumlu etkileri olan ve salınabilir biyoaktif peptitleri içeren karışımlar olarak bilinmektedir (Abeer *et al.* 2021). Farklı kaynaklardan üretilen protein hidrolizatlarının, içerdiği biyoaktif peptitler vasıtasıyla, antikarsinojenik, antioksidatif, antihipertansif, hipokolesterolemik, antimikrobiyal, immünomodülatör, antiinflamatuvar ve antilipemik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Protein hidrolizatlarının sahip olduğu bu özellikler üzerinde amino asit bileşimi, amino asit dizilimi ve molekül ağırlığına ilaveten protein hidrolizatı üretim yöntemi (kimyasal veya enzimatik hidroliz) ve üretim şartlarının (süre, sıcaklık, pH, çözücü, enzim, substrat, basınç) başlıca etkenler olduğu bildirilmiştir (Ishak and Sarbon 2018; Tu *et al.* 2018; Etemadian *et al.* 2021; Wen *et al.* 2020; Wu *et al.* 2020; Islam *et al.* 2022). Ayrıca protein hidrolizatlarının gıda, eczacılık, kozmetik ve tarım gibi pek çok sanayi kolunda kullanımına katkı sağlayan çözünürlük, jelleşme, yağ tutma, su tutma, köpürme ve emülsifiye etme gibi çeşitli reolojik özelliklere sahip olduğu da belirtilmektedir (Najafian and Babji 2012; Chalamaiah *et al.* 2018; Karami and Akbari-adergani 2019; Etemadian *et al.* 2021; Gao *et al.* 2021).

Protein hidrolizatlarının antihipertansif aktivitesi

Dünyada her yıl milyonlarca insanın ölüm sebeplerinden olan kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde başlıca risk faktörlerinden biri hipertansiyon olarak ifade edilmektedir. Kan basıncının, normal seviye olarak nitelendirilen 140/90 (sistolik/diyastolik) mm Hg'nin üzerinde olması hipertansiyon olarak tanımlanmaktadır (Gallego *et al.* 2018). Günümüzde, hipertansiyon tedavisinde halihazırda kaptopril, enalapril, lisinopril ve fosinopril gibi sentetik anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri tedavi amaçlı yaygın olarak kullanılmaktadır. ACE, vücutta kan basıncının ve akışkan dengesinin düzenlenmesinde görev alan Renin-Anjiyotensin Sistemi'ndeki enzimdir. Renin-Anjiyotensin Sistemi'nde, böbrekten salgılanan renin enzimi karaciğerden sentezlenen anjiyotensinojen proteinini anjiyotensin-I'e dönüştürmektedir. Ardından anjiyotensin-I, ACE vasıtasıyla anjiyotensin-II'ye dönüşmektedir. Güçlü bir vazokonstriktör fonksiyona sahip olan anjiyotensin-II oluşumuyla aldosteron salgısının uyarılması sonucu sodyum konsantrasyonu ve kan basıncı yükselmektedir. Ayrıca, ACE'nin kallikrein-kinin sisteminde vazodilatör özelliği bulunan bradikinin hidroliz ettiği de bilinmektedir. Bu nedenle, hipertansiyon tedavisinde de kullanılan ACE inhibitörleri

anjiyotensin-II oluşumunu engelleyerek damarlarının daralmasını önlemekte ve neticede kan basıncının düşmesini sağlamaktadır (Udenigwe and Mohan 2014; Lee and Hur 2017; Guo *et al.* 2023). Diğer taraftan, hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçların potansiyel toksisitelerinin yanı sıra baş ağrısı, öksürük, tat kaybı, düşük tansiyon, yorgunluk ve deri döküntüsü gibi çeşitli yan etkilere sahip olması ve maliyetleri nedeniyle gıdalardan izole edilen doğal ACE inhibitör aktiviteye sahip peptitlere olan ilgi artmıştır (Xiang *et al.* 2023). Bu alanda yapılan çalışmalar, ACE inhibitör aktiviteye sahip peptitlerin aktivitelerinin molekül ağırlığı ve sekansa bağlı olarak değişebileceğini, peptidin C-terminalinde hidrofobik ve aromatik amino asitlerin, prolin ve hidroksiprolinin bulunması durumunda daha yüksek ACE inhibitör aktivite gözlemlendiği saptanmıştır. Bununla birlikte, peptidin N-terminalinde ise hidrofobik veya bazik amino asitlerin bulunmasının da yüksek ACE inhibitör aktiviteyle sonuçlandığı belirlenmiştir. ACE inhibitör aktiviteye sahip peptitlerde prolinin, pirol halkasının ACE'yi inhibe ettiği ve prolin bulunan peptitlerin gastrointestinal sisteme dirençli olduğu vurgulanmıştır (Murray and FitzGerald 2007; Dong *et al.* 2024).

Protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesi

Gıdaların işlenmesi veya depolanması aşamalarında meydana gelen lipid oksidasyonu; oksijen varlığında doymamış yağ asitlerinin bir dizi reaksiyonu sonucu besin değeri, tat, lezzet, koku ve görünüm gibi kalite parametrelerini ve raf ömrünü etkileyecek bileşikler (aldehit, keton, hidrokarbonlar ve alkol gibi) oluşturması olarak tanımlanabilmektedir (Domínguez *et al.* 2019; Vellido-Perez *et al.* 2021). Bununla birlikte, vücudumuzda solunumla birlikte kararsız yapıda olan serbest radikal ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmakta ve vücutta diğer bileşikler ile hızlıca reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olmaktadır. Oksidatif hasar ise kanser, nörolojik rahatsızlıklar, hipertansiyon, diyabet, kalp hastalıkları, Alzheimer, Parkinson, enfeksiyonlar ve yaşlanma ile ilişkilendirilmektedir (Chalamaiah *et al.* 2012; Najafian and Babji 2012; Umayaparvathi *et al.* 2014; Wen *et al.* 2020; Bielecka *et al.* 2022). Vücuttaki ROS veya ROS üreten ve nihayetinde proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilen bileşikler radikal süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipokloröz asit ($HOCl$) olarak sıralanabilmektedir. Vücutta endojen bir antioksidan mekanizmayla ROS nötralize edilebilmektedir. Bu bağlamda süperoksit dismutaz enzimi vasıtasıyla $O_2^{\cdot-}$, katalaz, peroksiredoksin ve glutatyon peroksidaz enzimleri vasıtasıyla H_2O_2 ve peroksit radikalleri ise glutatyon peroksidaz enzimleri vasıtasıyla yok edilmektedir. Endojen antioksidan mekanizmasına ilaveten C ve E vitamini, eser elementler (selenyum, bakır, çinko ve mangan), fenolik bileşikler, karotenoidler ve peptitler gibi gıda bileşenleri antioksidan moleküller olarak sıralanabilmektedir (Ibarz-Blanch *et al.* 2023). Bu bağlamda hem

vücudumuzda hem de tükettiğimiz gıdalarda çeşitli olumsuzluklara yol açması nedeniyle serbest radikallerin yok edilmesi esasıyla oksidasyonu önlemek veya reaksiyonu geciktirmek amacıyla antioksidan maddeler kullanılmaktadır. Vücutta meydana gelen oksidatif stresi ve buna bağlı olarak gelişen hasarları önlemek amacıyla antioksidan özelliğe sahip gıdaların tüketimi tavsiye edilirken, gıdalardaki oksidasyonu önlemek amacıyla ise işleme esnasında bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyer bütillhidrokinon (TBHQ), propil gallat ve bütillenmiş hidroksianizol (BHA) gibi çeşitli sentetik veya doğal antioksidan maddeler kullanılmaktadır. Diğer taraftan, sentetik maddelerin potansiyel toksisiteleri ve riskleri aynı aktiviteye sahip doğal ve güvenilir alternatif kaynak arayışlarını gündeme getirmiştir (Chalamaiah *et al.* 2012; Umayaparthi *et al.* 2014; Wen *et al.* 2020). Bu bağlamda, atık değerlendirme, sürdürülebilir ve düşük maliyetle üretim olanağına sahip protein hidrolizatları yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmaları nedeniyle sentetik antioksidanlara alternatif olarak ön plana çıkmıştır (Chalamaiah *et al.* 2012; Najafian and Babji 2012; Rivero-Pino *et al.* 2020). Protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesinin incelendiği araştırmalarda, molekül ağırlığının 20 – 200 Da arasında, hidrofobik ve polar amino asitlerden oluştuğu rapor edilmiştir. Ayrıca, protein hidrolizatlarında genellikle alanin, prolin, glisin, asparajin, lösin, metiyonin, glutamat, tirozin, fenilalanin, histidin ve lisin amino asitlerinin sekansta yer aldığı vurgulanmaktadır. Antioksidan aktivite tirozinin fenolik gruplarının hidrojen donörü olarak rol almasıyla ve histidinin ise imidazol grubunun proton verme kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir (Ishak and Sarbon 2018; Rani *et al.* 2018; Islam *et al.* 2022).

Protein hidrolizatlarının teknofonksiyonel özellikleri

Bir sıvının bir diğer sıvı içerisinde çözünmemesi veya karışmaması, çok küçük damlacıkların ince bir halde dağılımı olarak tanımlanabilen emülsiyon, pek çok gıdanın işlenmesi veya duyuşal özelliklerinde önem arz etmektedir. Bu nedenle, gıdaların işlenmesinde emülsiyonu stabilize etmek için farklı emülgatörler kullanılmaktadır. Emülgatörler, hidrofilik ve hidrofobik bileşenler arasındaki yüzey gerilimini azaltma ve topaklanmayı ve/veya birleşmeyi önleme gibi özelliklere sahip bileşiklerdir (Halim *et al.* 2016; Karami and Akbari-adegani 2019; Quan *et al.* 2019; Lin *et al.* 2022). Emülgatörler sentetik (Tween 20 ve Span 85) ve kaynaklarına göre doğal olarak oluşan emülgatörler (lesitin ve protein) olarak sınıflandırılabilir. Bununla birlikte, sentetik emülgatörlerin güvenliği hakkındaki endişelerden dolayı doğal emülgatörlere olan ilgi artmıştır. Son yıllarda, proteinlerin hidroliziyle oluşan peptit bazlı emülgatörler, doğal emülgatörler arasında ön plana çıkmıştır. Peptitlerin daha kısa amino asit zincirinden oluşması ve daha fazla hidrofobik kalıntı içermesi nedeniyle arayüzlere daha hızlı adsorpsiyon ve küçük emülsiyon damlacıkları oluşturdıkları

bilinmektedir. Ayrıca emülsifiye edici özelliğe sahip peptitlerin yüksek besin değerine sahip olmaları, kolay sindirilebilmeleri ve güvenilir olmaları sağladıkları diğer avantajlar arasında yer almaktadır (Ricardo *et al.* 2021; Lin *et al.* 2022). Buna ek olarak, protein hidrolizatları yapılarındaki hidrofobik ve hidrofilik gruplar aracılığıyla yüzey aktif maddeler olarak nitelendirilmektedir. Protein hidrolizatlarının yüksek molekül ağırlığına sahip peptitlerden ve hidrofobik özellikteki amino asitlerden oluşmalarının emülsiyon stabilitesi üzerine olumlu katkılar sağladığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, bazı araştırmacılar hidrofilik amino asit kalıntılarının ve küçük molekül ağırlıklı peptitlerin varlığına ilaveten çözünürlük özelliğinin de emülsifiye edici aktivite ve emülsiyon stabilitesi üzerinde rol oynadığını rapor etmişlerdir (Halim *et al.* 2016; Quan *et al.* 2019).

Çözünürlük özelliği, peptitlerde bulunan hidrofobik ve hidrofilik amino asitlerin dengesi ile belirlenmekte olup, peptitlerin net yüküne ve hidrofobikliğine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Protein hidrolizi ile hidrofobik özellikteki amino asitlerin karbonil ve amino gruplarının, hidrofilik gruplara dönüşmesiyle protein hidrolizatının çözünürlüğünde artış meydana gelmektedir. Proteinlerin çözünürlüğü, izoelektrik noktadan uzaklaştıkça artmakta ve protein hidrolizatlarının çözünürlüğü üzerinde hidroliz derecesi ile hidroliz yöntemi etkili olmaktadır. Yüksek hidroliz derecesine sahip protein hidrolizatlarının çözünürlük özelliğinin daha iyi olduğu ve özellikle enzimatik hidrolizle proteinlerin molekül ağırlığı ve hidrofobikliğinin etkilendiği belirtilmektedir. Dolayısıyla, protein hidrolizatlarının molekül ağırlığının düşük, hidroliz derecesinin ise yüksek olması çözünürlüğü artırmaktadır (Halim *et al.* 2016; Karami and Akbari-adergani 2019; Islam *et al.* 2022).

Köpük, yüksek oranda gaz ve düşük oranda sıvının karıştırılmasıyla meydana gelmektedir. Köpük oluşum mekanizması, moleküllerin hava ve su arayüzeyinde taşınması, nüfuz etmesi ve yeniden düzenlenmesi esasına dayanmaktadır (Karami and Akbari-adergani 2019; Qi *et al.* 2024). Proteinler, gıdalarda köpürtücü ajanların başında gelmekte olup, proteinlerin fonksiyonel özellikleri arasında köpürme özelliğinin önemli bir yeri bulunmaktadır (Qi *et al.* 2024). Proteinlerin yüzey aktif madde özelliğiyle daha düşük yüzey gerilimine sahip olması sonucu, köpükte proteinlerin hava ve su arayüzeyine girerek yapının açılmasını ve yeniden düzenlenmesini sağladığı bildirilmektedir. Proteinlerin köpük arayüzeyini kinetik olarak stabilize ettikleri belirtilmektedir (Klompong *et al.* 2007; Wouters *et al.* 2016). Proteinlerin köpürme özelliğinin, protein yapısının daha esnek hale getirilmesiyle, daha fazla hidrofobik kalıntı içermesiyle ve yüzey gerilimini azaltma yeteneğinin artırılmasıyla iyileştirilebileceği belirtilmektedir. Bu bağlamda, protein hidrolizatlarında yüksek molekül ağırlıklı peptitlerin ve hidrofobik kalıntıların bulunmasının köpük oluşturma ve köpük

stabilitesi özellikleri üzerine önemli katkı sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca köpük oluşturma ve köpük stabilitesi üzerinde çözünürlük, hidroliz derecesi ve pH gibi diğer faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir (Halim *et al.* 2016; Karami and Akbari-adergani 2019).

Su tutma kapasitesi; gıdaların elastikiyeti, mukavemeti ve akışkanlığı gibi tekstürel ve reolojik özelliklerini etkileyerek, verim ve kalite parametreleri üzerinde önemli etkiye sahiptir (Karami and Akbari-adergani 2019). Dolayısıyla, proteinlerin su tutma özellikleri, gıdaların hem duyuşsal hem de ekonomik özelliklerini etkilemesi nedeniyle gıda endüstrisi açısından önem arz etmektedir. Hidroliz işlemi, proteinlerin su moleküllerini absorbe etme ve su moleküllerine bağlanma kabiliyetlerini etkilemektedir. Proteinlerin yapısındaki C-terminali ve N-terminalinin artması neticesinde absorbe edilen su miktarı ve sorpsiyon bağının kuvveti etkilenerek, higroskopik özelliği oluşturmaktadır (Pires and Batista 2013). Protein hidrolizatlarında su tutma kapasitesi üzerinde molekül ağırlığı, peptit bileşimi, hidroliz derecesi ve pH gibi faktörler etkili olmaktadır. Uzun süreli enzimatik hidroliz işleminin, proteinlerde hidrofilik ve düşük molekül ağırlıklı peptitler oluşturmaları sonucu su tutma kapasitesi üzerinde daha çok etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Halim *et al.* 2016; Karami and Akbari-adergani 2019).

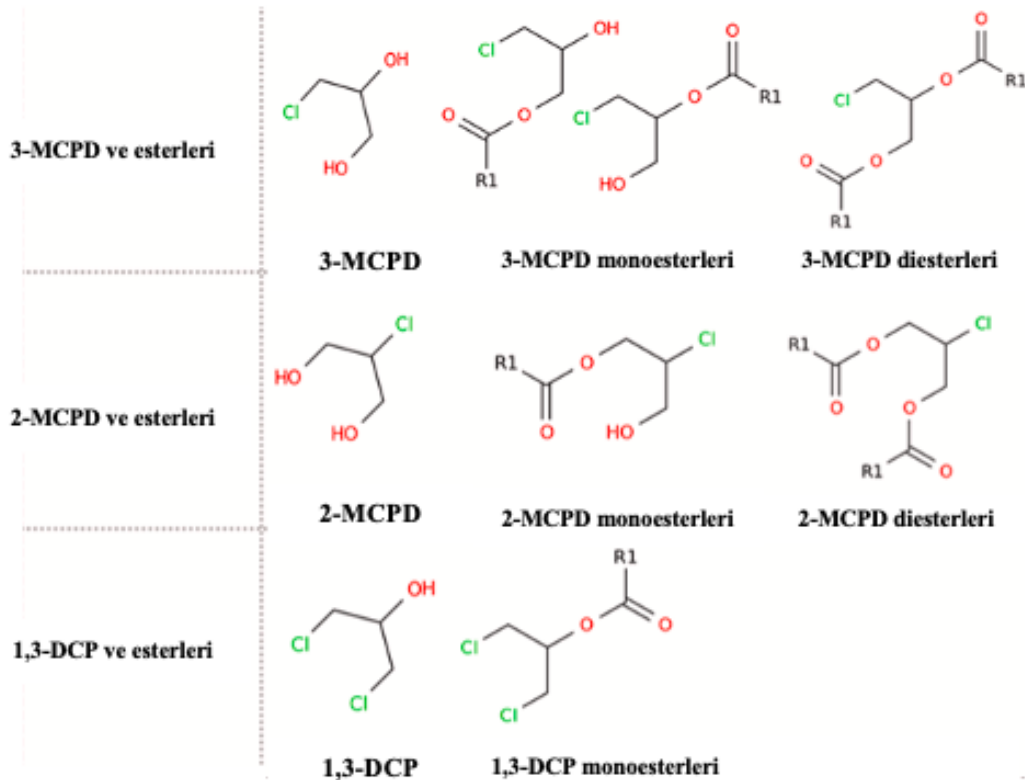
Yağ tutma kapasitesi, proteine doğrudan bağlanan yağ miktarı olarak tanımlanmakta ve özellikle et endüstrisinde önemli bir fonksiyonel özellik olduğundan dolayı önem arz etmektedir (Wasswa *et al.* 2007). Protein hidrolizatlarında yağ tutma kapasitesi üzerinde hidroliz yöntemi, enzim çeşidi, hidroliz derecesi, hidrofobik kalıntılar, çözünürlük ve yığın yoğunluğu etkili olmaktadır (Pires and Batista 2013; Leni *et al.* 2020). Ayrıca, protein hidrolizatında hidroksiprolin içeriğinin yüksek olmasının ve aspartik asit, arjinin, glutamik asit ve lizin gibi amino asitlerin bulunmasının yağ tutma kapasitesini etkilediği bildirilmiştir (Taheri *et al.* 2013).

Kloropropanoller

Gıda muhafaza yöntemlerinin başında ısı işlem gelmekte ve uygulanan ısı işlem gıdanın besin değeri ile mikrobiyolojik ve duyuşsal kalitesini etkilemektedir. Bununla birlikte, gıdalara uygulanan ısı işlemler esnasında oluşan reaksiyonlar sonucunda polisiklik aromatik hidrokarbonlar, heterosiklik aromatik aminler, akrilamid, furanlar ve kloropropanoller gibi sağlık bakımından risk teşkil eden birtakım zararlı bileşikler meydana gelmektedir (Turan vd 2018; Hamzalıoğlu and Gökmen 2020; Oz and Oz 2022). Bu ısı işlem toksikantları arasında yer alan kloropropanoller, ilk olarak Çekoslovakyalı bilim insanları tarafından 1978 yılında bitkisel kaynaklardan elde edilen protein hidrolizatlarında toksik klorohidrinler olarak tanımlanmış, 1979 yılında HCl varlığında hidrolize edilen lipidlerde kloropropanollerden 3-

MCPD (3-kloropropan-1,2-diol) identifiye edilmiş ve bu bileşik 1981 yılında asitle hidrolize edilmiş bitkisel kaynaklı proteinlerde de saptanmıştır (Velisek *et al.* 1978; Velisek *et al.* 2003; Abu-El-Haj *et al.* 2007; Yıldırım ve Yorulmaz 2017; Turan vd 2018). Daha sonraki yıllarda kloropropanoller çeşitli gıdalarda da tespit edilmiş olup, toksikoloji çalışmalarında potansiyel karsinojen ve genotoksik özellikler taşıdıkları ispatlanınca ilgi odağı olmuşlardır. Kloropropanol bileşikleri; yağlarda veya yağlı gıdalarda, ısıl işlem esnasında lipidlerin klor iyonu varlığında hidrolizi sonucu oluşan kontaminantlar olarak tanımlanmaktadır (Araujo *et al.* 2020; Sim *et al.* 2020; Martin *et al.* 2021).

Monokloropropandioller (MCPD) ve dikloropropandioller (DCP) olarak temelde iki grupta sınıflandırılan kloropropanol esterleri, propanol molekülüne bağlanmış klorun konumuna göre 2-MCPD (2-monokloropropan-1,3-diol), 3-MCPD ya da 1,3-DCP (1,3-dikloropropan-2-ol) olarak isimlendirilmektedir (Turan vd 2018). MCPD'ler ve DCP'ler monoester formunda bulunabilmekte iken MCPD'ler aynı zamanda diester formunda da bulunabilmektedir (Şekil 3; Eisenreich *et al.* 2023; Mou *et al.* 2023). Bununla birlikte, serbest formda olabilen kloropropanoller aynı zamanda yağ asitleriyle de esterleşebilmektedir (Arris *et al.* 2020).

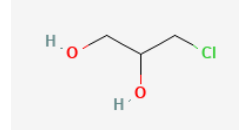
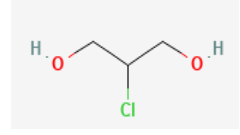


Şekil 3. Kloropropanol bileşiklerinin monodiester ve diester yapısal formülü

Çeşitli gıdalarda tespit edilen kloropropanoller arasında en sık rastlanan 3-MCPD; hafif yağlı, renksiz, sıvı formda, hoş kokulu ve $C_3H_7ClO_2$ moleküler formülüne sahip olup,

yoğunluğu ise 1,32 g/cm³, moleküler ağırlığı 110,539 g/mol ve kaynama noktası 213°C'dir (Hamlet *et al.* 2002a; Arris *et al.* 2020). Tablo 1'de mevcut araştırmada incelenen kloropropanol bileşikleri ve kimyasal yapıları verilmiştir (Lee and Khor 2015).

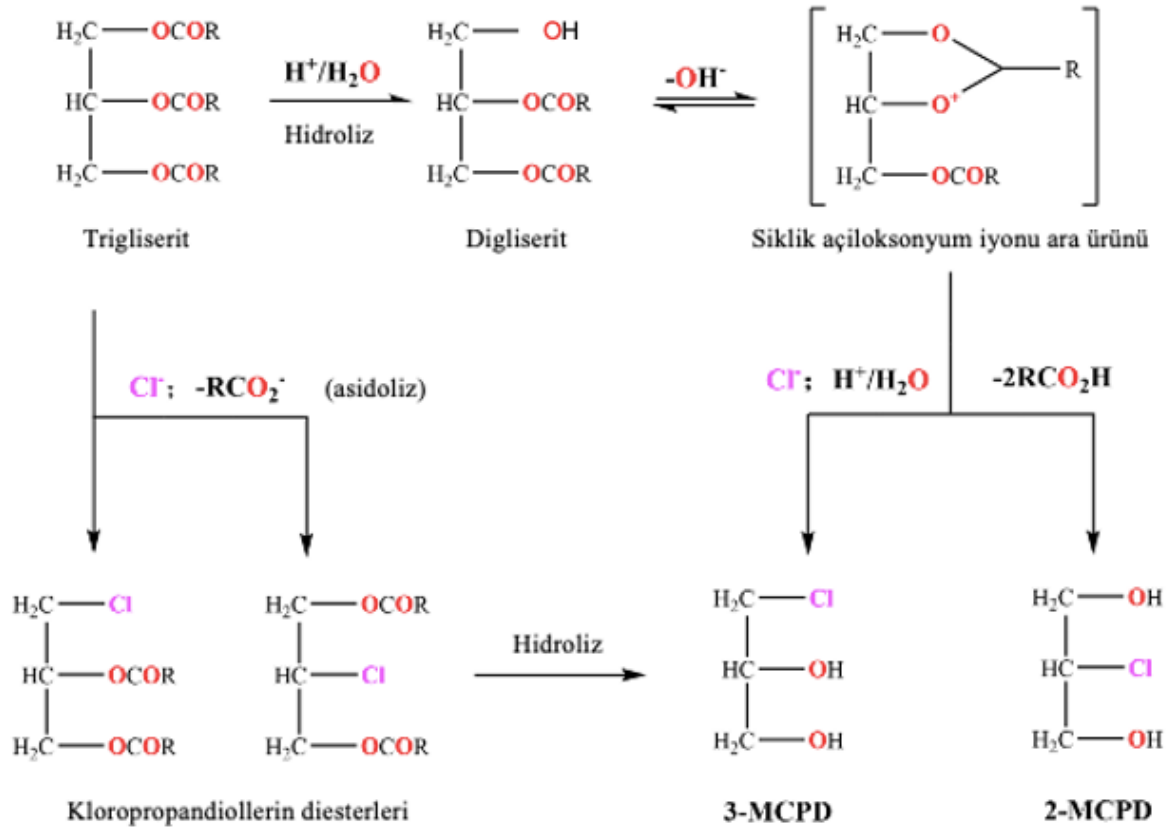
Tablo 1. Mevcut Araştırmada İncelenen Kloropropanol Bileşikleri ve Kimyasal Yapıları

Kimyasal İsmi	Molekül Formülü	Kimyasal Yapı
3-MCPD	C ₃ H ₇ ClO ₂	
2-MCPD	C ₃ H ₇ ClO ₂	

Kloropropanollerin oluşum mekanizmaları

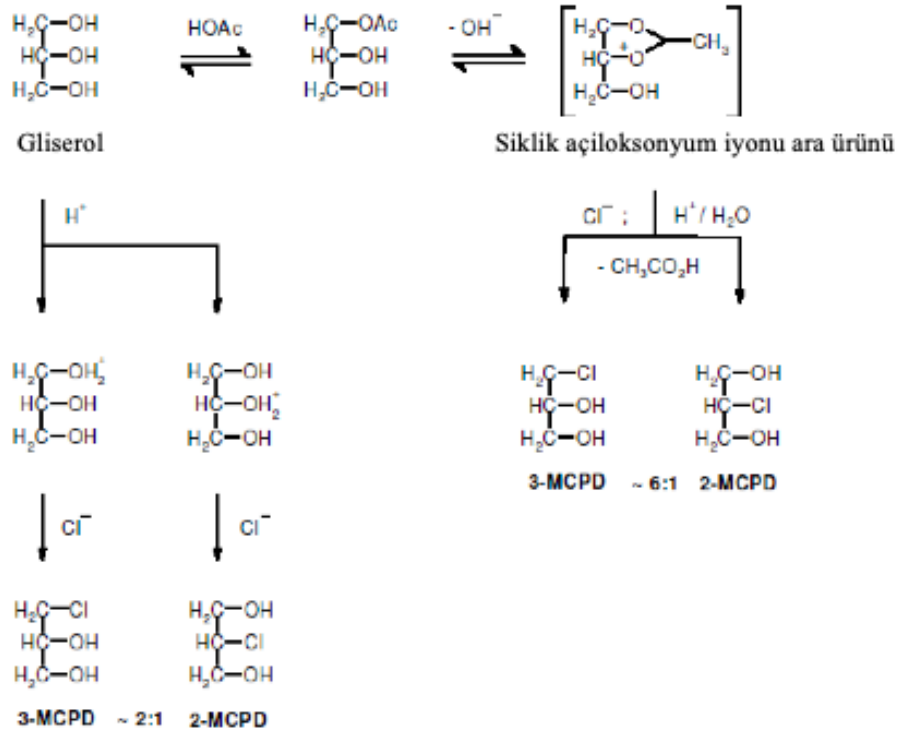
Isıl işlem neticesinde gıdaların yapısındaki gliserol, trigliserit ya da fosfolipitlerin klor ile arasında meydana gelen reaksiyonlar sonucunda kloropropanoller oluşmaktadır (Velíšek *et al.* 2003; Önal vd 2016; Martin *et al.* 2021). Serbest formdaki 3-MCPD'nin gliserol, alilil alkol, karbonhidratlar, lipidler ve HCl gibi prekürsörlerin varlığında düşük su aktivitesi değerine sahip ve ısıtılma uygulanan gıdalarda keşfedildiği bildirilmiştir. 1,3-DCP'nin ise asitle hidrolize edilmiş bitkisel proteinler, yemeklik yağlar, fırıncılık ürünleri, kızartılmış/kavrulmuş et ürünleri ve soya sosunda olduğu belirlenmiştir (Taghizadeh *et al.* 2023). 2-MCPD'nin ise lipidler, gliserol, lesitin ve triolein ile hidroklorik asidin ısıtılması durumunda olduğu belirtilmiştir (Mou *et al.* 2023).

Günümüze kadar kloropropanollerle ilgili farklı oluşum mekanizmaları ortaya konulmuştur. Bu mekanizmalardan birincisi; sulu ortamda klor anyonu ve trigliseritlerin açıl grubu arasındaki reaksiyonlarda kloropropandiol diesterinin ara ürün olarak meydana gelmesidir (Hamlet *et al.* 2002a). Öte yandan, su gibi polar çözücülerde, negatif yüklü nükleofillerin (klor anyonu) farklı reaksiyonlarının, bir bariyer oluşturması sebebiyle substratla etkileşime girememesi neticesinde reaksiyonun kolaylıkla gerçekleşmediği de bildirilmektedir. Izgara veya kavurma gibi farklı pişirme yöntemleri kullanılarak pişirilen etlerde yüzeydeki kabuk oluşumuna bağlı olarak su aktivitesinin düşük olması, klor anyonunun nükleofilik ikame reaksiyonlarının kolaylıkla gerçekleşmesine olanak tanımaktadır. Kloropropanollerin HCl ile lipidlerden oluşum mekanizması Şekil 4'te sunulmuştur (Hamlet *et al.* 2002a; Sun *et al.* 2023).



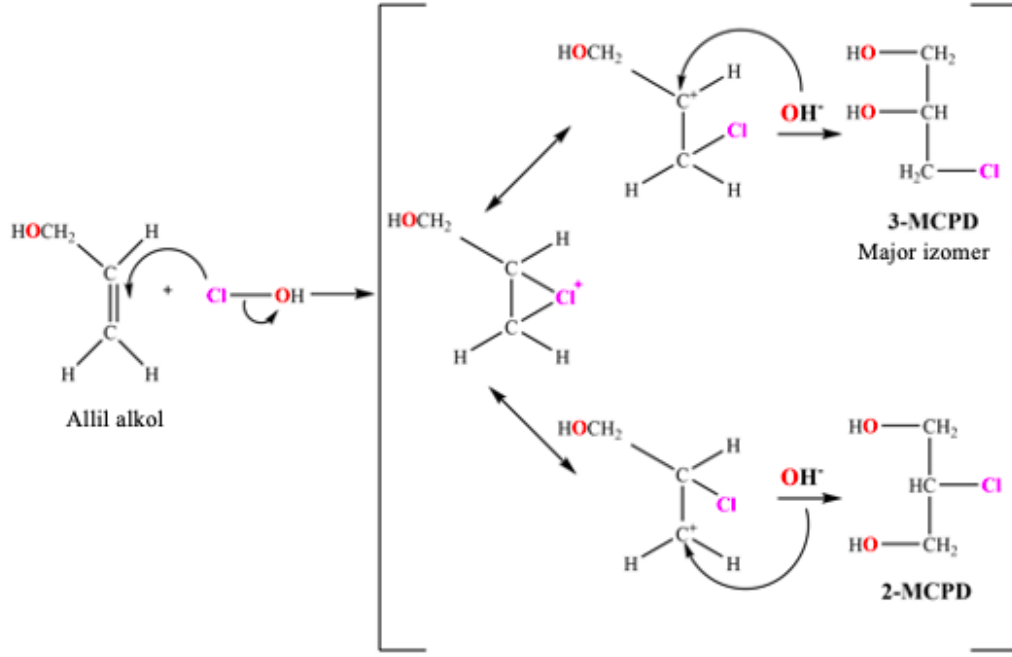
Şekil 4. Kloropropanol esterlerinin HCl ile lipidlerden oluşum reaksiyonu

Kloropropanollerin oluşumlarıyla ilgili öne sürülen mekanizmalarından ikincisi; 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, gıdalarda mevcut veya ısıtılarda trigliseritlerin hidrolizi sonucu oluşan gliserol ile klor anyonu arasındaki reaksiyonun meydana gelmesidir (Hamlet *et al.* 2002a; Rahn and Yaylayan 2011). Gliserol ve hidroklorik asidin sulu ortamda reaksiyonu neticesinde meydana gelen 3-MCPD'nin oluşum miktarının 2-MCPD'nin oluşum miktarına oranının 3:1 olduğu ve bu durum reaksiyonun SN-2 nükleofilik ikame mekanizmasıyla gerçekleştiği yorumuyla açıklanmıştır (Mou *et al.* 2023). Gliserolden kloropropanollerin oluşum reaksiyonu da Şekil 5'te sunulmuştur (Hamlet *et al.* 2002a; Robert *et al.* 2004).



Şekil 5. Kloropropanol esterlerinin gliserolden oluşum mekanizması

Kloropropanollerin oluşum mekanizmalarından üçüncüsü ise; allil alkol vasıtasıyla meydana gelen reaksiyondur. Allil alkol, su ve klorun reaksiyonu neticesinde monokloropropandioller (%88) ve dikloropropandiollerin (%9) oluştuğu ve reaksiyonun 50 - 60°C’de daha hızlı geliştiği bildirilmiştir. Soğan ve sarımsak gibi ürünlerde sistenin enzimatik bozunması neticesinde meydana gelen allil alkol, alliin [(S)-alil-l-sistein sülfoksit]’in termal bozunma ürünü olarak tanımlanmaktadır. Allil alkolden 3-MCPD ve 2-MCPD oluşumu, allil alkolün (prop-2-en-1-ol) çift bağına hipokloröz asidin (HOCl) bağlanması neticesinde meydana gelmektedir. Şekil 6’da allil alkolden kloropropanollerin oluşum reaksiyonu gösterilmiştir (Hamlet *et al.* 2002a; Sun *et al.* 2023).



Şekil 6. Kloropropanollerin allil alkolden oluşum reaksiyonu

Kloropropanollerin meydana gelmesinde mono-, di- ve trigliseritler ile klorun prekürsörler olarak rol oynadığı ifade edilirken, süre, pH ve sıcaklık gibi proses şartlarının da oluşum üzerine etki ettiği bildirilmektedir (Chung *et al.* 2008; Albuquerque *et al.* 2020).

Kloropropanoller ile ilgili yasal düzenlemeler

JECFA'nın 2002 ve 2007 yıllarındaki raporlarında, gıdalarda en çok rastlanılan kloropropanol bileşiği olan 3-MCPD için geçici günlük tolere edilebilir maksimum alım miktarı 2 µg/kg vücut ağırlığı olarak belirtilmiştir (JECFA 2002; 2007). Öte yandan, 3-MCPD'nin hidrolize bitkisel proteinler veya soya soslarında bulunabilecek maksimum miktarı Commission Regulation (EC) No 1881/2006 tarafından 20 µg/kg olarak bildirilirken, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ise özellikle soya sosu olmak üzere gıdalardaki kabul edilebilir limitin 1 mg/kg olduğunu rapor etmişlerdir (Yaman *et al.* 2021). Diğer taraftan, ülkeler özellikle soya sosu başta olmak üzere gıdalarda 3-MCPD varlığı için çeşitli yasal limitler düzenlemiştir. Bu yasal düzenlemeler incelendiğinde 3-MCPD için verilen maksimum tolere edilebilir miktarların genellikle 0,02, 0,20 ve 1,00 mg/kg düzeylerinde olduğu gözlenmiştir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından mümkün insan karsinojeni (Grup 2B) olarak nitelendirilen 3-MCPD için günlük tolere edilebilir alım miktarı 2016 yılında JECFA tarafından yayınlanan raporda ise 4 µg/kg vücut ağırlığı olarak ifade edilmiştir (MacMahon 2018; Wong *et al.* 2020). 2017 yılında yayınlanan EFSA raporunda 3-MCPD'nin etkilerinden dolayı günlük tolere edilebilir alım miktarının 2 µg/kg vücut ağırlığı değerini aşmaması gerektiği

vurgulanmıştır (EFSA 2018). Ülkemizde ise Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Tebliği 2011 yılı düzenlemesinde soya soslarında ve hidrolize bitkisel proteinlerdeki 3-MCPD limiti maksimum 20 µg/kg olarak rapor edilmiştir (TGK 2011).

Kloropropanollerin sağlık üzerine etkileri

3-MCPD'nin toksisitesini incelemek amacıyla yürütülen çalışmalarda, hedef organın böbrek olduğu ve kronik oral maruziyet neticesinde tübüler hiperplazi, nefropati ve adenomlara yol açtığı belirtilmektedir (JECFA 2002; EFSA 2013). Nitekim, 3-MCPD'nin toksisitesi üzerine yürütülen bir çalışmada, 5 – 6 hafta 30 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 3-MCPD uygulanan maymunlarda genel koordinasyon eksikliği, anemi, kas zayıflığı, lökopeni ve trombositopeni gibi çeşitli toksikolojik bulguların gözlemlendiği belirtilmiştir (Kirtan *et al.* 1970). Samojlik and Chang (1970) tarafından yürütülen başka bir çalışmada erkek farelere 30 mg/kg vücut ağırlığı dozunda 3-MCPD uygulanmasının merkezi sinir sisteminde bozukluklara neden olarak felç ve refleks bozukluğuna yol açtığı bildirilmiştir. Diğer bir araştırmada ise erkek sıçanlara günlük 2,0, 8,3 ve 29,5 mg/kg; dişi sıçanlara ise günlük 37,0 mg/kg canlı ağırlık dozunda verilen 3-MCPD'nin böbreklerde renal tübüler hiperplaziye yol açtığı belirlenirken, 3-MCPD'nin günlük erkek sıçanlarda 2,0, 8,3 ve 29,5 mg/kg canlı ağırlık ve dişi sıçanlarda ise 10,3 ve 37,0 mg/kg canlı ağırlık dozlarında uygulanmasının kronik nefropatiye de yol açtığı ortaya konmuştur (Eisenreich *et al.* 2023).

Bununla birlikte, sıçanlarda 3-MCPD'nin kısırlığa neden olmasına ilaveten bağışıklık sistemi üzerinde de çeşitli olumsuz etkiler sergilediği ortaya konmuştur. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise 3-MCPD'nin genotoksik ve karsinojen etkilerinin de olduğu belirtilmiştir (EFSA 2013). Ayrıca kloropropanollerin, yapılan hayvan deneylerinde üreme sistemi, nörolojik ve bağışıklık sistemdeki olumsuzluklara ilaveten karaciğer ve kalp üzerinde de sorunlara neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, kloropropanollerin insanlarda direkt herhangi bir toksik etkisi olduğuna dair henüz kesin bir kanıt olmadığı vurgulanmaktadır (Sun *et al.* 2023).

Heterosiklik Aromatik Aminler

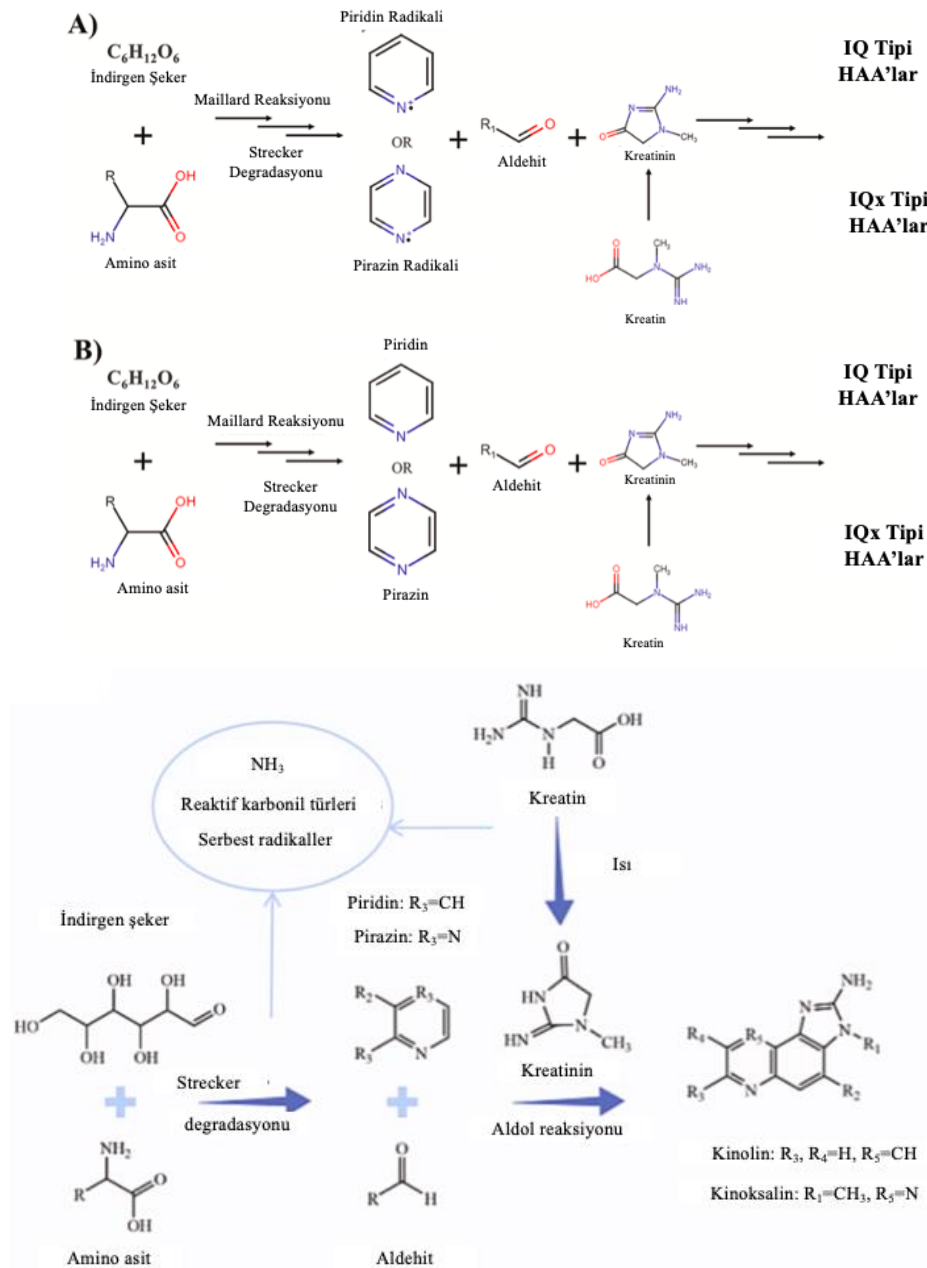
Gıdalardaki bir diğer ısıl işlem toksikantları olan heterosiklik aromatik aminler (HAA'lar) et, balık ve tavuk gibi protein bakımından zengin gıdaların pişirilmesi esnasında oluşmaktadır. HAA'lar ilk olarak 1977 yılında Japon bilim adamları tarafından keşfedilmiş olup, oluşum sıcaklıklarına göre termik (IQ tipi HAA'lar, aminoimidazoazoarenler) ve pirolitik (IQ tipi olmayan HAA'lar, aminokarbolinler) olmak üzere iki ana kimyasal sınıfa ayrılmaktadır (Zamora and Hidalgo 2020). 150 – 300°C arasındaki sıcaklıklarda heksozlar, serbest amino asitler ve kreatin/kreatinin arasında meydana gelen reaksiyonlarda oluşan HAA'lar

“aminoimidazoazorenler” olarak isimlendirilirken (Jägerstad *et al.* 1983; Laser-Reuterswärd *et al.* 1987a; 1987b), 300°C üzerindeki sıcaklıklarda proteinler ve amino asitlerin pirolizi sonucu oluşan HAA’lar ise aminokarbolinler olarak isimlendirilmektedir (Knasmüller *et al.* 2001; Toribio *et al.* 2002). Öte yandan, 100°C’nin altındaki sıcaklıklarda da HAA’ların oluştuğu tespit edilmiştir (Oz and Zikarov 2015). Tablo 2’de mevcut araştırmada incelenen HAA bileşikler ile ilgili bazı bilgiler verilmiştir (Oz *et al.* 2023).

Tablo 2. HAA Bileşiklerinin Kimyasal Yapıları

Kimyasal İsim ve Sınıf	Kısaltması	Molekül Ağırlığı	Molekül Yapısı
2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinolin	IQ	198	
2-amino-3-metilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinokzalin	IQx	199	
2-amino-3,4-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinolin	MeIQ	212	
2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinokzalin	MeIQx	213	
2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinokzalin	4,8-DiMeIQx	227	
2-amino-3,7,8-trimetilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinokzalin	7,8-DiMeIQx	227	
2-amino-3,4,7,8-tetrametilimidazo[4,5- <i>f</i>]kinokzalin	4,7,8-TriMeIQx	241	
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i>]piridin	PhIP	224	
2-amino-9H-pirido[2,3- <i>b</i>]indol	AαC	183	
2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3- <i>b</i>]indol	MeAαC	197	

Tablo 2’de verilen HAA’lardan IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,7-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx ve PhIP aminoimidazoazoarenler olarak sınıflandırılırken, AαC ve MeAαC ise aminokarbolinler olarak sınıflandırılmaktadır (Oz and Oz 2022). Aminoimidazoazoarenlerin oluşum mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen, yapılan araştırmalarda mekanizmada serbest radikaller ve reaktif karbonil türlerinin rol oynadıkları öne sürülmektedir (Şekil 7; Oz *et al.* 2023; Wang *et al.* 2023). Tipik oluşum reaksiyonlarının ise kreatin(in), amonyak ve spesifik reaktif karbonil türleri arasında gerçekleştiği bildirilmektedir (Wang *et al.* 2023). Buradaki reaktif karbonil türlerinin ise amino asitlerin veya lipidler gibi gıda bileşenlerinin oksidasyon ürünlerinin Strecker degradasyonu vasıtasıyla meydana geldiği ifade edilmektedir (Li *et al.* 2023).



Şekil 7. HAA’ların serbest radikal ve karbonil yolu ile oluşum mekanizmaları

Aminoimidazoazorenlerin oluşumları 4 adımda ifade edilecek olursa; ilk olarak reaktif karboniller olan fenilasetaldehit, akrolein veya krotonaldehit ile kreatin/kreatinin arasında reaksiyon meydana gelmektedir. Burada, karbonil olarak fenilasetaldehitin reaksiyona girmesi durumunda alkanalin karbonil karbonuna kreatin/kreatinin eklenmekte, karbonil olarak akrolein veya krotonaldehitin reaksiyona girmesi durumunda ise 2-alkenalin karbon-karbon çift bağına kreatin/kreatinin eklenmektedir. Reaksiyonun ikinci aşamasında, ilk aşamada oluşan aldol amonyak ile reaksiyona girerek, mevcut karbonil grubunun amino grubuna dönüşmesini sağlamaktadır. Burada amino asitler, kreatin/kreatinin gibi bileşenlerin parçalanmasıyla amonyak oluştuğundan dolayı dışarıdan amonyak eklenmesine ihtiyaç duyulmamaktadır. Üçüncü aşamada, ikinci aşamada oluşan amino grubu ve yeni bir karbonil bileşiği arasında karbonil-amin reaksiyonu meydana gelmektedir. MeIQ ve IQ oluşumlarında krotonaldehit, PhIP oluşumunda formaldehit ve MeIQx oluşumunda ise metilglükoksal karbonil bileşiği olarak rol oynamaktadır. Bu aşamaya kadar meydana gelen atomlar aminoimidazoazoren yapısına sahip HAA'ların birçoğunun oluşumu için yeterli iken, sadece MeIQx gibi imidazokinoksalin yapısına sahip HAA'larda ek karbon atomu gerekmektedir. Ek karbon ise formaldehit vasıtasıyla sağlanmaktadır. Son aşamada ise, üçüncü aşamada üretilen ürün yeniden düzenleme, dehidrasyon ve aromatisasyon vasıtasıyla daha kararlı moleküle dönüşmektedir (Hidalgo and Zamora 2022). Aminokarbolinlerin oluşumunda ise fenilalanin, triptofan, glutamat veya ornitin gibi amino asitlerin prekürsör olduğu ve yüksek ısı işlem esnasında aktif radikaller ile deaminasyon veya dekarboksilasyon ürünlerinin üretimini sağlayarak rol oynadıkları bildirilmektedir (Wang *et al.* 2023). Proteince zengin gıdalarda HAA'ların oluşum miktarları ve çeşitleri üzerinde et tipi, pişirme şartları (sıcaklık, süre, metot ve ekipman), pH, ısı ve kütle transferi, su aktivitesi, amino asitler, karbonhidratlar, yağlar, kreatin, lipit oksidasyonu ve antioksidan maddeler gibi birçok faktörün etkili olduğu rapor edilmiştir (Pais *et al.* 1999; Shin *et al.* 2002; Oz 2011; Oz *et al.* 2016;).

Çeşitli ürünlerde HAA'ların belirlenmesi üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, HAA'ların çoğunun mutajenik, nerdeyse tamamının ise karsinogenik olduğu ortaya konmuştur (Sugimura 1995; Skog *et al.* 1998). Diğer gıda mutajenleriyle kıyaslandıklarında HAA'ların aflatoksin B1'den 100 kat, bir PAH bileşiği olan benzo[a]pyrene'den ise 2000 kat daha fazla mutajenik olduğu belirtilmektedir (Oz and Kaya 2011). IARC tarafından MeIQ, MeIQx ve PhIP Grup 2B'de mümkün insan karsinogeni olarak sınıflandırılırken, IQ ise Grup 2A'da muhtemel insan karsinogeni olarak sınıflandırılmaktadır. Pankreas, göğüs, kolorektal, prostat ve üreter kanserleri ile et ve balığın yüksek miktarda tüketimi arasında pozitif ilişki olduğu ve bu pozitif ilişkinin büyük bir kısmının HAA'lar nedeniyle olduğu belirtilmektedir (Klassen *et al.* 2002; Knize *et al.* 2002; Oz and Yuzer 2016; Lee *et al.* 2020; Hidalgo and Zamora 2022).

Tüm bu bilgiler ışığında, gerek farklı kaynaklardan elde edilen protein hidrolizatlarının çeşitli fonksiyonel ve reolojik özelliklerinin incelendiği (He *et al.* 2012; Pires and Batista 2013; Chotikochinda *et al.* 2013; Ko *et al.* 2013; Fontoura *et al.* 2014; Chalamaiah *et al.* 2015; Lima *et al.* 2019; Arihara *et al.* 2021) gerekse de farklı gıdalarda kloropropanollerin (Vicente *et al.* 2015; Wong *et al.* 2020; Zhong *et al.* 2022) incelendiği araştırmalar literatürde halihazırda mevcuttur. Bununla birlikte, beslenme, sağlık ve gıda teknolojisi açısından pek çok olumlu özelliğinden bahsedilen protein hidrolizatlarında, toksik bileşenler olan kloropropanol esterlerinin varlığı ile ilgili yapılan araştırmalar oldukça sınırlı olup, bu çalışmaların büyük bir çoğunluğunda bitkisel kaynaklı hammaddeler ve farklı üretim yöntemleri kullanılmıştır (Velíšek *et al.* 1978; Collier *et al.* 1991; Chai *et al.* 2018). Diğer taraftan, protein hidrolizatlarının nihai özellikleri, kullanılan üretim yöntemi ve proses şartlarına bağlı olarak varyasyon gösterebilmektedir. Proteinlerin çözünürlükleri farklı pH değerine göre değişmekte ve böylece protein hidrolizatı üretiminde son üründe arzu edilen peptitlerin varlığı değişiklik gösterebilmektedir. Bu nedenle, nihai ürünün özellikleri üzerinde etkili faktörler arasında yer alan pH değeri bu bağlamda büyük öneme sahiptir. Bu amaç doğrultusunda, mevcut araştırmada, protein hidrolizatı üretiminde ön işlem olarak protein ekstraktı üretimi gerçekleştirilmiş olup, ekstrakt üretiminde asidik ve alkali çözeltilerle toplam 8 farklı pH değeri uygulaması yapılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla, literatürde enzimatik hidroliz yöntemi ile üretilen protein hidrolizatlarının kloropropanol oluşumu üzerine etkisinin incelendiği bir araştırma bulunmamaktadır. Ayrıca literatürde protein hidrolizatlarında diğer bir önemli toksik bileşik olan HAA oluşumunun incelendiği araştırmaya da rastlanılmamıştır. Bu nedenlerle, mevcut bu araştırmada, sahip olduğu çeşitli fonksiyonel özellikleri ve büyükbaş hayvan karkasından artakalan et tıraşlama atıklarının değerlendirilmesine olanak sağlaması nedeniyle popüler bir ürün haline gelen, protein hidrolizatlarının farklı pH koşullarında ekstrakte edilen protein solüsyonlarından enzimatik hidroliz yöntemi ile üretilmesi neticesinde çeşitli kalite (kurumadde içeriği, ham protein içeriği, NPN-S içeriği, hidroliz derecesi, protein verimi, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez profili, antioksidan aktivite, toplam sülfidril içeriği, köpürme özelliği, emülsifiye edici özellik, yığın yoğunluğu, çözünürlük, su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi ve ACE inhibitör aktivite) ve gıda güvenliği parametrelerinin (kloropropanol esterleri ve HAA'lar) eş zamanlı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Böylelikle, araştırma sonuçlarının literatüre, konu ile ilgili önemli, özgün ve yeni bilgiler kazandıracağına inanılmaktadır.

KURAMSAL TEMELLER

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2016 yılında sadece 18,4 milyon ton kesimhane atığının üretildiği bildirilmekte olup, dünya genelinde ise yılda yaklaşık 100 milyon ton protein açısından zengin atıkların olduğu ve atıkların önemli oranda sera gazı emisyonlarını tetiklediği bildirilmektedir (Ling *et al.* 2022; Zhao *et al.* 2022). Hayvansal ürünlerin üretim faaliyetleri kapsamında artakalan ve atık olarak nitelendirilen yan ürünlerin kullanılmaması veya yanlış kullanılması işletmede gelir kaybına neden olurken, aynı zamanda yan ürünlerin bertaraf edilmesinde göz ardı edilmeyecek seviyelerde ek maliyet ortaya çıkmaktadır (Etemadian *et al.* 2021). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından 2023 yılında yayımlanan raporda, küresel çapta et üretiminin yaklaşık 364 milyon ton olacağı ön görülmektedir (FAO 2023). Bununla birlikte, et üretimine karşılık oluşabilecek atık miktarı ve doğal kaynakların giderek azalması, nüfusun gün geçtikçe artması, sürdürülebilir gıda temininin zorlaşması ve nüfusa karşılık gıda talebinin karşılanamaması gibi nedenler dikkate alındığında atıkların değerlendirilmesi bir zorunluluk haline gelmiştir. İlaveten zengin bileşime sahip bu yan ürünler veya atıklar, katma değeri yüksek ürünler olarak değerlendirilme potansiyeline sahiptir. Bu bağlamda, protein hidrolizatları, atıkların geri dönüşümünün sağlanmasıyla çevre kirliliğinin önüne geçilmesi, ekonomik değeri olmayan ürünlerin katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi ve gıda, eczacılık, kozmetik ve ziraat gibi endüstrilerde geniş kullanım alanına sahip olması nedeniyle önemli alternatif ürünler arasında yer almaktadır (Romero-Garay *et al.* 2022). Protein hidrolizatlarının hammadde, üretim yöntemi ve üretim şartlarına bağlı olarak antioksidatif, antihipertansif, antikarsinojenik, antimikrobiyal, immünomodülatör, antiinflamatuvar ve hipokolesterolemik gibi farmasötik özelliklerinin yanı sıra gıdaların köpürme, jelleşme, çözünürlük, emülsifiye etme, yağ tutma ve su tutma gibi çeşitli reolojik özellikleri iyileştirici etkiye sahip olduğu da belirtilmektedir (Karami and Akbari-adergani 2019; Ramakrishnan *et al.* 2023). Öte yandan, protein hidrolizatlarının birçok sentetik ilaç veya katkı maddesi yerine ikame olarak pek çok farklı alanda kullanılabilecek doğal kaynaklar olma özelliğine sahip olmasına karşın, protein hidrolizatlarının üretimleri esnasında oluşabilecek kloropropanoller ve heterosiklik aromatik aminler gibi ısıl işlem kontaminantları nedeniyle üretimlerine dikkat etmek gerekmektedir. Kloropropanoller, kısaca ısıl işlem esnasında lipidlerin klor iyonu varlığında hidrolizi sonucu oluşan kontaminantlar olarak tanımlanırken, heterosiklik aromatik aminler ise protein bakımından zengin gıdaların ısıl işleme tabi tutulması esnasında oluşan karsinojen ve/veya mutajen bileşikler olarak tanımlanmaktadır.

Literatürde farklı kaynaklar ve yöntemlerle üretilen protein hidrolizatlarının çeşitli özelliklerinin incelendiği ve çeşitli gıdalarda kloropropanoller ile heterosiklik aromatik aminlerin incelendiği çalışmalardan bazıları aşağıda sunulmuştur.

Lima *et al.* (2021) yaptıkları çalışmada balık yan ürünlerinden (deri ve kemik) enzimatik yöntem (alkalaz ve protamex) ile ürettikleri protein hidrolizatlarının mikrokapsüllemesiyle depolama sırasında fizikokimyasal özellikleri ve *in vitro* olarak antioksidan ve anjiyotensin-I dönüştürücü enzim inhibitör aktivitelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, mikrokapsüllemiş hidrolizatların, serbest hidrolizatlarla kıyaslandığında daha düşük su aktivitesi ve daha az higroskopisite gösterdiğini, ABTS radikal süpürme aktivitesi ile indirgeme gücünde ($\geq\%48$) ve ACE inhibitör aktivitesinin ($\geq\%89$) korunmasında bir artış olduğunu bildirmişlerdir.

Bezus *et al.* (2021) tavuk tüyünden *Pedobacter* sp. kullanarak ürettikleri protein hidrolizatının antioksidan aktivitesini değerlendirdikleri çalışmada, protein hidrolizatının ABTS (2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin)-6-sülfonik asit) IC₅₀ değerinin yaklaşık %95'lik aktiviteyle 0,57 g/L olduğunu rapor etmişlerdir.

Tilapia cinsi balıkların atıklarından üretilen protein hidrolizatlarının balıkların beslenmesinde kullanım potansiyelinin incelendiği bir diğer çalışmada, balık protein hidrolizatı ile diyet takviyesinin büyüme, metabolizma, bağışıklık ve bakteriyel enfeksiyona karşı direnç açısından umut verici sonuçlar verdiği ifade edilmiştir (Tejpal *et al.* 2021).

Rodrigues *et al.* (2021) Atlantik morina balığı atıklarından 56,8°C'de, 8,35 pH değerinde, %0,25 (v/w) oranında alkalaz ve 3 saat hidroliz süresi şartlarını kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarında protein ve amino asit içeriği, sindirim oranı, antioksidan ve antihipertansif aktiviteleri incelemişlerdir. Araştırmacılar, protein hidrolizatlarının yüksek bir sindirim verimi ($>\%80$) ve yüksek hidroliz derecesine (%37) sahip olduğunu bildirmişlerdir. Amino asit profilinin nutrasötik uygulamalar için uygun olduğunu ve *in vitro* sindirilebilirliğin $>\%92$ olduğunu rapor etmişlerdir. Elde edilen protein hidrolizatlarının ortalama 1709 Da'lık molekül ağırlığı ve 1 kDa'nın altında %49, 1 – 3 kDa aralığında ise %41'lik bir peptit boyutu dağılım frekansı sunduğunu vurgulamışlardır.

Bonilla *et al.* (2022) kerevit kıymasından alkalın proteaz ve bakteriyel proteaz enzimleri kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin enzim tipi ve hidroliz süresine bağlı olarak değiştiğini bildirmişler ve bu durumun hidroliz şartlarına bağlı olarak farklı peptitlerin üretiminden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Zhang *et al.* (2022a) fok etinden alkalaz enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının toplam amino asit içeriğinin 568,54 mg/g olduğunu ve hidrolizat içeriğinde

lösin ile lizin gibi esansiyel amino asitlerin baskın olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada, fok eti protein hidrolizatlarının %33,55 DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ve %40,76 hidroksil serbest radikal giderme aktivitesi ile yüksek antioksidan aktivite sergilediği rapor edilmiştir.

Gathercole *et al.* (2023) sığır kasından (*Biceps femoris*) elde ettikleri et tozundan tripsin, protamex ve flavourzyme enzimlerini kullanarak protein hidrolizatı üretmişler ve simüle edilmiş bir gastrointestinal sindirime tabi tutmuşlardır. Araştırmacılar, et protein hidrolizatlarının önemli biyoaktif peptit kaynağı olduğunu, et proteinlerinin sindirimden önce enzimatik hidrolize tabi tutulmasının anjiyotensin-I dönüştürücü enzimi ve dipeptidil peptidaz IV'ü inhibe eden biyoaktif peptitlerin daha yüksek biyoyararlanımına katkı sağladığını ve dolayısıyla yüksek tansiyon ve tip 2 diyabet yönetimine katkı sağlayacağını rapor etmişlerdir.

Ryan *et al.* (2023) inek sütünden flavourzyme, nötraz ve protamex enzimleri kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarında köpürme, acılık ve renk özelliklerini incelemişlerdir. İnek sütü protein hidrolizatlarının köpürme özelliklerinin ve L^* değerlerinin hidroliz edilmemiş protein örneklerine kıyasla azaldığını ve flavourzyme kullanılarak üretilen protein hidrolizatları dışında diğer enzimlerle üretilen protein hidrolizatlarının, hidrolize edilmemiş proteinlere oranla acılık skorlarının yükseldiğini tespit etmişlerdir. Protein hidrolizatlarında köpürme ve duysal özelliklerin enzim çeşidi ve hidroliz derecesine bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini vurgulayan araştırmacılar, en düşük acılık skorunun flavourzyme kullanılarak üretilen protein hidrolizatlarında belirlemişler ve bu durumu flavourzyme enziminin ekzopeptidaz aktivitesi ile açıklamışlardır.

Wang *et al.* (2023) gümüş sazan balığı eti hidrolizatlarında antioksidan peptitlerin tanımlanmasını ve bu peptitlerin gastrointestinal sindirim esnasında stabilitesini ve biyoyararlanımını incelemişlerdir. Alkalaz ve papain kullanılarak üretilen protein hidrolizatlarında, en yüksek serbest radikal süpürme aktivitesi, peroksinitrit süpürme aktivitesi ve düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu engelleme kapasitesinin sergilendiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar gastrointestinal sindirim esnasında aktivitelerin arttığını, özellikle papain ve alkalazdan üretilen protein hidrolizatlarının, endotel hücrelerinde oksidatif stres hasarını iyileştirmede güçlü aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang *et al.* (2023) yaptıkları araştırmada gümüş sazan balığı yan ürünlerinden papain, nötraz ve alkalaz enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarında *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12'nin büyümesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Papain kullanılarak üretilen protein hidrolizatlarının diğer enzimlerle üretilen protein hidrolizatlarına kıyasla daha yüksek nitrojen ile <1 kDa molekül ağırlığında bileşenlere sahip olduğunu ve *B. animalis* ssp.

lactis BB-12 gelişimi üzerinde daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmada, *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 gelişimi üzerinde <1 kDa bileşenler, sülfidril içeren amino asitler ve hidrofobik amino asitlerden oluşan peptitlerin daha etkili olduğu vurgulanmıştır.

Chen *et al.* (2021a) bitkisel yağlarda 3-MCPD içeriğini inceledikleri bir çalışmada, sıcak presleme yönteminin soğuk presleme yöntemine kıyasla yağlarda daha yüksek miktarda 3-MCPD esteri oluşumuna yol açtığını bildirmişlerdir.

Guo *et al.* (2021) derin yağda kızartma prosesinde sodyum klorür ve TBHQ'nun 3-MCPD içeriği üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, sodyum klorür miktarıyla paralel olarak 3-MCPD miktarının azaldığını ve antioksidan olarak TBHQ'nun ilave edilmesinin de 3-MCPD üzerinde inhibisyon sergilediğini vurgulamışlardır.

Hidalgo-Ruiz *et al.* (2021) çeşitli gıda örneklerinde (bitkisel yağlar, margarin, bisküvi ve kruvasan) 3-MCPD esterlerinin oluşumunu araştırmışlardır. İnceledikleri 24 örnekten 6 tanesinin Avrupa mevzuatı tarafından belirlenen sınırları aştığını ve mısır yağı örneğinin 2,52 mg/kg düzeyinde 3-MCPD ester içeriğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, zeytinyağı numunesinde tespit edilen 3-MCPD miktarının (1,72 mg/kg) da 3-MCPD esterleri için izin verilen maksimum sınırı aştığını vurgulamışlardır.

Palm yağı üretim prosesinde 3-MCPD üzerinde polifenollerin inhibe edici özelliklerinin incelendiği bir araştırmada, aslında polifenollerin antioksidan aktivitelerinin 3-MCPD üzerinde herhangi bir etki sağlamadığı ve hatta en zayıf antioksidan aktivite sergileyen polifenolün 3-MCPD üzerinde en yüksek seviyede inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir (Wang *et al.* 2021).

González *et al.* (2022) İspanya'da satışa sunulan çeşitli gıdalardan 3-MCPD bileşiğine maruziyetin 0,657 µg/gün ve 2-MCPD bileşiğine maruziyetin ise 0,529 µg/gün olduğunu ifade etmişlerdir.

Kadir *et al.* (2022) farklı sıcaklıklarda ısıtılma işlemin yanı sıra soya ve palm yağının bisküvi üretiminde kullanımının 3-MCPD bileşiği üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, prosesdeki en yüksek pişirme sıcaklığında (220°C) bile oluşan 3-MCPD (1,77 mg/kg) miktarının güvenlik limitlerini aşmadığını bildirmişlerdir.

Miyazaki *et al.* (2022) bisküvi, kraker, cips ve et ürünleri gibi gıda maddelerinde farklı analiz yöntemleri kullanarak kloropropanol esterlerini belirledikleri çalışmalarında, 6 gıda örneğinin analizinde 3-MCPDE'ler için geri kazanımların kısmen değiştirilmiş enzimatik yöntemle %93,7 – 98,5 arasında ve kısmen değiştirilmiş EFSA yönteminde ise %96,6 – 99,4 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Nguyen *et al.* (2022a) ticari patates, tatlı patates, yaban havucu, pancar ve havuç cipslerinde MCPDE'lerin oluşumunu incelemişlerdir. Araştırmacılar esterlerin, yeni alternatif sebze cipslerinde geleneksel patates cipslerinden önemli ölçüde daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunu belirlemişler, özellikle de pancar cipslerinde 7 kat daha fazla 3-MCPDE (ortalama 212 µg/kg) belirlediklerini rapor etmişlerdir.

Yuan *et al.* (2022) kızarmış hamur çubuklarında 3-MCPD esterlerinin oluşumlarını incelemişlerdir. 3-MCPD esterlerinin oluşumunda, yağ türünün etkili olduğunu ve en yüksek 3-MCPD (7,91 mg/kg) ve 2-MCPD (2,70 mg/kg) içeriğinin palm yağında kızartılan örneklerde saptandığını belirtmişlerdir. 200°C'de 4 dk pişirilen örneklerde 3-MCPD içeriğinin 1,87 mg/kg ve 2-MCPD içeriğinin ise 0,68 mg/kg olduğunu ve %1 NaCl içeren hamur örneğinin 180°C'de 4 dk kızartılmasıyla MCPD ester seviyelerinin yükseldiğini rapor etmişlerdir.

Bir diğer çalışmada kahve filtreleri, mutfak kağıtları ve pişirme kağıtları gibi gıdyla temas halindeki ürünlerde 3-MCPD, 2-MCPD, 1,3-DCP ve 2,3-DCP bileşiklerinin belirlenmesi için hassas ve doğru bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Araştırmada, 3-MCPD ve 1,3-DCP bileşiklerinin baskın bileşikler olduğu ve mutfak kağıtlarında en yüksek seviyelerinin sırasıyla 49,7 ve 6,20 µg/L olduğu bildirilmiştir (Zhong *et al.* 2022).

Custodio-Mendoza *et al.* (2023) konserve ürünlerdeki yağ fraksiyonlarının 3-MCPD içeriğini incelemek amacıyla düşük maliyette ve hızlı bir yöntem geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Araştırmada, en yüksek 3-MCPD içeriğinin ayçiçeği yağı dolgulu konserve 22 µg/g olduğu ve en düşük içeriğin ise sızma zeytinyağı dolgulu konserve 0,2 µg/g olduğu saptanmıştır.

Mihalache and Dall'Asta (2023) İtalya'da tüketime sunulan 24 farklı gıda örneğindeki (çeşitli ekmekler, tahıllar, çikolatalar, kek, kruvasan, kurabiye, tereyağı, margarin, kahvaltılık gevrekler, donut, waffle, krep, bebek mamaları, devam mamaları, bitkisel yağlar) 3-MCPD içeriğini belirleyerek maruziyet ve risk karakterizasyonunu değerlendirmişlerdir. Bebekler için en yüksek 3-MCPD alımının, bebek maması kullanımı nedeniyle 1,19 – 2,82 µg/kg vücut ağırlığı/gün arasında değiştiği belirlenmiştir. Araştırmacılar, tüm örneklerdeki 3-MCPD'ye maruz kalma risk düzeyinin, bebek mamalarının yüksek tüketimi dışında, EFSA tarafından tavsiye edilen tolere edilebilir günlük alım limitinin altında olduğunu rapor etmişlerdir.

Zastrow *et al.* (2023) farklı koşullar altında tütsülenen etlerde 3-MCPD ve 2-MCPD içeriğini araştırmışlardır. Araştırmada, füme et örnekleri arasında en yüksek 3-MCPD (98 µg/kg) ve 2-MCPD (7 µg/kg) içerikleri, odun kullanılarak daldırma yöntemiyle ve tuzlanarak hazırlanan et örneklerinde saptanmıştır. Araştırmacılar etin tütsüleme işleminden önce tuzlanmasının 3-MCPD ve 2-MCPD içeriği üzerinde önemli etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Taghizadeh *et al.* (2024) İran'dan topladıkları 9 adet çikolata rneğinde 3-MCPD miktarını incelemişlerdir. 3-MCPD içeriğinin <%70 oranında kakao içeren çikolata örneklerinde 0,05 – 0,95 mg/kg arasında ve >%80 oranında kakao içeren çikolata örneklerinde ise 0,35 – 1,30 mg/kg arasında değiştiği bildirilmiştir. Araştırmacılar <%70 kakao içeren çikolata örneklerinin 50., 80. ve 95. yüzdelik dilimlerdeki tahmini maruz kalma oranının risk teşkil etmediğini bildirirlerken, >%80 kakao içeren çikolata örneklerinde tahmini maruz kalma oranının ise endişe verici düzeyde olduğunu vurgulamışlardır.

Yan *et al.* (2022) domuz eti kıymasına %2,5, %5, %7,5 ve %10 oranlarında suda zenen soya protein izolatu ilavesinin 225°C'de 20 dk pişirme işlemi neticesinde, PhIP, MeIQx, 4,8-MeIQx, Norharman ve Harman bileşiklerinin oluşumu üzerine etkisini incelemişlerdir. Belirtilen tüm HAA bileşiklerinin miktarlarının %2,5 oranında soya protein izolatu ilavesi neticesinde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Maksimum PhIP, 4,8-DiMeIQx ve Norharman miktarlarının %5 oranında soya protein izolatu ilave edilen örneklerde saptandığı, maksimum MeIQx ve Harman miktarlarının ise sırasıyla %2,5 ve %7,5 oranında soya protein izolatu ilave edilen örneklerde tespit edildiği belirtilmiştir. Öte yandan, %10 oranında soya protein izolatu ilavesinin MeIQx ve 4,8-DiMeIQx bileşiklerinde sırasıyla %7 ve %85,7 oranlarında inhibisyon sağladığı rapor edilmiştir.

Li *et al.* (2023) soya proteini ile üç farklı hidroliz derecesine sahip soya protein hidrolizatu ilavesinin, 225°C'de 20 dk pişirme işlemine tabi tutulmuş domuz etinde HAA oluşumu üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, 7S ve hidrolizatlarının kinokzalin tipi HAA'ların oluşumu üzerinde inhibe edici etki sergilediğini ve MeIQx, 4,8-DiMeIQx ve IQx bileşiklerini sırasıyla %69, %79 ve %100 oranlarında inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Belirlenen inhibitör etki, DPPH radikal süpürme kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir. Öte yandan, protein hidroliz derecesinin artmasına bağlı olarak PhIP içeriğinin arttığı ve %11 hidroliz derecesine sahip SPI, 7S ve 11S ilavesinin PhIP içeriğini sırasıyla 41, 54 ve 165 kat artırdığı rapor edilmiştir. Belirlenen artışın sebebi ise serbest amino asitlerin ve reaktif karbonil bileşiklerinin miktarlarının artışına bağlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Mevcut araştırmada, protein hidrolizatı üretiminde materyal olarak, Erzurum Et ve Süt Kurumu Et Kombinasında kesilen kasaplık büyükbaş hayvan karkaslarınının tüketime uygun kısımlarının ayrılmasından artakalan ve tüm yüzeylerinden gelen et tıraşlama atıkları (et, yağ ve diğerk dokular vb.) kullanılmıştır (Şekil 8). Kullanılan materyaller hem canlı hayvan hem de bu hayvanlara ait karkasların Erzurum Et ve Süt Kurumu'nda görev yapan Veteriner hekimler tarafından kontrol edilmesinden sonra temin edilmiştir. Soğuk zincir altında laboratuvara getirilen atık materyaller derhal üretime alınmıştır.



Şekil 8. Araştırmada materyal olarak kullanılan et tıraşlama atıklarının hazırlanması

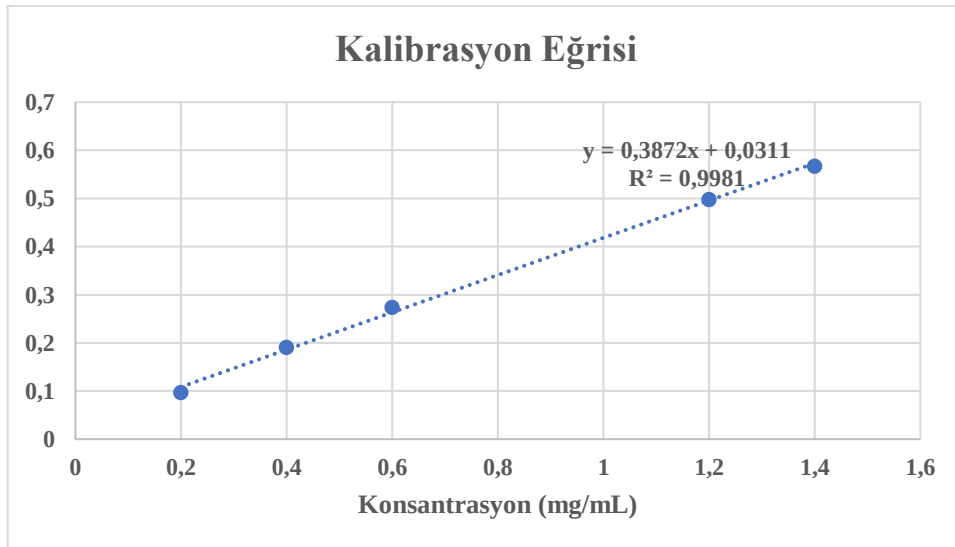
Metot

Materyalin kompozisyonu

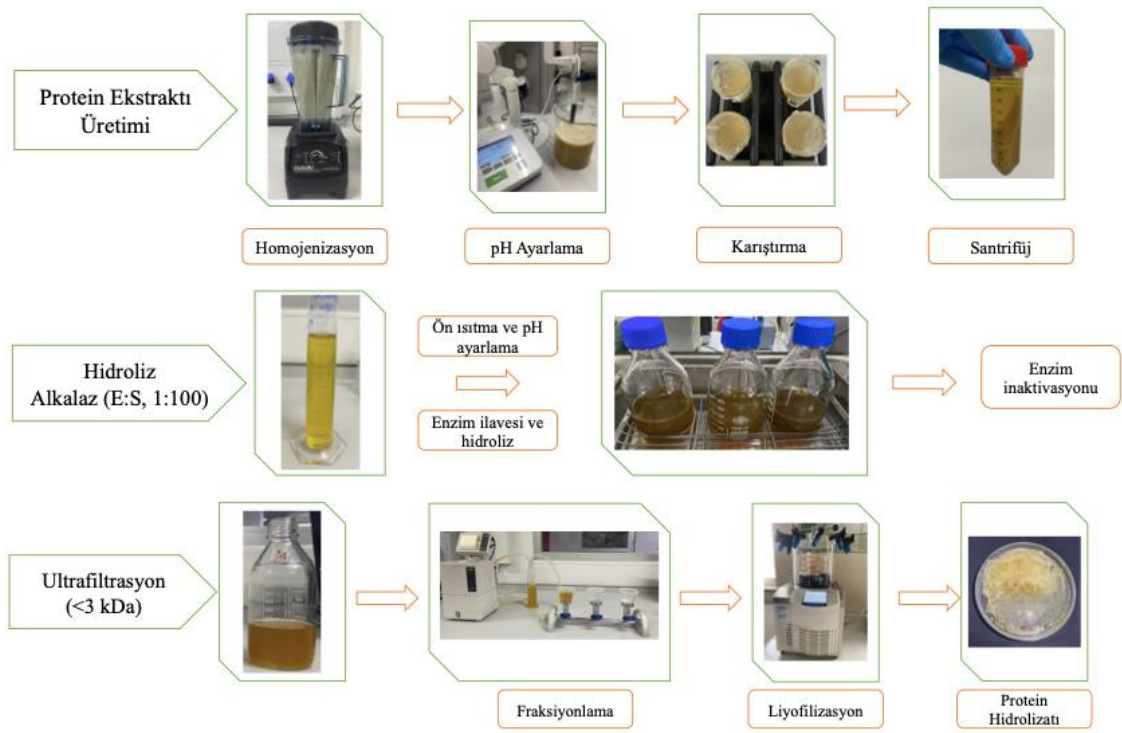
Mevcut araştırmada, protein hidrolizatı üretiminde materyal olarak kullanılan et tıraşlama atıklarının kurumadde, ham protein, yağ ve kül içerikleri ile pH değeri Gökalp vd (2010)'a göre ve protein tabiatında olmayan azotlu maddeler (NPN-S) içeriğı ise Anonymous (1989)'a göre belirlenmiştir.

Protein ekstraksiyonu ve hidrolizat üretimi

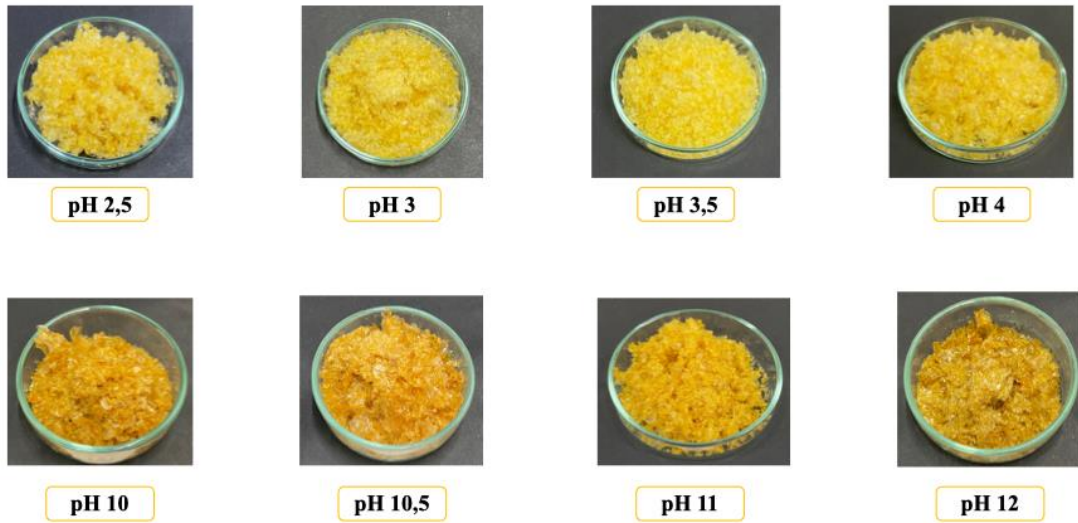
Materyallerin protein ekstraksiyonu Neves *et al.* (2017) tarafından sunulan metotta bazı modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, kıyma haline getirilmiş kesim atıkları 1:7 (w:v) oranında saf su ile mutfak tipi robot kullanılarak 45 s süreyle homojenize edilmiştir. Homojenizatın pH değeri (Mettler Toledo, S210) 1 M HCl ve 2 M NaOH kullanılarak 2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12' ye ayarlanmıştır. Elde edilen solüsyonlar oda sıcaklığında 30 dk süre ile karıştırılmıştır. Çözünür protein ekstraktları 10.000 g'de 20 dk süre ile santrifüj (Lab312, TGL16) işlemi neticesinde elde edilmiştir. Ekstraktların protein içeriği, standart olarak sığır serum albümini kullanılarak Bradford yöntemi ile belirlenmiş ve sığır serum albümini ile çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 9'da sunulmuştur. Protein hidrolizatı üretimi için protein içeriği belirlenen ekstraktlar, hidroliz işleminden önce 10 dk süreyle enzim için optimum sıcaklık olan 50°C'de bekletilmiş ve pH değeri 8'e ayarlanmıştır. Ardından enzim:substrat oranı %1 olacak şekilde Alkalaz enzimi (Merck, Almanya, saflık derecesi %100 ve aktivitesi ≥ 0.75 AU/mL) ilave edilmiştir (Taheri *et al.* 2013; Pires *et al.* 2012; Meshginfar *et al.* 2016). Proteinlerin hidroliz işlemi 50°C'de 4 saat süre (JSR, JSSB-30T) ile gerçekleştirilmiş ve hidroliz süresi boyunca pH değeri sabit tutulmuştur. Hidroliz işleminden sonra hidrolizatlar, enzimlerin inaktive edilmesi için 90°C'de 10 dk süre ile ısıtılmış ve ardından oda sıcaklığına soğutulmuştur. Üretimi tamamlanan hidrolizatlar, <3 kDa (Ultracel 3 kDa, Ultrafiltration Discs, Millipore) protein fraksiyonlarının elde edilmesi amacıyla ultrafiltrasyon (EZ-Fit® Manifold, Filtration Units, Millipore) işlemine tabi tutulmuştur. Toplanan fraksiyonlar liyofilize edilmiş ve kullanımlarına kadar vakum ambalajlarda -18°C'de muhafaza edilmiştir (Li-Chan *et al.* 2012; Neves *et al.* 2016; Neves *et al.* 2017). Protein hidrolizatlarının üretimine ait akış diyagramı Şekil 10'da, örneklere ait görseller ise Şekil 11'de sunulmuştur.



Şekil 9. Bradford yöntemiyle protein içeriğinin belirlenmesinde kullanılan sığır serum albümini ile çizilen kalibrasyon eğrisi



Şekil 10. Protein hidrolizatı üretim akış şeması



Şekil 11. Üretilen protein hidrolizatlarına ait görseller

Protein hidrolizatlarında çeşitli kalite kriterlerinin belirlenmesi

Kurumadde içeriği

Protein hidrolizatlarının kurumadde içerikleri, Gökalp vd (2010) tarafından sunulan yönteme göre belirlenmiştir. Bu doğrultuda, yaklaşık 5 g örnek kurutma kaplarına tartılmış, sabit tartıma gelene kadar 105°C’de bekletilmiş ve kurumadde içerikleri ağırlık farkından % olarak hesaplanmıştır.

Ham protein içeriği

Protein hidrolizatlarının ham protein içerikleri, Kjeldahl yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (Gökalp vd 2010). Yönteme göre 2,5 g örnek, katalizör karışımı, cam boncuk ve H₂SO₄ içeren Kjeldahl balonunda yakma işlemine tabi tutulmuştur. Ardından soğutulan balon içerisine saf su ve doymuş NaOH çözeltisi ilave edilmiş ve distilasyon ünitesindeki erlen içerisine indikatör A içeren %4'lük borik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Distilasyon işlemine erlen içinde 250 mL distilat toplanıncaya kadar devam edilmiş ve ardından distilat, 0,1 N HCl ile titre edilmiştir. Belirlenen azot içeriği, et ve et ürünleri için kullanılan dönüşüm faktörü olan 6,25 ile çarpılarak ham protein içeriği hesaplanmıştır.

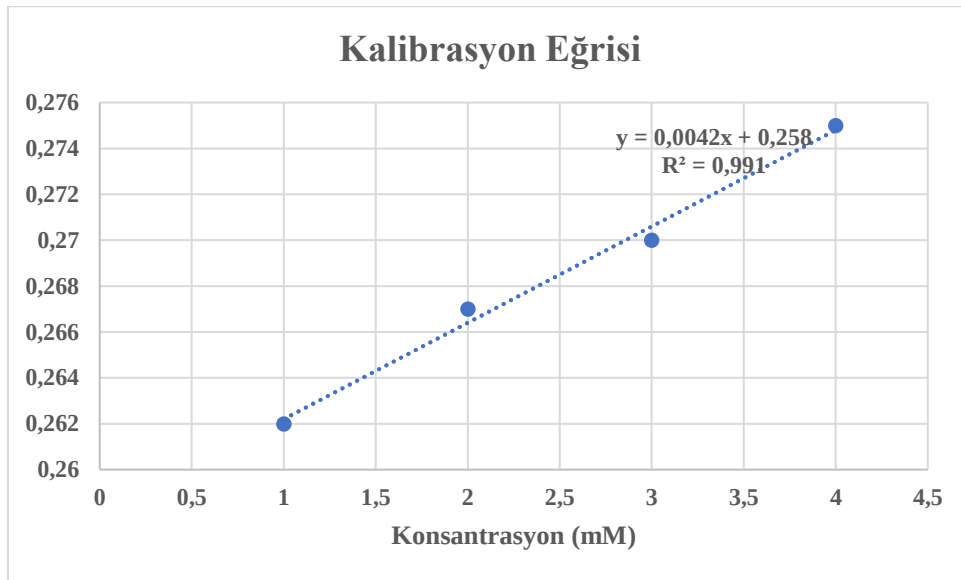
Protein tabiatında olmayan azotlu maddeler (NPN-S) içeriği

Örneklerin NPN-S içeriklerinin tespit edilmesi için, 4 g protein hidrolizatı 8 mL diklorometan ve 40 g %20'lik TCA çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Ardından homojenizat 15 dk 3500 g'de santrifüj edilmiş ve Whatman 595 filtre kağıdından süzölmüştür. Süzöntüden 20 g Kjeldahl balonuna alınarak üzerine 10 g katalizör, 20 mL H₂SO₄ ve cam boncuk eklenerek yakma işlemi uygulanmıştır. Yakma işlemi sonrasında distilasyon ünitesine bağlanan Kjeldahl balonlarına, 90 mL NaOH (%33) ve saf su (400 mL) ilave edilerek distilasyon aşamasına geçilmiştir. Erlene indikatör ve 25 mL borik asit çözeltisi ilave edilmiştir. Distilat 200 mL olana kadar işlem sürdürölmüş ve ardından NPN-S içeriğinin hesaplanması için 0,1 N HCl ile titre edilmiştir (Anonymous 1989).

Hidroliz derecesi

Protein hidrolizatı örneklerinin hidroliz derecesi Hsu *et al.* (2011)'e göre belirlenmiştir. Bu kapsamda, seyreltilmiş örnekler 2 mL 0,2125 M sodyum fosfat tamponu (pH 8,2) ve 1 mL %0,01'lik 2,4,6-trinitrobenzen sülfonik asit (TNBS) ile karıştırılmıştır. Ardından karışım karanlıkta 30 dk boyunca 50°C'de inkübe edilmiş ve reaksiyon 2 mL 0,1 M HCl ilave edilerek tamamlanmıştır. İşlemi müteakiben, 420 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiş ve α-amino asit miktarları L-lösin cinsinden belirlenmiştir. Şekil 12'de L-lösin'e ait kalibrasyon eğrisi sunulmuştur. Protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi aşağıdaki formöl kullanarak hesaplanmıştır. L_{örnek} örnekte hidroliz işlemiyle salınan α-amino asit miktarını, L₀ hidroliz öncesi örnekteki α-amino asit miktarını ve L_{max} ise örnekteki maksimum α-amino asit miktarını ifade etmektedir.

$$\text{Hidroliz Derecesi} = \frac{L_{\text{örnek}} - L_0}{L_{\text{max}} - L_0} \times 100$$



Şekil 12. L-lösin ile çizilen kalibrasyon eğrisi

Protein verimi

Protein hidrolizatlarının protein verimi, Pires *et al.* (2012) tarafından verilen metoda göre belirlenmiştir. Protein verimi değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. W_f protein hidrolizatının ağırlığını (g), P_f protein hidrolizatının protein içeriğini (%), W_i yan ürünlerin ağırlığını (g) ve P_i ise yan ürünlerin protein içeriğini (%) ifade etmektedir.

$$Protein Verimi (\%) = \frac{W_f \times P_f}{W_i \times P_i} \times 100$$

Toplam sülfidril (SH) miktarı

Protein hidrolizatlarında protein oksidasyonu, toplam SH miktarının analizi ile belirlenmiş ve analizde Eymard *et al.* (2009) tarafından bildirilen yöntem referans alınmıştır. Bu kapsamda, 0,5 g örnek, 10 mL 0,05 M fosfat tamponu (pH 7,2) ile homojenize edilmiştir. Ardından 1 mL homojenat 0,6 M NaCl, 6 mM EDTA ve 8 M üre içeren 9 mL 0,05 M fosfat tamponu (pH 7,2) ile karıştırılmış ve santrifüj edilmiştir. Ardından 3 mL süpernatant üzerine 0,05 M sodyum asetat içinde 0,04 mL 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB, 0,01 M) içeren çözelti eklenmiş ve inkübe edilmiştir. İşlemi müteakiben 412 nm'de absorbans ölçülmüş ve sonuçlar $\mu\text{mol/g}$ cinsinden hesaplanmıştır.

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) profili

Protein hidrolizatlarının moleküler ağırlık dağılımının belirlenmesinde SDS-PAGE tekniğinden yararlanılmıştır. Buna göre, konsantrasyonu belirlenen protein hidrolizatlarından 50 μL alınarak üzerine 50 μL 50 mM Tris tamponu (pH 6,8, %3 SDS, %0,05 bromofenol mavisi, 75 mM ditiyotritol, 8 M üre, 2 M tiyoüre) eklenmiş ve karışım 95°C'de 5 dk

bekletilmiştir. İşlemi müteakiben örnekler, kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir. Örneklerin SDS-PAGE profilinin belirlenmesinde %5’lik yükleme jeli ve %18’lik ayırma jeli hazırlanmıştır. Her bir kuyuya 10 µL hidrolizat örneği yüklenmiştir. Örnek koşturma işlemi, ilk yarım saat 150 V’da, ardından boya izi jel sonuna ulaşana kadar ise 120 V’da gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işleminin tamamlanmasının ardından jel, gümüş boyama yöntemiyle boyanmıştır. Örneklerdeki protein bantlarına ait molekül ağırlıklar protein standardı (Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder) kullanılarak belirlenmiştir (Bhaskar *et al.* 2007; Oz and Kaya 2019).

Protein hidrolizatlarının fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi

Antioksidan aktivitesi

Mevcut araştırmada, protein hidrolizatlarının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin)-6-sülfonik asit (ABTS) radikal süpürme aktivitesi analizleri yapılmıştır. DPPH analizi, Mejri *et al.* (2017) tarafından verilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Protein hidrolizatı örneğinden hazırlanan ekstraktlar, 0,1 mM DPPH ile karıştırılmış ve karanlıkta 30 dk bekletilmiştir. Ardından 517 nm’de absorbans ölçülmüştür. ABTS radikal süpürme aktivitesi analizi ise Chalamaiah *et al.* (2015) tarafından bildirilen yöntemin referans alınmasıyla gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 7 mM ABTS çözeltisine potasyumbisülfat (2,45 mM) ilave edilerek, karanlıkta tutulmuştur. Analizden önce ABTS çözeltisi, 734 nm’de $0,70 \pm 0,02$ ’lik bir absorbansa kadar etanol ile seyreltilmiştir. Ardından protein hidrolizatı örneğinden hazırlanan ekstraktların 0,1 mL’sine toplam 3,9 mL seyreltilmiş ABTS çözeltisi ilave edilmiş ve reaksiyon karışımı 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. İşlemi müteakiben 734 nm’de absorbans ölçülmüş ve radikal süpürme aktivitesi belirlenmiştir.

Köpürme özelliği (köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi)

Protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi Chalamaiah *et al.* (2015)’e göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, hidrolizat örneği 20 mL saf suda çözündürülmüş ve pH değeri 2, 4, 6, 8 ve 10’a ayarlanmıştır. Karışım ölçü silindire alınmış ve 3 dk çırpılmıştır. Toplam hacim ölçümü 0., 30. ve 60. dk’da yapılmış ve köpürme özelliği aşağıda verilen formüllere göre belirlenmiştir. Formülde, A; 0. dk’da çırpma işleminden sonraki hacmi (mL), B; çırpmadan önceki hacmi (mL) ve C; 30. ve 60. dk’daki hacmi (mL) ifade etmektedir.

$$\text{Köpürme Kapasitesi (\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

$$Köpürme\ Stabilitesi\ (\%) = \frac{C - B}{B} \times 100$$

Emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi

Protein hidrolizatı örneklerinin emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi Jemil *et al.* (2014) ve Chalamaiiah *et al.* (2015) tarafından sunulan yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, 15 mL örnek, 5 mL yağ ile karıştırılmış ve pH değeri 2, 4, 6, 8 ve 10'a ayarlanmıştır. Karışım homojenize edilmiş ve 0. ve 10. dk'da emülsiyondan 50 µL alınarak sodyum dodesilsülfat (1:100) çözeltisi ile karıştırılmıştır. Çözeltinin 0. dk'daki ve 10. dk'daki absorbans değerleri spektrofotometre ile tespit edilmiştir. Emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır. Formüllerdeki A_0 = 0. dk'daki emülsiyon absorbansı, A_{10} = 10. dk'daki emülsiyon absorbansı, Δt = 10 dk ve ΔA = başlangıç ve 10 dk sonraki absorbans değeri arasındaki farkı göstermektedir.

$$Emülsiyon\ Aktivite\ İndeksi\ (m^2/g) = \frac{2 \times 2,303 \times A_0}{0,25 \times protein\ ağırlığı\ (g)}$$

$$Emülsiyon\ Stabilite\ İndeksi\ (dk) = \frac{A_0}{\Delta A} \times t$$

Yığın yoğunluğu

Protein hidrolizatı örneklerinin yığın yoğunluğu Kurozawa *et al.* (2009)'a göre belirlenmiştir. Buna göre, 2 g protein hidrolizatı örneği 50 mL'lik bir silindire aktarılmış ve yığın yoğunluğu, hidrolizat kütesinin silindirde bulunan hacme bölünmesiyle hesaplanmıştır.

Çözünürlük

Protein hidrolizatı örneklerinin çözünürlüğü Klompong *et al.* (2007)'ye göre yapılmıştır. Bu kapsamda, 200 mg örnek üzerine 20 mL saf su eklenmiş ve karışımın pH değeri 2, 4, 6, 8 ve 10'a ayarlanmıştır. Karışım, oda sıcaklığında 30 dk karıştırılmış ve 7.500 g'de 15 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Sonrasında protein içeriği Bradford yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Protein çözünürlüğü aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$Çözünürlük\ (\%) = \frac{Süpernatanttaki\ protein\ içeriği}{Örnekteki\ toplam\ protein\ içeriği} \times 100$$

Su tutma kapasitesi

Protein hidrolizatı örneklerinin su tutma kapasitesi Ogunwolu *et al.* (2009) tarafından verilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre, darası alınan tüpe 0,1 g örnek ve 1 mL saf su eklenmiştir. Karıştırılan tüpler daha sonra 23°C'de, 1800 g'de

25 dk süre ile santrifüj edilmiş, üst kısımdaki sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra tüpler 45° eğik açıyla bekletilmiş (20 dk) ve ardından sıvı faz tekrar uzaklaştırılmıştır. Aşağıda sunulan formül vasıtasıyla su tutma kapasitesi (g su/g protein) belirlenmiştir.

$$\text{Su tutma kapasitesi (g su/g protein)} = \frac{\text{Bağlanan su miktarı (g)}}{\text{Protein hidrolizatı miktarı (g)}}$$

Yağ tutma kapasitesi

Protein hidrolizatı örneklerinin yağ tutma kapasitesi, Ogunwolu *et al.* (2009) tarafından bildirilen metot esas alınarak tespit edilmiştir. Buna göre, tüpe 0,1 g örnek ve 1 mL ayçiçeği yağı eklenmiş ve çalkalanarak 25 dk bekletilmiştir. Daha sonra tüp, 25°C’de 12000 g’de 10 dk boyunca santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Ardından, üstteki sıvı faz uzaklaştırılarak 45° eğik açıyla tüpler bekletilmiş (20 dk) ve oluşan sıvı faz tekrar uzaklaştırılmıştır. Aşağıda sunulan formül vasıtasıyla yağ tutma kapasitesi (g yağ/g protein) tespit edilmiştir.

$$\text{Yağ tutma kapasitesi (g yağ/g protein)} = \frac{\text{Bağlanan yağ miktarı (g)}}{\text{Protein hidrolizatı miktarı (g)}}$$

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör aktivitesi

Protein hidrolizatı örneklerinin ACE inhibitör aktivitesi, Jang *et al.* (2008) tarafından bildirilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. Buna göre, 20 µL protein hidrolizatı 100 µL hippuril-L-histidil-L-lösin ile inkübasyona (37°C’de 5 dk) tabi tutulmuş, ardından 20 µL ACE ilave edilip tekrar inkübe edilmiştir. Enzimatik reaksiyonu sonlandırmak amacıyla karışıma 150 µL HCl (0,5 N) ilave edilmiştir. Ardından karışım, 1 mL etil asetat eklendikten sonra 4°C’de 3290 g’de 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Etil asetat fazından 0,8 mL alınıp 100°C’de 15 dk buharlaştırılmış ve 1 mL saf su eklenerek 228 nm’de absorpsiyon ölçümü yapılmıştır.

Protein hidrolizatlarında ısıtma işlemi kontaminantlarının belirlenmesi

Kloropropanol esterleri analizi

Protein hidrolizatlarında kloropropanol esterleri (2-MCPD ve 3-MCPD) varlığı, Brereton *et al.* (2001) tarafından bildirilen yöntemin referans alınmasıyla incelenmiştir. Bu kapsamda, protein hidrolizatı örneklerine internal standart (1,3-DCP) ve Extrelut NT paketleme materyali ilave edilmiş ve iyice karıştırılmıştır. Polar olmayan bileşikler uzaklaştırmak için hekzan ve dietil eter karışımı kullanılmıştır. Esterler, dietil eter ile yıkandıktan sonra ekstraksiyon işlemi tamamlanmıştır. Heptaflorobütirilimidazol (HFBI) ile 70°C’de 20 dk türevlendirme işleminin ardından, kromatografik metot validasyonu gerçekleştirilmiş ve

kloropropanol esterlerinin miktarları Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS, Shimadzu, QP2010 Plus) kullanılarak belirlenmiştir.

GC-MS sisteminde splitless enjeksiyon modunda DB-5MS (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm film kalınlığı) kolon kullanılarak analiz yapılmış ve taşıyıcı gaz olarak yüksek saflıkta helyum gazı (1 mL/dk akış hızında) kullanılmıştır. Enjeksiyon sıcaklığı 270°C, iyon kaynağı sıcaklığı 230°C ve arayüzey sıcaklığı ise 270°C olarak uygulanmıştır. Programda başlangıç sıcaklığı 50°C olarak ayarlanmış ve bu sıcaklıkta 1 dk tutulmuş, 1°C/dk artışla 90°C'ye ulaşılmış ve bu sıcaklıkta 2 dk tutulmuştur. Ardından, 50°C/dk artışla 300°C'ye ulaşılmış ve bu sıcaklıkta 5 dk tutulmuştur. Kloropropanol esterlerinin analizinde kullanılan standartlarda GC-MS'te belirlenen iyonlar (SCAN metot) Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kloropropanol Esterlerinin Analizinde Kullanılan Standartlar ile İlgili GC-MS'te Belirlenen İyonlar (Hedef ve Referans İyonlar)

Bileşik	İyon (m/z)
1,3-DCP (Dahili Standart)	119
	79
	116
3-MCPD	119
	75
	169
2-MCPD	69
	75
	169

Heterosiklik aromatik amin (HAA) analizi

Protein hidrolizatlarının HAA içerikleri Oasis ekstraksiyon metoduna göre belirlenmiştir (Messner and Murkovic 2004; Ekiz and Oz 2019). Buna göre, 1 g protein hidrolizatına 12 mL NaOH (1 M) eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda homojenize edilmiştir. Ardından karışıma 10 g Extrelut NT paketlenme materyali eklenmiş ve etil asetat, metanol ve HCl ile elüe edilmiştir. Bileşiklerin belirlenmesinde Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi-Diode Array Dedektör (HPLC-DAD, Thermo Scientific, Ultimate 3000) cihazı kullanılmıştır. Üretilen protein hidrolizatı örneklerinin HAA analizlerinin yapılması için öncelikle bilinen konsantrasyonlarda (10, 7,5, 5, 2,5 ve 1 ng/g) hem bireysel HAA hem de mix HAA stok solüsyonları hazırlanmış ve ilgili literatürde verilen kromatografik koşullarda HPLC cihazında yürütülmüştür. Kalibrasyon işleminin yapılması ve metot validasyon parametrelerinin

belirlenmesinin ardından örneklerden hazırlanan ekstraktlar HPLC cihazında yürütülerek analiz işlemi gerçekleştirilmiştir.

İstatistik Analiz

Araştırma, Tam Şansa Bağlı Deneme Deseni esas alınarak üç tekerrür olacak şekilde kurulmuştur. Araştırmada elde edilen veriler SPSS programı vasıtasıyla analiz edilmiş, Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak ise sonuçlar arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir (Yıldız ve Bircan 1991). Ayrıca Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis) ise SIMCA-P + 14.1 programı vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir.



ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Et Tıraşlama Atıklarına Ait Analiz Sonuçları

Mevcut araştırmada, protein hidrolizatı üretiminde materyal olarak kullanılan et tıraşlama atıklarının kurumadde içeriklerinin $42,97 \pm 2,97$, ham protein içeriklerinin $26,79 \pm 3,24$, NPN-S içeriklerinin $2,40 \pm 0,12$, yağ içeriklerinin $13,81 \pm 2,55$, kül içeriklerinin $0,87 \pm 0,20$ ve pH değerlerinin ise $6,58 \pm 0,05$ olduğu belirlenmiştir.

Protein Hidrolizatlarının Kalite Kriterlerine Ait Analiz Sonuçları

Kurumadde içeriği

Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının kurumadde içerikleri $90,90$ ile $95,97$ arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının kurumadde içeriklerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 4'te verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının kurumadde içeriği üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı ($p > 0,05$) saptanmıştır.

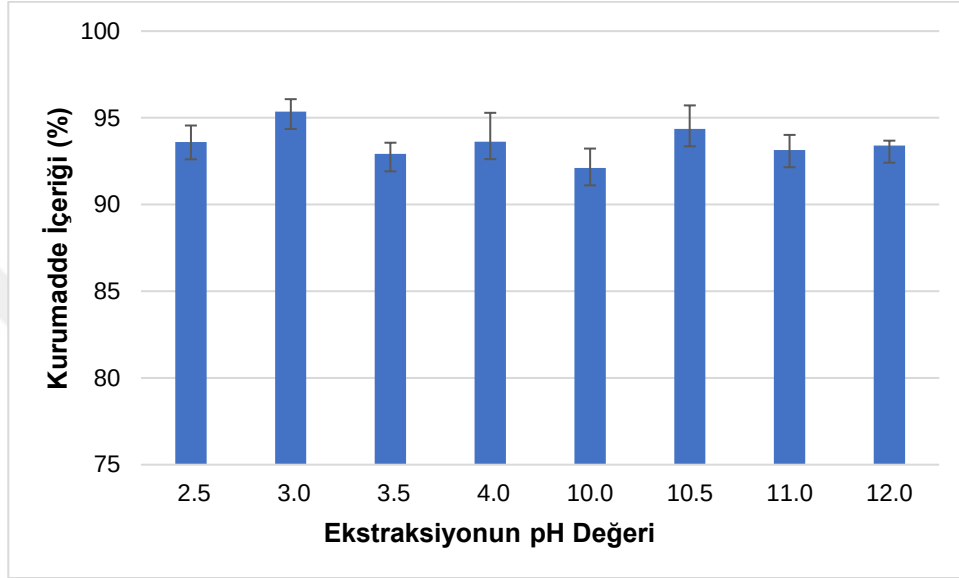
Tablo 4. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Kurumadde İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
Kurumadde İçeriği	pH	7	2,834	2,657
	Hata	16	1,067	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının kurumadde içeriklerine ait ortalama sonuçlar Şekil 13'te yer almaktadır. Üretilen protein hidrolizatlarının kurumadde içeriklerinin ortalama $92,11 \pm 1,12$ ile $95,36 \pm 0,72$ arasında değiştiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların literatür verileriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir. Nitekim, kurumadde içeriği, Bhaskar *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışmada koyun iç organlarından üretilen protein hidrolizatlarında 97 , Taheri *et al.* (2013) tarafından yapılan çalışmada kümes hayvanları ve balık yan ürünlerinden

üretileen protein hidrolizatlarında sırasıyla %96,22 ve %96,55, Ovissipour *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada balık iç organlarından üretileen protein hidrolizatlarında %95,55 ve Rossi *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada mekanik olarak kemikleri ayrılmış kümes hayvanlarının etlerinden üretileen protein hidrolizatlarında ise %93,08 olarak belirlenmiştir. Chalamaiah *et al.* (2012) yapmış oldukları çalışmada protein hidrolizatlarının kurumadde içeriklerinin %90'ın üzerinde olduğunu ve protein hidrolizatlarının bileşimi üzerine hidroliz, santrifüj ve kurutma gibi pek çok işlemin etki edebileceğini rapor etmişlerdir.



Şekil 13. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretileen protein hidrolizatlarının kurumadde içeriklerine ait ortalama sonuçlar ($\bar{x} \pm SD$)

Ham protein içeriği

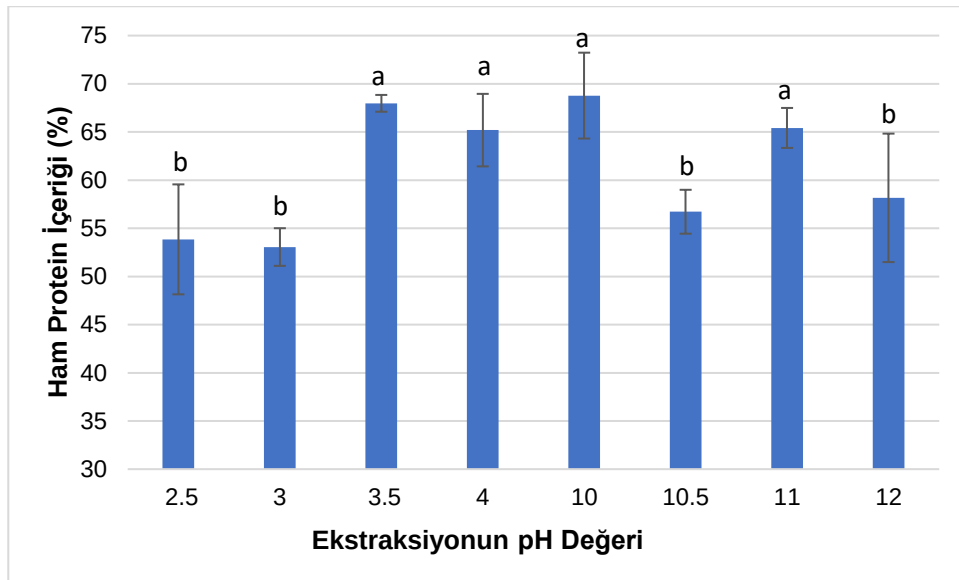
Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretileen protein hidrolizatlarının ham protein içerikleri %47,56 ile 73,45 arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretileen protein hidrolizatlarının ham protein içeriklerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 5'te verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının ham protein içeriği üzerinde çok anlamlı bir etkiye sahip olduğu olduğu ($p < 0,01$) saptanmıştır.

Tablo 5. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Ham Protein İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
Ham Protein İçeriği	pH	7	122,778	7,851**
	Hata	16	15,638	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: p<0,01

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ham protein içeriklerine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 14'te yer almaktadır. Üretilen protein hidrolizatlarının ham protein içeriklerinin ortalama $53,06 \pm 1,95$ ile $68,77 \pm 4,46$ arasında değiştiği ve 3,5, 4, 10 ve 11 pH değerlerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının ham protein içeriklerinin diğer pH değerlerinde (2,5, 3, 10,5 ve 12) yapılan ekstraksiyonun ardından üretilen protein hidrolizatlarının ham protein içeriklerine kıyasla yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, asidik pH değerlerinde yapılan ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının protein içeriklerinde pH değerinin yükselmesi, protein içeriğinin de artmasına neden olmuştur ($2,5 \approx 3 < 3,5 \approx 4$). Tipik olarak, proteinlerin izoelektrik noktaya yakın bir pH değerinde çökmesi beklenmekte ve bu da çözünürlüğün azalmasına ve dolayısıyla ekstrakttaki protein içeriğinin azalmasına yol açmaktadır. Bu beklentinin aksine, mevcut araştırma sonuçlarında et proteinlerinin izoelektrik noktasına yakın olan pH değerlerinde (3,5 ve 4) elde edilen protein hidrolizatlarında protein içeriğinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durumun, agregasyonu önleyen ve protein çözünürlüğünü arttıran iyonlar ve diğer bileşenlerin varlığıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. İzoelektrik noktaya yakın pH değerlerinde proteinler toplanma eğiliminde olmalarına rağmen, ekstraksiyon ortamındaki diğer bileşenler proteinlerin çözünürlüğünü etkileyebilmektedir (Meinke *et al.* 1972; Xing-qian *et al.* 2001; Hofmann *et al.* 2018). Bu durum, Xing-qian *et al.* (2001) tarafından sarı un kurdu larvalarından protein ekstrakte edilebilirliğinin artması, izoelektrik noktaya yakın pH değerlerinde ve NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak protein çözünürlüğünün artışıyla açıklanmıştır. Bunun yanı sıra, araştırmacılar, düşük (2,4) ve yüksek (10) pH değerlerinde NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak protein çözünürlüğünün arttığını veya azaldığını bildirmişlerdir. Ek olarak, Selmane *et al.* (2008) hammaddenin yüksek kolajen içeriğinin, bazı proteinlerin dokulardan ekstrakte edilebilirliğini engelleyebileceğini bildirmişlerdir.



Şekil 14. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ham protein içeriklerine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Protein hidrolizatlarının en önemli fonksiyonel özelliklerinden birisi protein içerikleridir. Öte yandan, yan ürünlerin karmaşık matriksine ilaveten lipid ve protein içeriklerinin yüksek olması, bu ürünlerden proteinlerin geri kazanımını zorlaştırdığı ve bu anlamda uygulanan ekstraksiyon yöntemi seçiminin önem arz ettiği bildirilmektedir (Abdollahi and Undeland 2019). Mevcut araştırmada üretilen protein hidrolizatlarında protein içeriğinin hem örnekler arasında hem de literatürle farklılık göstermesinde, asidik ve alkali pH değerlerinde farklı proteinlerin çözünmesi ve bu sayede kullanılan alkalaz enzimine farklı substratların sunulması, asidik veya alkali pH değerlerinde proteinlerin farklı etkileşim göstermesi (denatürasyon veya agregasyon), ekstraksiyon işleminde homojenizasyon için tercih edilen süspansiyon oranı ve ekstraksiyon aşamasında uygulanan santrifüj işleminde çözünmeyen proteinlerin çökelti ile uzaklaştırılması gibi faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

Protein hidrolizatı üretiminde izoelektrik noktadan uzaklaştıkça çözünürlüğün artmasına paralel olarak genellikle protein geri kazanımının arttığı bildirilmektedir (Tian *et al.* 2017). Öte yandan, Panpipat and Chaijan (2017) ise asidik pH koşullarında çözünürlüğün düşük olmasını; alkali pH koşullarına kıyasla asidik pH koşullarında proteinlerin denatürasyonu sonucu çökerek uzaklaşmasıyla açıklamışlardır. Diğer taraftan, Halldórsdóttir *et al.* (2011) ise izolat üretiminde pH 5,5'te myofibriler proteinler ile sarkoplazmik proteinlerin kümелendiğini ve bu proteinlerin birlikte geri alınabileceklerini ifade etmişlerdir. Ayrıca, Nisov *et al.* (2022), protein hidrolizatlarının protein içeriklerindeki farklılıklarda, substratlara göre enzimlerin spesifikliğindeki değişikliğin etkili olduğunu, Nguyen *et al.* (2022b) ise santrifüj işlemiyle

denatüre proteinlerin çöktürülmesi olarak uzaklaştığını ve homojenizasyondaki düşük çözelti oranının viskoziteyi artırarak santrifüj işlemini ve çözünmeyen kısımların ayrılmasını zorlaştırdığını, dolayısıyla bu işlemlerin protein kayıplarından sorumlu olduğunu rapor etmişlerdir. Foh *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada da protein içeriğindeki farklılıklarda hammadde çeşidi, kullanılan yöntem, homojenizasyonda kullanılan su oranı ve santrifüj işlemlerinin etkili olduğu vurgulanmıştır.

NPN-S içeriği

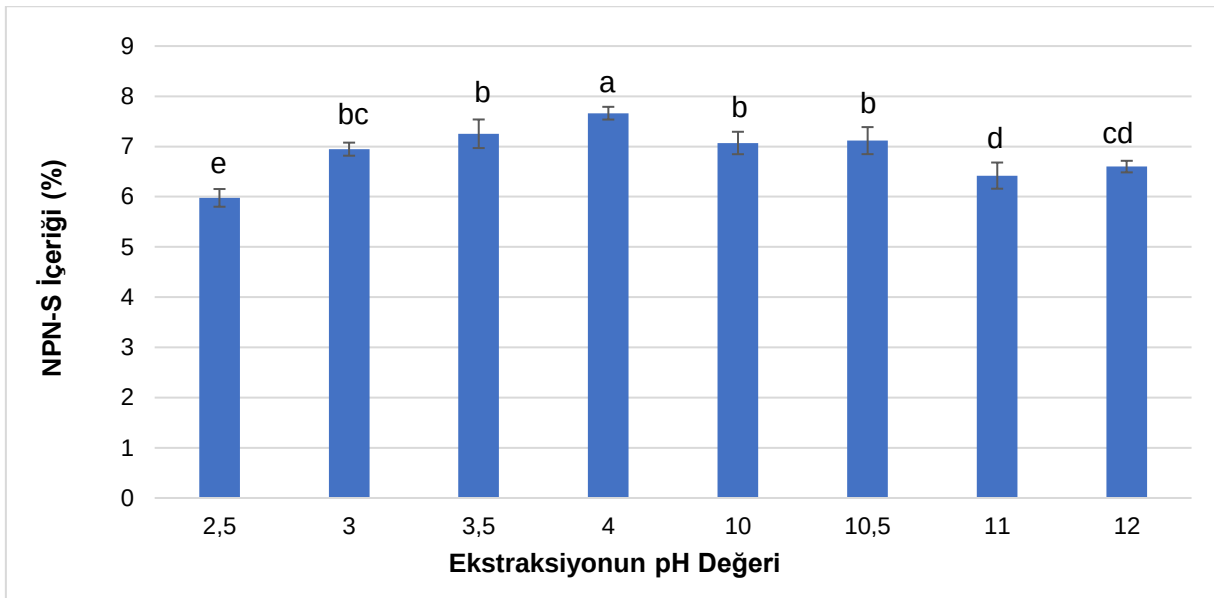
NPN-S; peptitler, kreatin, serbest amino asitler, nükleotidler, pürin bazları, nükleik asitler, üre ve trimetilamin oksit gibi bileşiklerden oluşmakta ve et ve et ürünlerinin kendilerine özgü tat ve aromasında önemli rol oynamaktadırlar (Park *et al.* 1996; Nguyen *et al.* 2022c). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının NPN-S içerikleri %5,78 ile 7,80 arasında değişim göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının NPN-S içeriklerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 6’da verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının NPN-S içerikleri üzerinde çok anlamlı bir etkiye sahip olduğu ($p<0,01$) belirlenmiştir.

Tablo 6. Et tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının NPN-S İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
NPN-S İçeriği	pH	7	0,838	19,213**
	Hata	16	0,044	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: $p<0,01$

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının NPN-S içeriklerine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 15’te yer almaktadır. Üretilen protein hidrolizatlarının NPN-S içeriklerinin ortalama $5,98\pm0,18$ ile $7,66\pm0,13$ arasında değiştiği ve en yüksek NPN-S içeriğinin; pH 4 değerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarında, en düşük NPN-S içeriğinin ise pH 2,5 değerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarında olduğu belirlenmiştir.



Şekil 15. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının NPN-S içeriklerine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Literatürde çeşitli kaynaklardan üretilen protein hidrolizatlarının NPN-S içerikleri üzerine herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bununla birlikte, mevcut araştırmada farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının protein içeriği yanında önemli düzeyde NPN-S de içerdiği belirlenmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının NPN-S içeriklerinin hidrolizatların çeşitli fonksiyonel özellikleri üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Nitekim, Aspevik (2016) somon yan ürünlerinden ürettikleri protein hidrolizatlarında, substrat içeriğinde anserin, taurin ve kreatinin gibi protein tabiatında olmayan amino asitler başta olmak üzere suda çözünebilen çeşitli bileşiklerin var olduğunu bildirmiştir. Waarde (1988) tarafından yapılan araştırmada da karnosin, anserin, taurin, trimetilamin oksit, sarkozin, beta-alanin ve amidler gibi NPN-S'lerin balık ekstraktlarında bulunduğu ve bu maddelerin çeşitli fizyolojik aktivitelere sahip olduğu ortaya konmuştur. Wang *et al.* (2011) ise jambonlarda NPN-S'leri molekül ağırlıklarına göre >3 kDa, 1 – 3 kDa ve <1 kDa olmak üzere üç gruba ayırmışlar ve bu bileşiklerin serbest amino asitler ve küçük molekül ağırlıklı peptitlerden oluştuğunu, suda çözünen proteinler arasında küçük molekül ağırlıklı proteinlerin baskın olduğunu ve 1 – 3 kDa molekül ağırlığına sahip peptitlerin ise daha sınırlı olduğunu rapor etmişlerdir. Sylvestre *et al.* (2001) ise kuzu etlerinde 21 günlük olgunlaşma periyoduyla birlikte NPN-S içeriğinin %15 – 20 oranında arttığını ve bu artışın olgunlaşma sırasında endojen proteaz aktivitesiyle ilgili olarak üretilen serbest amino asitler ve peptitlerden kaynaklandığını rapor etmişlerdir.

Hidroliz derecesi

Gıda proteinlerinin hidrolizi esnasında açığa çıkan peptit bağlarının oranını niteleyen hidroliz derecesi, TNBS, OPA, trikloroasetik asitte çözünen azot miktarı, formol titrasyon ve pH stat gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilmektedir. Ancak bu yöntemler arasında TNBS ve OPA yöntemleri peptit bağlarını doğrudan belirleyen yöntemler olmaları nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (Spellman *et al.* 2003; Rutherford 2010). Mevcut araştırmada da hidroliz derecesi TNBS yöntemi ile belirlenmiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının hidroliz dereceleri %14,00 ile 42,11 arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının hidroliz derecelerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 7’de sunulmuştur. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi üzerine çok önemli etkisinin olduğu ($p<0,01$) tespit edilmiştir.

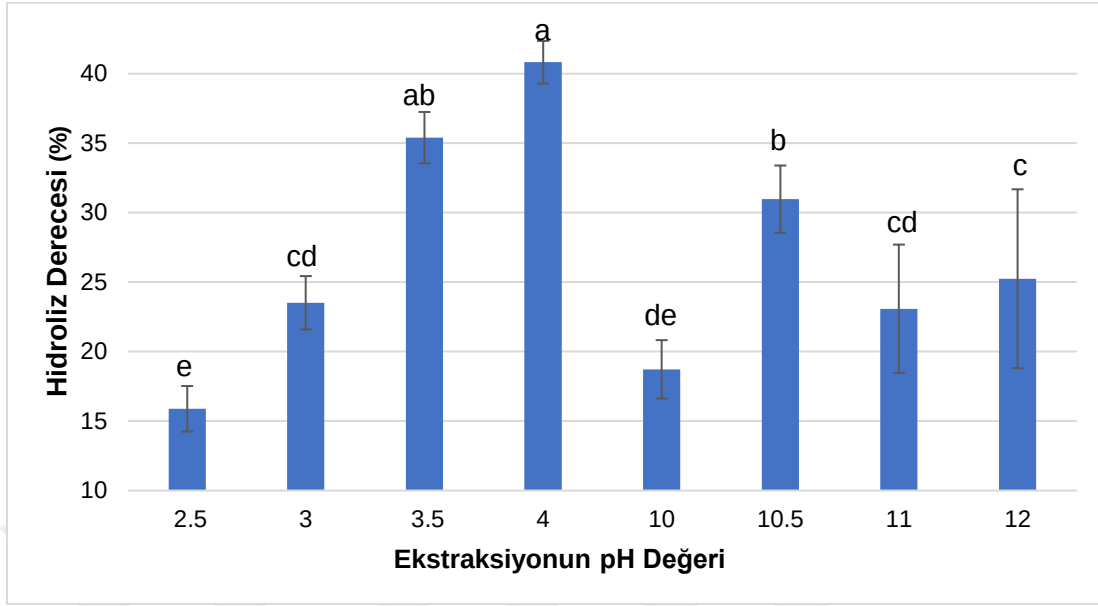
Tablo 7. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Hidroliz Derecelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
Hidroliz Derecesi	pH	7	214,089	20,093**
	Hata	16	10,655	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: $p<0,01$

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının hidroliz derecesine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 16’da yer almaktadır. Üretilen protein hidrolizatlarının hidroliz derecesinin ortalama $15,88 \pm 1,64$ ile $40,83 \pm 1,53$ arasında değiştiği ve 4 pH değerinde ekstrakte edilen proteinlerden üretilen protein hidrolizatlarının hidroliz derecelerinin, 2,5, 3, 10, 10,5, 11 ve 12 pH değerinde ekstrakte edilen proteinlerden üretilen protein hidrolizatlarının hidroliz derecelerinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Polanco-Lugo *et al.* (2014) yaptıkları çalışmada, %10’un altında hidroliz derecesine sahip olan protein hidrolizatlarını; “fonksiyonel özellikleri geliştirmek için kullanılan düşük hidroliz dereceli hidrolizatlar” olarak ve %10’un üzerinde hidroliz derecesine sahip olan protein hidrolizatlarını ise; “biyoaktif bileşiklerde ve özel beslenmede kullanılan yüksek hidroliz dereceli hidrolizatlar” olarak tanımlamışlardır. Bu bağlamda, mevcut araştırmada üretilen protein hidrolizatlarının hidroliz derecelerinin %10’un

üzerinde olması nedeniyle “biyoaktif bileşiklerde ve özel beslenmelerde kullanılan yüksek hidroliz dereceli hidrolizatlar” sınıfına dahil olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 16. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının hidroliz derecesine (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Wang and Shahidi (2018) tavuk, hindi ve sığır etinden flavourzyme enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının hidroliz derecelerinin sırasıyla %12,86, %12,11 ve %10,52 olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, sığır etinden üretilen protein hidrolizatlarında belirlenen hidroliz derecesinin düşük olmasını, diğer örneklerle kıyasla sığır etinde daha yüksek seviyede bulunan myoglobinden salınan demirin enzim aktivitesini olumsuz etkilemesiyle ilişkilendirmişlerdir.

Hidroliz derecesinde substratın özellikleri ve enzim tipi büyük önem arz etmektedir. Aynı protein substratının kullanıldığı hidroliz işleminde enzim tipine bağlı olarak ürünün fonksiyonelliği ve hidroliz derecesi değişkenlik gösterebilmektedir. Ek olarak, parçalanacak bölge konumu ve sayısı, proteindeki amino asit dizilimi ve hidrolizat üretiminde uygulanan ön işlemlerin de enzim-substrat kompleksinin oluşumunu etkileyebileceği bildirilmektedir (Klompong *et al.* 2007; Tacias-Pascacio *et al.* 2020). Ekzopeptidazlar, protein zincirini C ve N terminalinden parçalamak suretiyle monomerleri oluştururken, mevcut araştırmada kullanılan ve bir endopeptidaz olan alkalaz enzimi ise molekül içi peptit bağlarını parçalamaktadır. Alkalazın sahip olduğu bu özellikler, hidrolizatın kısa zincir uzunluğuna sahip biyoaktif peptitlerce zengin olmasına ve yüksek bir hidroliz derecesi ile üretimine olanak sağlayabilmektedir (Razavizadeh *et al.* 2022).

Mevcut araştırmada muamele grubu örnekleri arasında gözlenen hidroliz derecesi farklılığının, enzime sunulan substrat özelliklerinin farklılığıyla ilişkili olabileceği düşünölmektedir. Ayrıca protein ekstraktı üretimindeki homojenizasyon, karıştırma ve santrifüj gibi işlemlere ilaveten hidroliz işleminin süre, sıcaklık ve pH gibi normları literatürdeki farklılıklar üzerine etki eden faktörler arasında yer almaktadır. Nitekim, Neves *et al.* (2017) ekstraksiyon prosedürü, pH, sıcaklık, homojenizasyon ve süre parametrelerinin, farklı pH değerlerinde (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) somon balığı kırpıntı etlerinden elde ettikleri protein ekstraktlarının özellikleri üzerinde önemli rol oynadığını rapor etmişlerdir. Araştırmada, en yüksek protein içeriğinin pH 11’de üretilen ekstraktlarda belirlendiği ve bu ekstraktların alkalaz ile 1, 2 ve 4 saatlik hidrolizi sonucunda hidroliz derecelerinin sırasıyla %13,98, %15,49 ve %18,35 olduğu rapor edilmiştir. Buna ilaveten araştırmacılar, hidroliz işleminin büyük bir kısmının inkübasyonun ilk 1 saatlik zaman diliminde meydana geldiğini ve protein ekstraktlarının molekül ağırlığının (>100 kDa) hidroliz işleminle azalarak temelde <5 kDa, 5 – 10 kDa ve 10 – 20 kDa değerlerinde olduğunu vurgulamışlardır. Benzer şekilde, mevcut araştırmada da 4 saatlik inkübasyon işlemi esnasında pH değeriinin sabit tutulması amacıyla yapılan kontrollerde ilk 1 saatlik zaman diliminde pH değeriindeki değişime bağlı olarak yoğun bir hidroliz işleminin gerçekteleştiği tahmin edilmektedir.

Li *et al.* (2020) alkalaz ve papain enzimlerini (enzim:substrat, %0,25 w/w) kullanarak domuz hemoglobininin ürettikleri protein hidrolizatlarının hidroliz derecelerini sırasıyla %16,88 ve %12,98, domuz etinden ürettikleri protein hidrolizatlarının hidroliz derecelerini ise sırasıyla %15,76 ve %12,85 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar, etin yapısının kompleks oluşunun ve bağ doku proteinlerinin proteazların substrata erişebilirliğini engelleyebilme olasılığı nedeniyle ortamda hidrolize olmayan bileşenlerin kalabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca alkalaz enzimi kullanılarak üretilen hidrolizatların daha yüksek hidroliz derecesine sahip olmasında alkalaz enziminin güçlü bir hidroliz kabiliyetinin ve geniş parçalama özgülüğünün etkili olduğunu vurgulamışlardır.

Protein verimi

Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının protein verimleri %41,34 ile 55,57 arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının protein verimlerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 8’de verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12)

değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının protein verimi üzerine çok önemli etkisinin olduğu ($p<0,01$) belirlenmiştir.

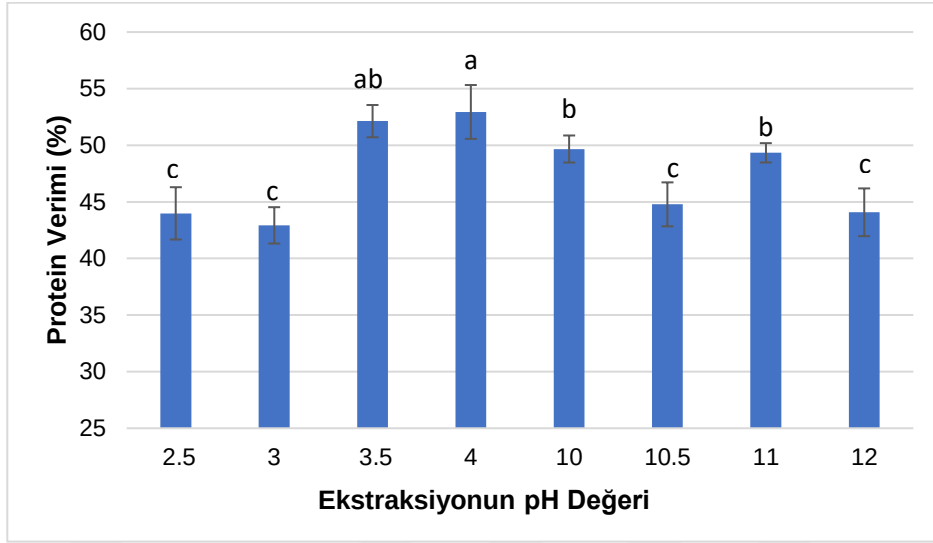
Tablo 8. Et tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Protein Verimlerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
Protein Verimi	pH	7	47,787	14,717**
	Hata	16	3,247	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: $p<0,01$

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının protein verimlerine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 17’de verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının protein verimlerinin ortalama $42,93\pm1,61$ ile $52,94\pm2,38$ arasında değiştiği ve pH 4 değerinde yapılan ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının protein verimlerinin, 2,5, 3, 10, 10,5, 11 ve 12 pH değerlerinde yapılan ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının protein verimlerine kıyasla yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, pH 3,5 değerinde yapılan ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının protein verimi değerinin, pH 4, 10 ve 11 değerlerinde yapılan ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının protein verimi değerlerine benzer olduğu tespit edilmiştir. Protein içeriği sonuçlarıyla benzer şekilde bu sonucun da diğer moleküllerle etkileşimlerin protein çözünürlüğünü ve ekstrakte edilebilirliğini etkilemesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu sonuç, kompleks biyolojik materyallerden protein ekstraksiyonunun karmaşıklığını vurgulamakta ve yalnızca basit pH etkilerinin ötesinde, birden fazla faktörün (özellikle hammadde kompozisyonu ve ekstraksiyon işlemi sırasında farklı bileşenler arasındaki etkileşimler) önemini ortaya koymaktadır. Nitekim, Surasani *et al.* (2018) protein verimindeki değişikliklerin hammadde bileşimi, santrifüj işleminde meydana gelen pellet miktarı, proteinlerin çözünürlüğü ve ekstraksiyon şartlarından kaynaklanabileceğini rapor etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, asidik veya alkali pH değerlerinde görülen protein verimindeki farklılıkları; 1) proteinlerin çözünürken denatüre olması ve buna bağlı olarak hidrofobik etkileşimlerin artması neticesinde proteinlerin kümelenmesi, 2) asidik veya alkali pH değerlerinde proteinlerin farklı seviyelerde denatüre olması ve farklı katlanma derecelerinin ortaya çıkması neticesinde proteinlerde daha fazla hidrofobik alanın meydana gelmesi ve daha güçlü ve fazla sayıda protein-protein etkileşimleriyle daha fazla miktarda proteinin çökmesi ve

3) homojenattaki yağ miktarının içeriğine bağlı olarak protein-yağ etkileşimi neticesinde protein veriminin azalması ile açıklamışlardır.



Şekil 17. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının protein verimlerine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Jafarpour *et al.* (2020) morina balığının iskeletinden enzim:substrat oranı %1,5 olacak şekilde alkalaz, nötraz ve her iki enzimi birlikte kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının protein verimlerini sırasıyla %13,23, %9,82 ve %11,98 olarak belirlemişler ve protein verimi değerleri arasındaki farklılığın substrat bileşimindeki farklılıklar ve enzim aktivitesiyle ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Pires *et al.* (2012) balık yan ürünlerinden homojenize edilen ürünün direkt hidrolize alınması, pH 11 değerinde çözündürülmüş proteinlerin hidrolize alınması ve alkali destekli pH değiştirme işlemiyle kazanılan proteinlerin hidrolize alınması olmak üzere 3 farklı yöntemle ürettikleri protein hidrolizatlarının protein verimlerini sırasıyla %70,5, %71,9 ve %46 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar 3. yöntemle üretilen protein hidrolizatların düşük protein veriminin, protein geri kazanımında izoelektrik çöktürme sonrasında alkali çözündürme yöntemi kullanımına bağlı olarak proteinlerdeki kayıplarla ilişkilendirmişlerdir. Diğer taraftan, araştırmacılar, yüksek protein veriminin ise proteinlerin enzime daha iyi oranda erişilebilirliğiyle ilgili olabileceğini bildirmişlerdir. Protein verimi, Bhaskar *et al.* (2007) tarafından yapılan çalışmada kısmen yağı alınmış koyun iç organlarından elde edilen protein hidrolizatlarında %64,60, Rossi *et al.* (2009) tarafından yapılan çalışmada mekanik olarak ayrılmış kümes hayvanları etlerinden alkalaz enzimi kullanarak üretilen protein hidrolizatlarında %89, Umayaparvathi *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada istiridyeden üretilen protein hidrolizatlarında %67 ve Bui *et al.* (2021) tarafından yapılan çalışmada ton balığının siyah kasından protamex enzimi kullanarak üretilen protein hidrolizatlarında ise %74,7 olarak belirlenmiştir.

Webster *et al.* (1982) ısıtma işlemi görmemiş akciğer, ısıtma işlemi görmüş akciğer, işkembe ve kısmen yağı uzaklaştırılmış dokulardan ürettikleri protein hidrolizatlarının protein verimlerini sırasıyla %86, %58, %68 ve %63 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar, yüksek protein verimlerinin materyallerinde doğal olarak bulunan suda çözünür proteinler ile ilgili olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, ısıtma işlemi görmüş akciğer örneklerinin, ısıtma işlemi görmemiş akciğer örneklerine kıyasla daha düşük protein verimine sahip olması durumunda ise, ısıtma işlemi sırasında protein-yağ etkileşimlerinin ve buna bağlı olarak hidroliz ve santrifüj işlemlerinde yağın uzaklaşmasındaki zorluğun etkili olabileceğini rapor etmişlerdir.

Selmane *et al.* (2008) ise yaptıkları çalışmada, domuz akciğeri, sığır akciğeri ve tavuk kafalarından mekanik olarak kemiği ayrılmış tavuk etinden farklı pH değerlerinde protein ekstraksiyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada, protein konsantrasyonu üzerine pH değerinin çok önemli role sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, kullandıkları yan ürünlerin ana protein fraksiyonlarının izoelektrik noktalarının asidik pH aralığında ve 6'dan düşük olduğunu ifade etmişlerdir. Domuz eti ve sığır akciğeri örneklerinin ekstraksiyon verimleri arasındaki farkın sığır akciğerlerinin nispeten daha yoğun kolajen ağına sahip olmasına bağlı olarak dokulardan bazı proteinlerin çözünmesini engellemesiyle ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Nisov *et al.* (2022) ise ringa balığı ve hamam böceğinden pH değiştirme metodu kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarında protein verimi üzerine pH değerinin ve hammaddenin bir etkisinin olmadığını, asıl etkenin üretim esnasında uygulanan ön işlemlerin olduğunu belirtmişlerdir. Öte yandan, Pezeshk *et al.* (2021) farklı pH değerlerine ayarlanarak üretilen protein izolatlarında pH değerinin artırılmasının aslında proteinlerin elektrostatik yüklerini artırarak su ile etkileşimine olumlu katkı sağladığını ve böylece protein veriminin de paralel bir şekilde arttığını rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, protein veriminin, asidik pH değerlerinde (Shabanpour *et al.* 2015a; Surasani *et al.* 2017) veya alkali pH değerlerinde (Batista *et al.* 2007; Shabanpour *et al.* 2015b; Tian *et al.* 2017) arttığını gösteren çalışmalar da literatürde bulunmaktadır. Aradaki bu farklılıkların hammadde ve uygulanan işlem prosedürlerinden kaynaklandığı düşünölmektedir.

Toplam SH içeriği

Yüksek sülfidril içeriği, düşük protein oksidasyonunun bir göstergesi olarak kabul edildiğinden protein hidrolizatlarında hidroliz işleminde meydana gelen yapısal değişiklikleri detaylı olarak incelemek için SH gruplarının belirlenmesi oldukça önemlidir (Filippo *et al.* 2024). Myofibriler proteinler yüksek oranda SH grubu içermekte ve myofibriler proteinlerin içeriğinde yer alan SH grupları, üretim ve depolama işlemleri esnasında çevresel faktörlere

bağlı olarak hızlı bir şekilde disülfid gruplarına okside olmaktadır. Bununla birlikte, bu oksidasyon reaksiyonu, protein molekülleri arasında çapraz bağlanma ve dolayısıyla toplam SH içeriğinde azalmalara neden olmaktadır (Chantarasuwan *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2018). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının toplam SH içerikleri 44,21 ile 80,05 $\mu\text{mol/g}$ arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının toplam SH içeriklerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 9’da verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının toplam SH içeriği üzerine önemli etkisinin olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir.

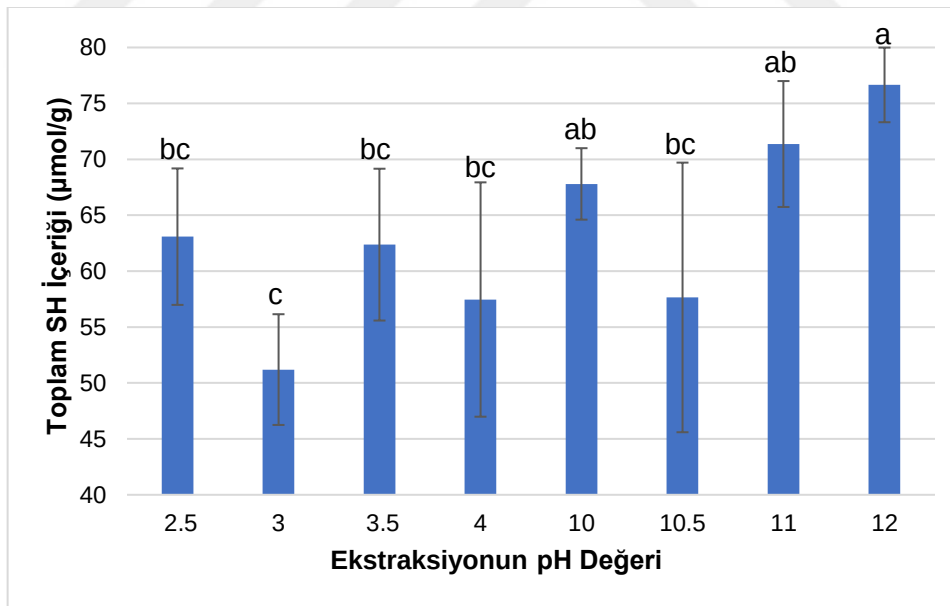
Tablo 9. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Toplam SH İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
Toplam SH İçeriği	pH	7	204,381	3,931*
	Hata	16	51,998	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, *: $p<0,05$

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının toplam SH içeriğine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 18’de verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının toplam SH içeriğinin ortalama $51,20\pm4,95$ ile $76,65\pm3,34$ $\mu\text{mol/g}$ arasında değiştiği belirlenmiştir. Farklı pH değerlerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının toplam SH içeriklerinin, ekstraksiyonda kullanılan pH değerine bağlı olarak istatistiksel olarak üç seviyede dağıldığı gözlenmiştir. pH 12, 11 ve 10 değerlerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının yüksek toplam SH içeriğine sahip olduğu, pH 3 değerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının düşük toplam SH içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. pH 2,5, 3,5, 4 ve 10,5 değerlerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının ise orta düzeyde toplam SH içerisine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda, genellikle alkali pH koşullarında yapılan protein ekstraksiyonunun, daha yüksek toplam SH içeriğine neden olduğu belirlenmiştir. Asidik pH değerlerindeki protein ekstraksiyonu işlemine kıyasla, alkali pH değerlerindeki ekstraksiyon işleminde daha yüksek toplam SH içeriğinin alkali pH değerlerinde proteinlerin yapılarının açılarak dahili SH gruplarının daha yüksek oranda açığa

çıkmasıyla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Bu olayın, asidik pH değerlerinde daha az veya kısmi gerçekleştiği düşünülmektedir. Gao *et al.* (2020) bezelye unundan alkali pH değerlerinde (8,5, 9 ve 9,5) yapılan protein ekstraksiyonu işleminin proteinlerin açılmasına neden olduğunu ve ekstraksiyon pH değerinin artmasıyla bezelye protein izolatının toplam SH içeriğinin arttığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda, yüksek pH (12) değerinde ekstrakte edilen bezelye protein izolatının toplam SH içeriğinin önemli seviyede yükseldiği Jiang *et al.* (2017) tarafından da bildirilmiştir. Hidroliz işlemi sırasında proteinlerin daha küçük peptitlere ve amino asitlere parçalanması ile daha fazla SH grubunun açığa çıkabildiği bildirilmektedir (Filippo *et al.* 2024). Aynı zamanda mevcut araştırma sonuçlarında, farklı pH koşullarında farklı peptit kompozisyonu ve konsantrasyonu elde edilmesine bağlı olarak toplam SH içeriğinin de değişkenlik gösterdiği düşünülmektedir. Aslında, toplam SH içeriği yalnızca bu grupların varlığının bir ölçüsü değil, aynı zamanda onların ortaya çıkmasının da bir ölçüsüdür. Dolayısıyla, protein hidrolizatlarının toplam SH içeriği; hammaddenin protein kompozisyonu, protein ekstraksiyonunda kullanılan pH koşulları, ekstrakt ortamında bulunan diğer iyonlar, hidroliz işleminin koşulları ve üretim esnasında meydana gelen reaksiyonlar (SH oksidasyonu ve SH/SS değişim reaksiyonları) gibi çeşitli faktörlerle ilişkilendirilmektedir (Jiang *et al.* 2009; Jiang *et al.* 2017; Gao *et al.* 2020; Guo *et al.* 2022; Yao *et al.* 2023; Filippo *et al.* 2024).



Şekil 18. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının protein toplam SH içeriğine (μmol/g) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Nikoo *et al.* (2021) Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yan ürünlerinden (iç organlar, yüzgeç, deri, kafa ve iskelet) kademeli olarak artan (40 – 60°C) ve sabit sıcaklıklarda (40, 50 ve 60°C) 1, 2 ve 3 saat boyunca otoliz işlemi uygulayarak üretmiş oldukları protein hidrolizatlarında toplam SH içeriklerinin 1,2 – 3,1 μmol/g hidrolizat aralığında değiştiğini tespit

etmişler ve protein hidrolizatlarında toplam SH içeriklerindeki farklılıklarda otoliz işlemi esnasında uygulanan sıcaklığın ve sürenin etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Zhang *et al.* (2022b) papain, alkalaz ve flavorzyme enzimlerini kullanarak gümüş sazan balığı (*Hypophthalmichthys molitrix*) derisinden ürettikleri jelatin hidrolizatlarının toplam SH içeriğinin 2 – 8 mol/10⁶ g arasında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Filippo *et al.* (2024) alkalaz enzimi kullanarak üretmiş oldukları peyniraltı suyu protein hidrolizatlarında serbest SH gruplarının miktarını 18 µM/g olarak belirlemişler ve hidroliz derecesinin artmasıyla peptit bağlarının parçalanması ve protein kalıntılarının ortaya çıkmasına bağlı olarak SH gruplarının artabileceğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan, açığa çıkan SH gruplarının okside olmasıyla veya peptitlerin içindeki ve arasındaki SH gruplarının hidrolizle yeniden bir araya gelmesiyle SH gruplarının azalabileceğini rapor etmişlerdir.

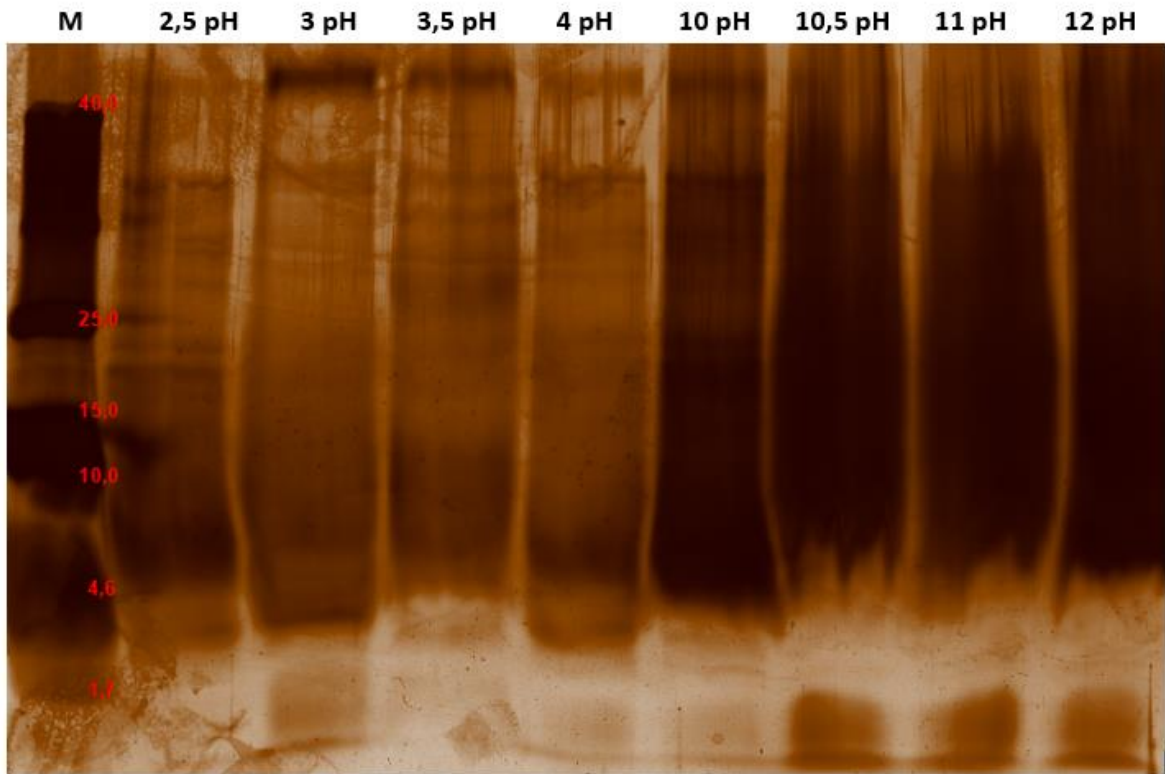
Chiang *et al.* (2019) sığır kemiği ekstraktlarından protamex, bromelain ve flavorzyme enzimlerini kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarında, ekstraktlara kıyasla SH içeriğindeki azalmada, enzimatik hidroliz işleminin etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca enzimatik hidrolizde kullanılan proteazların, bağlı ve serbest SH gruplarını açığa çıkararak peptitlerin veya proteinlerin yapılarının açılması neticesinde sülfidril–disülfid bağ değişimine yol açtığını rapor etmişlerdir.

Wachirattanapongmetee *et al.* (2024) Tilapia yan ürünlerinden elde ettikleri sarkoplazmik ve myofibriler proteinlere ilaveten alkali destekli protein ekstraktlarının toplam SH içeriğinin sırasıyla 4,80, 6,41 ve 7,53 mol·10⁻⁵ g protein olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar alkali destekli protein ekstraktlarında pH 11’de uygulanan ekstraksiyon işleminin SH gruplarının oksidasyonu için elverişli olduğunu ve pH değiştirme yönteminin kısmen açılan disülfid bağlarının oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir.

SDS-PAGE profili

Protein hidrolizatlarının protein profilinin ve moleküler ağırlık dağılımının değerlendirilmesinde SDS-PAGE tekniği sıklıkla tercih edilmektedir (Ocak 2021; Fencioğlu *et al.* 2022). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının SDS-PAGE profilleri Şekil 19’da verilmiştir. Elektroforetogramdan da görüldüğü üzere, farklı pH değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonu, protein hidrolizatlarında farklı protein profillerinin ortaya çıkmasına ve benzer bantların bant yoğunluklarında çeşitli varyasyonların gözlenmesine neden olmuştur. Genel olarak asidik pH ekstraksiyonunun, molekül ağırlığı 40 – 1,7 kDa aralığında değişen geniş bir bant profili sergilediği (34,1, 31,5, 29, 25,4, 22,3, 19,3, 12,8, 6,5,

5,5, 3,7, 2,9, 2,2, 1,7 kDa) gözlenmiştir. Asidik ekstraktlar arasında en yüksek ve en düşük bant profil sayılarının sırasıyla 2,5 ve 3 pH değerleri ile ekstrakte edilen proteinlerin hidrolizi neticesinde elde edilen hidrolizatlara ait olduğu belirlenmiştir. Asidik ekstrakt grupları arasında hakim bantların molekül ağırlığının 5,5 – 6,5 kDa arasında olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 3 ve 4 pH değeri ile ekstrakte edilen örneklerden elde edilen protein hidrolizatlarında molekül ağırlığı 1,7 kDa'dan düşük olan 2 adet protein bandı olduğu da gözlenmiştir. Asidik ekstraksiyonun aksine alkali ekstraksiyonla elde edilen proteinlerin hidrolizi neticesinde oluşan hidrolizatlarda daha az sayıda bant fragmentasyonu gözlenmiştir. Bu gruba ait örneklerin yüksek molekül ağırlıklı bant profilinin oldukça zayıf olduğu, düşük molekül ağırlıklı (6,9, 5,7, 4,9 kDa) proteinlerde ise bant yoğunluğunun yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, tüm alkali ekstraksiyon gruplarında molekül ağırlığı 1,7 kDa'dan düşük olan 2 adet protein bandı olduğu ve bu bantların bant yoğunluklarının 10,5, 11 ve 12 pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin hidrolizi ile elde edilen örneklerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Álvarez *et al.* (2018) asidik ve alkali protein ekstraksiyonunda, 1 – 5 kDa molekül ağırlığı aralığında bazı kısa peptitlerin tespit edildiğini ve alkali pH değerlerinde bu peptitlerin asidik pH değerlerine kıyasla daha yüksek oranda bulunduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 19. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının SDS-PAGE profili

Daud *et al.* (2015) balık etinden alkalaz enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının SDS-PAGE profilinde, karışık molekül ağırlığına sahip ve jel üzerinde leke

görünümlü bantların oluşmasını alkalaz enziminin büyük yük içermeyen kalıntılar üzerinde geniş bir spesifikliğe sahip olmasıyla ilişkilendirmişlerdir. Jang and Lee (2005) ise sarkoplazmik protein ekstraktlarından farklı enzimler kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarında %12 akrilamid jelde düşük molekül ağırlıklı proteinlerin görünemediğini, bu durumun farklı hidroliz derecesine bağlı çok çeşitli ürünlerin oluşumundan kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Protein Hidrolizatlarının Fonksiyonel Özelliklerine Ait Analiz Sonuçları

Antioksidan aktivitesi

Gıdaların antioksidan aktivitelerini belirlemek için kullanılan yöntemlerin başında DPPH ve ABTS radikal süpürme aktivitesi analizleri gelmektedir. Antioksidan aktivitenin belirlenmesinde DPPH ve ABTS gibi radikallerin süpürülmesi esasına dayanan yöntemler, kromojen radikallerin antioksidan bileşiklerle doğrudan reaksiyona girebilmesine ilaveten hassas, hızlı, basit ve tekrarlanabilir olmaları nedeniyle sıklıkla tercih edilen popüler yöntemler arasında yer almaktadır. DPPH radikalinden daha reaktif olan ABTS radikali hem hidrofilik hem de lipofilik bileşikler için geçerli bir analiz yöntemidir. Ayrıca DPPH radikalinin reaksiyonu hidrojen atomu transferine dayanırken, ABTS radikalinin reaksiyonları hem hidrojen atomu transferi hem de tek elektron transferini kapsamaktadır (Gulcin 2020; Gulcin and Alwasel 2023). Bu nedenle, mevcut araştırmada üretilen protein hidrolizatlarının antioksidan aktiviteleri hem DPPH hem de ABTS radikal giderme aktivite analizleri ile incelenmiş ve antioksidan aktivite analiz sonuçları, radikallerin %50'sinin inhibe edildiği konsantrasyonu ifade eden IC₅₀ değeri olarak verilmiştir.

DPPH radikal giderme aktivitesi

DPPH yönteminin esası; spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda stabil olan DPPH radikalinin, proton verme kabiliyetine sahip bir antioksidan molekülü ile reaksiyona girmesi neticesinde radikalın giderilmesi ve okunan absorbans değerindeki azalmanın ölçülmesine dayanmakta ve absorbanstaki ölçülen azalma, radikal giderme aktivitesinin bir ölçütü olarak nitelendirilmektedir (Ktari *et al.* 2013). Enzimatik hidrolize tabi tutulan proteinlerde, zincirin açılmasına bağlı olarak hidrofobikliğin ortaya çıkması ve inaktif haldeki R gruplarının serbest hale geçmesi suretiyle antioksidan aktiviteye sahip ürünlerin elde edildiği belirtilmektedir (Liu *et al.* 2016). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının IC₅₀ olarak sunulan DPPH radikal giderme aktivite değerleri 3,89 ile 25,34 mg/mL arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin

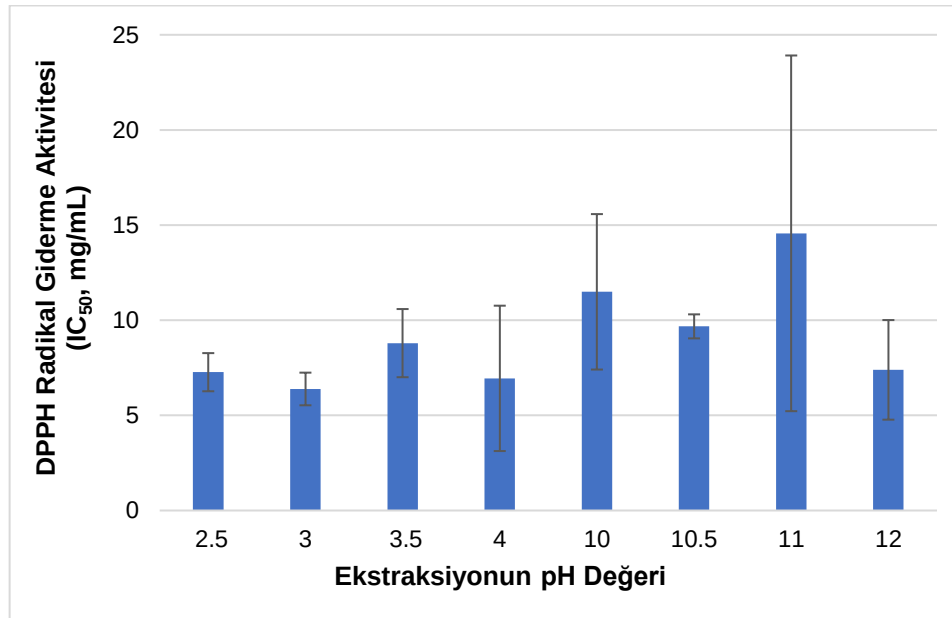
enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının DPPH radikal giderme aktivitelerine (IC_{50}) ait varyans analiz sonuçları Tablo 10’da verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının DPPH radikal giderme aktivitesi (IC_{50}) üzerine önemli etkisinin olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

Tablo 10. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının DPPH Radikal Giderme Aktivitesine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
DPPH Radikal Giderme Aktivitesi	pH	7	23,277	1,423
	Hata	16	16,354	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının DPPH radikal giderme aktivitesine (IC_{50}) ait ortalama sonuçlar Şekil 20’de verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının DPPH radikal giderme aktivitesi IC_{50} değerinin ortalama $6,39\pm0,86$ ile $14,57\pm9,34$ mg/mL arasında değiştiği ve örneklerin DPPH radikal giderme aktivitesi IC_{50} değerleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 20. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının DPPH radikal giderme aktivitesine (IC_{50}) ait ortalama sonuçlar ($\bar{x} \pm SD$)

Saeed *et al.* (2020) farklı hidroliz sürelerinde enzimatik hidrolizle karaciğer, böbrek ve kalpten ürettikleri protein hidrolizatlarının DPPH inhibisyonlarını sırasıyla %50,76 – 80,45,

%20,72 – 31,81 ve %10,55 – 27,23 olarak saptamışlardır. Araştırmacılar belirledikleri antioksidan aktiviteyi; düşük moleköl ağırlığına sahip peptitlerin oluşumu ile ilişkilendirmişler ve antioksidan aktivite üzerinde hidroliz süresi, enzim ve hidrolizatların konsantrasyonunun etkili olduğunu rapor etmişlerdir.

Jiang *et al.* (2014) tarafından yapılan çalışmada, 5 farklı enzim ile üretilen ve ultrafiltrasyon (<5 kDa) işlemine tabi tutulan protein hidrolizatları arasında, alkalaz enzimi kullanılarak üretilen örneklerin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve elde edilen fraksiyonlarda ise 0,3 – 1,2 kDa moleköl ağırlığına sahip peptitlerin en güçlü antioksidan aktiviteyi sergilediği saptanmıştır. Öte yandan, koyun ve kuzu kesim atıkları ve kırpıntılarından alkalaz enzimi kullanılarak üretilen protein hidrolizatlarının en yüksek DPPH inhibisyonunun %4,65 olduğu belirlenmiştir (Vidal *et al.* 2022). Araştırmacılar, bu duruma proteinlerin kontrolsüz ve uzun süre hidroliz edilmeleri sonucu (55°C’de 2 saat) fonksiyonelliğini kaybetmiş peptitler veya inaktif serbest amino asitlerin oluşmasının neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Antioksidan aktiviteye sahip peptitlerin hidrofobik özelliği, erişilebilirlik açısından önem arz etmekte olup peptit diziliminde histidin, tirozin, triptofan, metiyonin, lisin ve sistein gibi amino asitlerin bulunmasının daha yüksek antioksidan aktiviteye neden olduğu bildirilmektedir (Islam *et al.* 2022). Bu sonuca; amino asitlerin yapısal özelliklerinin (örneğin; tirozinin içerdiği fenolik gruplar vasıtasıyla hidrojen donörleri olarak etki etmesinin; histidinin içerdiği imidazol grubundan proton verme yeteneğine bağlı olarak antioksidan aktiviteye katkı sağlamasının) etki ettiği belirtilmektedir. Ayrıca enzimatik hidrolizde enzimin inaktivasyonunda nispeten yüksek sıcaklıklara ulaşılmasının peptitlerin ve protein hidrolizatlarının yapısında deformasyonlara yol açarak antioksidan aktivitede kayıplara neden olduğu da rapor edilmiştir (Nikoo *et al.* 2023).

ABTS radikal giderme aktivitesi

ABTS, oksidanlar vasıtasıyla koyu renkli radikal katyon formuna (ABTS⁺) okside olmakta ve antioksidan kapasite; bileşiklerin elektron transfer etme veya hidrojen donörü olma yetenekleri nedeniyle ABTS radikali ile reaksiyonu sonucu mevcut koyu rengi azaltma gücünün esas alınmasıyla değerlendirilmektedir (Gulcin 2020). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının IC₅₀ olarak sunulan ABTS radikal giderme aktiviteleri 18,69 ile 32,24 µg/mL arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ABTS radikal giderme aktivitelerine (IC₅₀) ait varyans analiz sonuçları Tablo

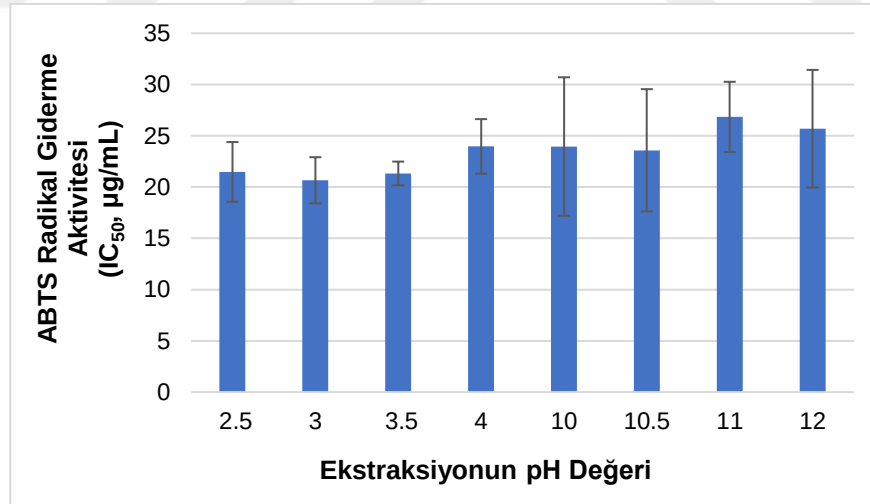
11’de verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının ABTS radikal giderme aktivitesi (IC_{50}) üzerine önemli etkisinin olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

Tablo 11. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının ABTS Radikal Giderme Aktivitelerine (IC_{50}) Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
ABTS Radikal Giderme Aktivitesi	pH	7	14,236	0,771
	Hata	16	18,470	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ABTS radikal giderme aktivitesine (IC_{50}) ait ortalama sonuçlar Şekil 21’de verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının ABTS radikal giderme aktivitesi IC_{50} değerinin $20,66\pm2,25$ ile $26,84\pm3,43$ $\mu\text{g/mL}$ arasında değiştiği ve örneklerin ABTS radikal giderme aktivitesi IC_{50} değerleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 21. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ABTS radikal giderme aktivitesine (IC_{50} , $\mu\text{g/mL}$) ait ortalama sonuçlar ($\bar{x} \pm SD$)

Tkaczewska *et al.* (2020) pH, sıcaklık ve enzim:substrat oranı gibi enzimatik hidroliz şartları, substrat özellikleri ve hidroliz süresi gibi parametrelere bağlı olarak antioksidan peptitlerin salınımının değişebileceğini bildirmişlerdir. Chi *et al.* (2014) ise düşük molekül ağırlığına sahip kütlelerin aktif ve kısa zincirli peptitleri içermesiyle bağlantılı olarak serbest radikallerle reaksiyona girerek stabil bileşikler oluşturmak, elektron donörü olmak ve

oksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırabilmek gibi önemli kabiliyetlere sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Borges *et al.* (2022) domuz kemik kalıntıları ve et tıraşlama atıklarından alkalaz enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının ABTS değerini 21,1 mg askorbik asit eşdeğeri/g kuru ekstrakt olarak belirlemişlerdir. Lima *et al.* (2021) ise *Scomberomorus brasiliensis* kesim yan ürünlerinden alkalaz, flavorzyme, brauzyn ve corolase 7089 enzimleri kullanarak ürettikleri farklı hidroliz derecesine sahip protein hidrolizatlarının ABTS değerlerini; düşük hidroliz derecesi için 1358,19 $\mu\text{mol TE/g}$ örnek olarak, yüksek hidroliz derecesi için ise 751,21 $\mu\text{mol TE/g}$ örnek olarak saptamışlardır. Bir diğer çalışmada, çipura balığının iskelet-kırpıntı yan ürünlerinden alkalaz enzimi kullanılarak üretilen protein hidrolizatlarının ABTS değeri 15,09 $\mu\text{g BHT/mL}$ olarak, levrek balığının iskelet-kırpıntı yan ürünlerinden alkalaz enzimi kullanılarak üretilen protein hidrolizatlarının ise ABTS değeri 14,46 $\mu\text{g BHT/mL}$ olarak saptanmıştır (Valcarcel *et al.* 2020).

Köpürme özelliği (köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesi)

Protein hidrolizatlarının sahip olduğu fonksiyonel özellikler arasında yer alan köpürme kapasitesi veya köpürme stabilitesi, temelde proteinlerin yüzey gerilimini azaltma ve hava-su yüzeyinde sekonder ve tersiyer yapılarının film oluşturma kabiliyeti olarak ifade edilmekte olup, oluşan köpüğün stabilitesi moleküller arası ağdaki protein-protein etkileşimlerinin uzaması sonucu sağlanmaktadır (Hettiarachchy *et al.* 2012; Alves *et al.* 2021). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasiteleri %18,18 ile 145,00 arasında değişirken 30. dk ve 60. dk'daki köpürme stabilitesi ise sırasıyla %12,00 ile 117,39 ve %4,35 ile 85,71 arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasiteleri ve köpürme stabilitelere ait varyans analiz sonuçları Tablo 12'de sunulmuştur. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının köpürme kapasiteleri ve köpürme stabilitesi (30 ve 60 dk'da) üzerine çok önemli ($p<0,01$) etkisinin olduğu belirlenirken, analiz esnasında uygulanan pH değerinin (2, 4, 6, 8 ve 10) ise protein hidrolizatlarının köpürme kapasiteleri ve köpürme stabilitesi (30 ve 60 dk'da) üzerine önemli etkisinin olmadığı ($p>0,05$) tespit edilmiştir. Aynı zamanda, Ekstraksiyonun pH değeri $\times$ Analizin pH değeri interaksiyonunun protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesi ve 60. dk'daki köpürme stabilitesi üzerine önemli etkisinin olmadığı

($p>0,05$), ancak protein hidrolizatlarının 30. dk'daki köpürme stabilitesi üzerine önemli ($p<0,05$) etkisinin olduğu belirlenmiştir.

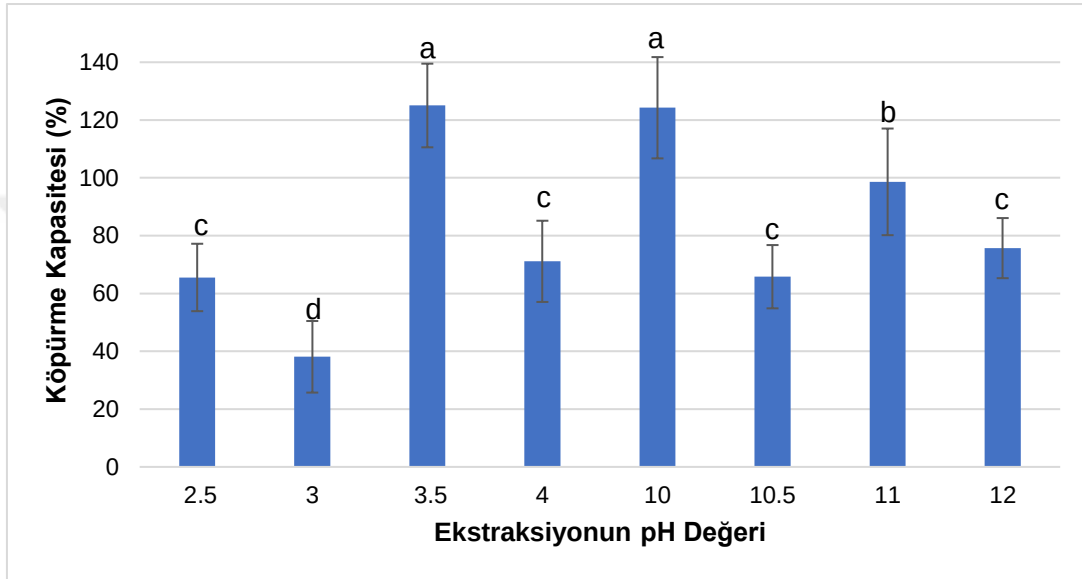
Tablo 12. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Köpürme Kapasiteleri ve Köpürme Stabilitelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

			Varyans Kaynakları		
			SD	KO	F
Köpürme Özelliği	Ekstraksiyonun pH Değeri (E)	Köpürme Kapasitesi	7	13982,950	72,109**
		30. dk'da Köpürme Stabilitesi	7	5909,712	32,809**
		60. dk'da Köpürme Stabilitesi	7	3512,100	25,910**
	Analizin pH değeri (A)	Köpürme Kapasitesi	4	303,804	1,567
		30. dk'da Köpürme Stabilitesi	4	309,939	1,721
		60. dk'da Köpürme Stabilitesi	4	231,203	1,706
	E × A	Köpürme Kapasitesi	28	188,193	0,970
		30. dk'da Köpürme Stabilitesi	28	297,222	1,650*
		60. dk'da Köpürme Stabilitesi	28	145,216	1,071
	Hata	Köpürme Kapasitesi	80	193,914	
		30. dk'da Köpürme Stabilitesi	80	180,125	
		60. dk'da Köpürme Stabilitesi	80	135,550	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: $p<0,01$; *: $p<0,05$

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasitelerine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 22'de verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesinin ortalama $38,09 \pm 12,38$ ile $125,04 \pm 14,47$ arasında değiştiği ve 3,5 ve 10 pH değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasitelerinin en yüksek, 3 pH değerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesinin ise en düşük olduğu belirlenmiştir. Farklı pH değerlerinde yapılan ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesinde görülen varyasyonun, pH değerinin proteinlerde yol açtığı yapısal değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu husus, pH 3,5 ve 10 değerlerinde yapılan ekstraksiyon işlemiyle protein hidrolizatlarında hidrofobik

bölgelerin açığa çıkmasının bir sonucu olarak bu bölgelerin hava-su arayüzlerini stabilize etmesi ve hidrolizatların köpük oluşturma kapasitesini arttırmasıyla ilişkilendirilebilmektedir. Öte yandan, pH 3 koşullarında yapılan ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatında, proteinlerin katlanması veya kümelenmiş olarak bulunması nedeniyle hidrolizatın köpürme kapasitesinde azalma görüldüğü düşünülmektedir. Bununla birlikte, hidroliz işlemi, ekstrakte edilen proteinlerin parçalanmasını sağlayarak daha küçük ve çözünür protein parçalarının oluşumuyla köpürme kapasitesini artırabildiği, ancak etkinliğinin ekstraksiyon sırasındaki pH koşullarıyla değişebildiği düşünülmektedir.



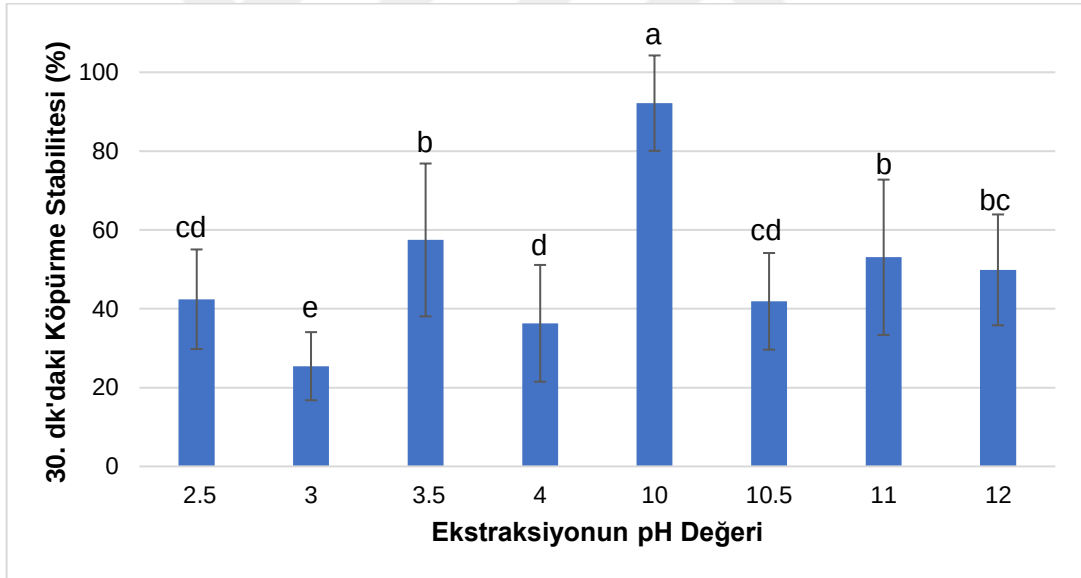
Şekil 22. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesine (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Chalamaiah *et al.* (2015) hava-su yüzeyinde hızlı bir transfer, yeniden düzenlenme ve ara yüzeyde açılma gibi özelliklerin yanı sıra protein hidrolizatlarında molekül ağırlığı yüksek peptitlerin bulunmasının hava kabarcıkları etrafında esnek bir film oluşumu ve dolayısıyla daha stabil ve yüksek köpürme kapasitesine neden olacağını bildirmişlerdir.

Schmidt *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışmada, mekanik olarak ayrılmış tavuk etinden elde edilen kolajenden alkalaz ve flavorzyme enzimleri kullanılarak protein hidrolizatı üretimi gerçekleştirilmiştir. Araştırmada kolajenin köpürme kapasitesinin (%22,87), alkalaz (%3,75) ve flavorzyme (%4,38) enzimleri ile üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesinden daha yüksek olduğu tespit edilmiş ve bu durum, kolajende bulunan daha yüksek molekül ağırlıklı peptitlerin varlığına bağlı olarak hava kabarcıkları etrafında stabil bir film oluşturabilme yeteneklerinin daha güçlü olmasıyla ilişkilendirilmiştir.

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının 30. dk'daki köpürme stabilitesine ait Duncan

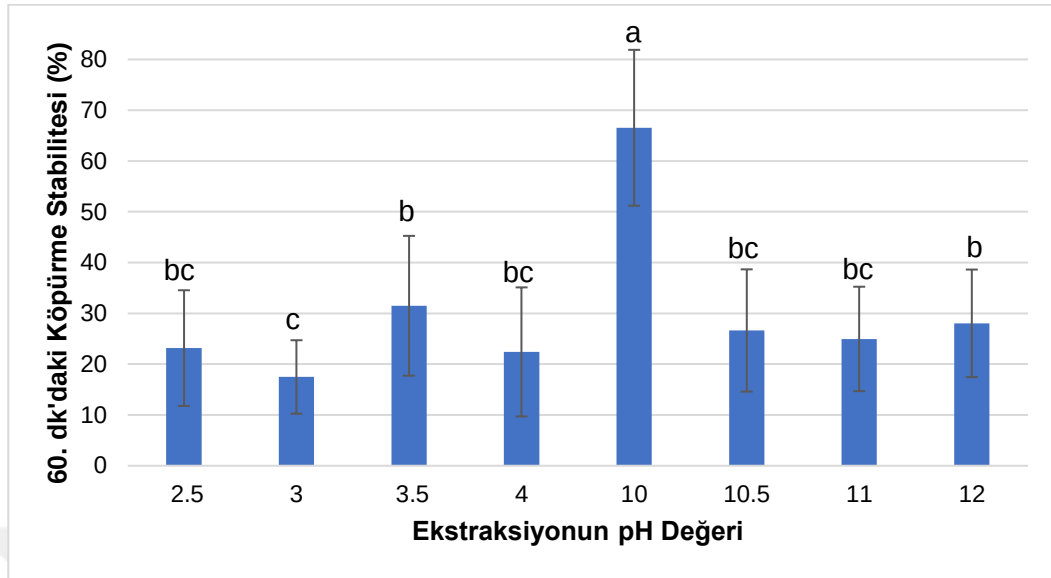
Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 23'te verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının 30. dk'daki köpürme stabilitesinin ortalama $25,43 \pm 8,64$ ile $92,17 \pm 12,10$ arasında değiştiği ve 10 pH değerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının 30. dk'daki köpürme stabilitesinin en yüksek, 3 pH değerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının 30. dk köpürme stabilitesinin ise en düşük olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesiyle benzer şekilde, genellikle alkali pH koşullarında yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının 30. dk'daki köpük stabilitesinin, asidik koşullara kıyasla daha yüksek değere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu hususun, muhtemelen asidik pH koşullarında elde edilen proteinlerin, su/hava arayüzünde kabarcıklar oluşturacak şekilde yayılma yeteneğini sınırlayan agregasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde, Pezeshk *et al.* (2021), gökkuşağı alabalığı yan ürünlerinden izole edilen proteinlerin köpürme kapasitesi ve köpürme stabilitesinin ekstraksiyonun pH değerine bağlı olduğunu ve asidik pH değerlerinde izole edilen proteinlerin, alkali koşullarda izole edilen proteinlere göre önemli ölçüde daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 23. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının 30 dk'da köpürme stabilitesine (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının 60. dk'daki köpürme stabilitesine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 24'te yer almaktadır. Üretilen protein hidrolizatlarının 60. dk'daki köpürme stabilitesinin ortalama $17,48 \pm 7,24$ ile $66,54 \pm 15,35$ arasında değiştiği ve 30. dk'da olduğu gibi 60. dk'daki en yüksek köpürme stabilitesinin de 10 pH değerinde

gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarında olduğu belirlenmiştir.

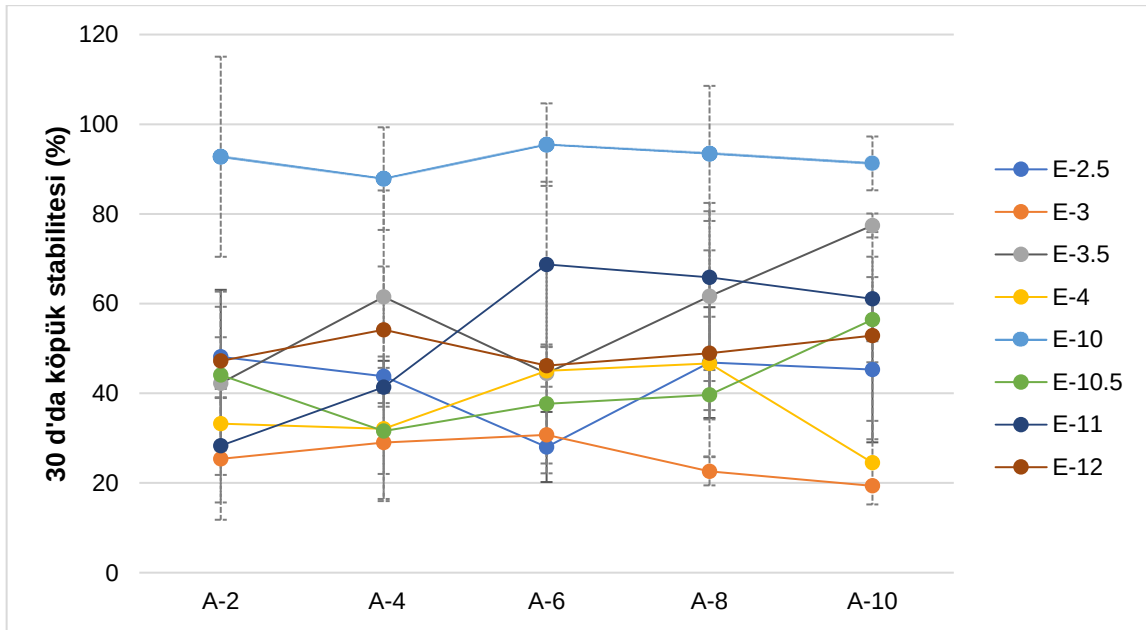


Şekil 24. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının 60 dk'da köpürme stabilitesine (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Fuentes *et al.* (2024) yaptıkları çalışmada, uskumru ve sardalya yan ürünlerinden papain, pepsin ve protamex (%1,5) enzimleri kullanarak protein hidrolizatları üretmişlerdir. Uskumru yan ürünlerinden üretilen protein hidrolizatlarının köpürme kapasitelerini sırasıyla %5, %20 ve %23 olarak tespit ederlerken, köpürme stabilitelelerini ise sırasıyla %3,3, %8,3 ve %10 olarak saptamışlardır. Sardalya yan ürünlerinden üretilen protein hidrolizatlarının ise köpürme kapasitelerini sırasıyla %3,3, %35 ve %5,83 olarak tespit ederlerken, köpürme stabilitelelerini ise sırasıyla %3,3, %3,3 ve %5,83 olarak belirlemişlerdir.

Zamorano-Apodaca *et al.* (2020) yaptıkları çalışmada, farklı balık türlerine ait yan ürünlerin karışımından elde ettikleri kolajenden alkalaz enzimi kullanarak (enzim:substrat, 1:400) farklı molekül ağırlıklarında fraksiyonlama işleminin ardından protein hidrolizatı üretmişlerdir. Araştırmada protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesinin en yüksek >30 kDa molekül ağırlığına sahip hidrolizatlarda (%100) olduğunu ve ≥ 30 kDa, 10 – 30 kDa ve 5 – 10 kDa molekül ağırlıklarında fraksiyonlanan protein hidrolizatlarında ise köpürme kapasitelerinin sırasıyla %78, %52 ve %42 olduğunu bildirmişlerdir. >30 kDa, ≥ 30 kDa, 10 – 30 kDa ve 5 – 10 kDa molekül ağırlıklarına sahip protein hidrolizatlarının 10. dk'daki köpürme stabilitelelerindeki kaybın ise sırasıyla %10, %23, %62 ve %76 olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, köpürmedeki istikrarsızlığı; fraksiyonlamayla meydana gelen düşük molekül ağırlıklı peptitlerin köpükteki hava hücrelerini tutabilme güçlerinin zayıflaması ve protein-protein etkileşimlerinin azalması nedeniyle stabil filmler oluşturamamaları ile açıklamışlardır.

Ekstraksiyonun pH değeri x Analizin pH değeri interaksiyonunun et tıraşlama atıklarından ekstrakte edilen protein hidrolizatlarının 30. dk'daki köpürme stabilitesi üzerine olan etkisi Şekil 25'te verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının 30 dk'daki köpürme stabilitesinin %19,37 ile 95,45 arasında değiştiği ve 10 pH değerinde ekstrakte edilen proteinlerden üretilen protein hidrolizatlarının tüm analiz pH değerinde en yüksek köpürme stabilitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Farklı pH değerlerinde yapılan ekstraksiyon işlemlerinin ardından elde edilen protein hidrolizatlarının 30. dk'daki köpürme stabilitesindeki değişikliklerin, ekstraksiyon pH değerinin proteinlerde yapısal değişimlere yol açması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 25. Ekstraksiyonun pH değeri x analizin pH değeri interaksiyonunun et tıraşlama atıklarından ekstrakte edilen protein hidrolizatlarının 30. dk'daki köpürme stabilitesi üzerine olan etkisi

Emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi

Emülsiyon oluşumu ve stabilizasyonu özellikle et ürünleri, soslar, içecekler, kek hamurları, mayonez, tatlılar ve krema gibi pek çok üründe önem arz etmektedir (Zou *et al.* 2019, Tan *et al.* 2021). Doğal kaynaklardan elde edilmeleri, besin değerlerinin yüksek olması, peptitlerin hidrofobik kalıntı içermeleri, kısa amino asit dizilimlerine sahip olmaları sayesinde küçük emülsiyon damlacıkları oluşturmalarını sağlayan arayüzeylere hızlı adsorpsiyon özellikleri gibi avantajları nedeniyle protein bazlı emülgatörlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Lin *et al.* 2022). Proteinler veya peptitlerde emülsiyon oluşumu, homojenizasyon ile birlikte yeni oluşan yağ damlacıklarının yüzeyine peptitlerin adsorbe olması ve neticede yağ damlacıklarının bir araya gelmesini engelleyen bir membranın meydana gelmesi esasına dayanmaktadır (Klompong *et al.* 2007). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH

değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi indeksleri sırasıyla 8,95 ile 19,42 m²/g ve 22,58 ile 99,43 dk arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi indekslerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 13'te sunulmuştur. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivitesi indeksi üzerine çok önemli (p<0,01) etkisinin olduğu belirlenirken emülsiyon stabilitesi indeksi üzerine ise önemli bir etkisinin olmadığı (p>0,05) tespit edilmiştir. Öte yandan, emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi indekslerinin analizi esnasında uygulanan pH değerlerinin (2, 4, 6, 8 ve 10) protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi indeksleri üzerine çok önemli (p<0,01) etkisinin olduğu belirlenirken emülsiyon stabilite indeksi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı (p>0,05) tespit edilmiştir. Aynı zamanda, Ekstraksiyonun pH değeri × Analizin pH değeri interaksiyonunun emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi indeksleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı (p>0,05) belirlenmiştir.

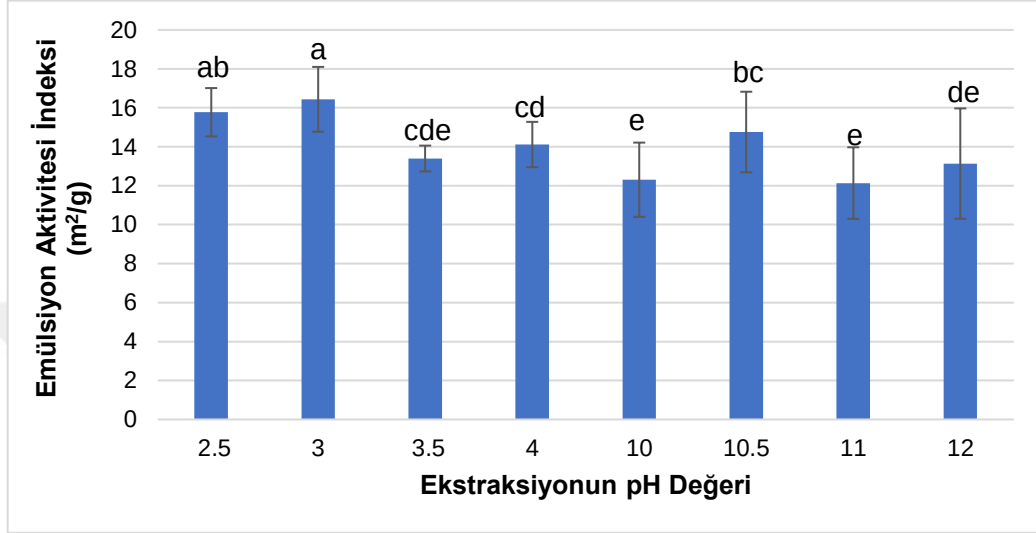
Tablo 13. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Emülsifiye Edici Aktivite ve Emülsiyon Stabilite İndekslerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

			Varyans Kaynakları		
			SD	KO	F
Emülsifiye Özelliği	Ekstraksiyonun pH Değeri (E)	Emülsiyon Aktivite İndeksi	7	36,659	10,266**
		Emülsiyon Stabilite İndeksi	7	393,841	1,995
	Analizin pH Değeri (A)	Emülsiyon Aktivite İndeksi	4	13,278	3,718**
		Emülsiyon Stabilite İndeksi	4	139,749	0,708
	E × A	Emülsiyon Aktivite İndeksi	28	0,610	0,171
		Emülsiyon Stabilite İndeksi	28	123,281	0,625
	Hata	Emülsiyon Aktivite İndeksi	80	3,571	
		Emülsiyon Stabilite İndeksi	80	197,383	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: p<0,01

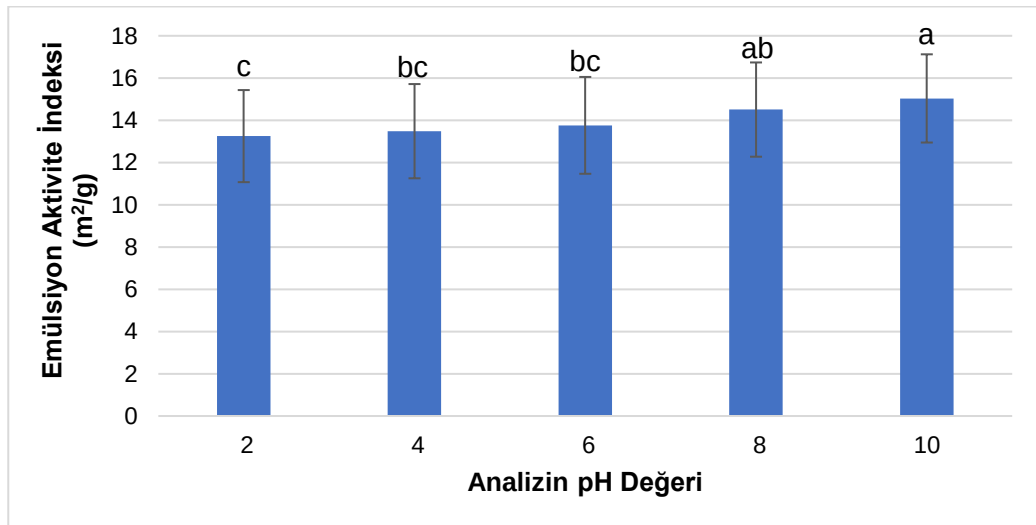
Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivite indeksine ait Duncan

Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 26’da verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivitesi indeksinin ortalama $12,14 \pm 1,84$ ile $16,44 \pm 1,66$ m^2/g arasında değiştiği ve 3 pH değerinde ekstrakte edilen proteinlerden üretilen protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivite indeksi değerlerinin, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12 pH değerinde ekstrakte edilen proteinlerden üretilen protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivite indeksi değerlerinden yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 26. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivitesi indeksine (m^2/g) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Emülsiyon aktivitesi analizi esnasında uygulanan farklı pH değerlerinde ölçülen protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivitesi indeksine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 27’de verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivitesi indeksinin ortalama $13,25 \pm 2,18$ ile $15,04 \pm 2,09$ m^2/g arasında değiştiği ve analiz pH değerinin artışı ile emülsiyon aktivite indeksinin de genellikle arttığı belirlenmiştir.



Şekil 27. Emülsifiye edici aktivitesinin analizi esnasında uygulanan farklı pH değerlerinde

ölçülen protein hidrolizatlarının emülsifiye edici aktivite indeksine (m^2/g) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Klompong *et al.* (2007) balık etinden alkalaz ve flavorzyme enzimleri kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının pH 2, 4, 6, 8 ve 10 değerlerindeki emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksi değerlerinin hidroliz derecesinin artmasıyla azaldığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar molekül ağırlığı yüksek veya yüksek hidrofobik özellikte olan peptitlerin emülsiyon stabilitesinin daha iyi olduğunu, ancak çok yüksek hidroliz derecesinin de sınırlayıcı bir faktör olarak emülsiyon aktivitesinde kayıplara yol açtığını vurgulamışlardır.

Chalamaiah *et al.* (2015) sazan yumurtasından pepsin, tripsin ve alkalaz enzimleri kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivite indeksi ve emülsiyon stabilite indeksini pH 2, 4, 6, 8 ve 10'da incelemişlerdir. Emülsiyon aktivitesinin en yüksek pepsinle üretilen hidrolizatlarda pH 8 değerinde olduğunu ve en yüksek emülsiyon stabilite indeksinin ise pepsinle üretilen hidrolizatlarda pH 10 değerinde olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar pH değerinin emülsiyon özellikleri üzerinde etkili olduğunu ve farklı enzimlerin amino asit dizilimi ve çeşidini etkilediğinden belirli bir pH değerinde meydana gelen peptitlerin farklı yüklere sahip olabileceğini ve dolayısıyla emülsiyon özelliklerini etkileyeceğini rapor etmişlerdir.

Souissi *et al.* (2007) balık yan ürünlerinden alkalaz enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivite değerlerinin %10,8 – 20 arasında değişiklik gösterdiğini, örneklerin emülsiyon aktivitelerinin hidrofobiklik ve peptit boyutuyla ilişkili olduğunu ve yüksek hidroliz derecesine bağlı olarak oluşan kısa peptitler ve serbest amino asitlerin sınırlı yüzey aktif madde özelliğine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Villamil *et al.* (2017) Wader etinden ürettikleri protein hidrolizatlarının emülsiyon kapasitelerinin 1,44 – 4,85 m^2/g arasında değiştiğini ve sonuçların enzim ilave oranıyla doğru orantılı, hidroliz süresiyle ise ters orantılı olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar oluşan emülsiyonun devamlılığını sağlama yeteneği olarak tanımladıkları emülsiyon stabilitesinin ise 58,81 – 211,40 saat arasında değiştiğini rapor etmişlerdir.

Liu *et al.* (2018) yaptıkları çalışmada, domuz bacak kemiklerinden alkalaz (enzim:substrat; 1:100; w:w) enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarını farklı konsantrasyonlarda yağ-su emülsiyonuyla karıştırıp emülsiyon aktivite indekslerini incelemişlerdir. Emülsiyona %0,25, 0,5, 0,75 ve 1 konsantrasyonlarında ilave ettikleri protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivite indeksi değerlerinin sırasıyla %8,48, %40,31, %94,75 ve %65,02 olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar konsantrasyon ve emülsifiye edici özelliklerdeki farklılığı; arayüzeyde proteinlerin maksimum yükü aşması ve emülsiyon

oluşturmayan fazla proteinlerin hidrofobik etkileşimden dolayı flokülasyon oluşturarak arayüzeyden serbest kalması ile ilişkilendirmişlerdir. Lima *et al.* (2019) ise balık yan ürünlerinden ürettikleri protein hidrolizatlarının düşük ve yüksek hidroliz derecesinde emülsiyon kapasitelerinin sırasıyla %62,50 ve %65,17 olduğunu, emülsiyon stabilitelerinin ise sırasıyla %99,43 ve %95,36 olduğunu rapor etmişlerdir.

Yığın yoğunluğu

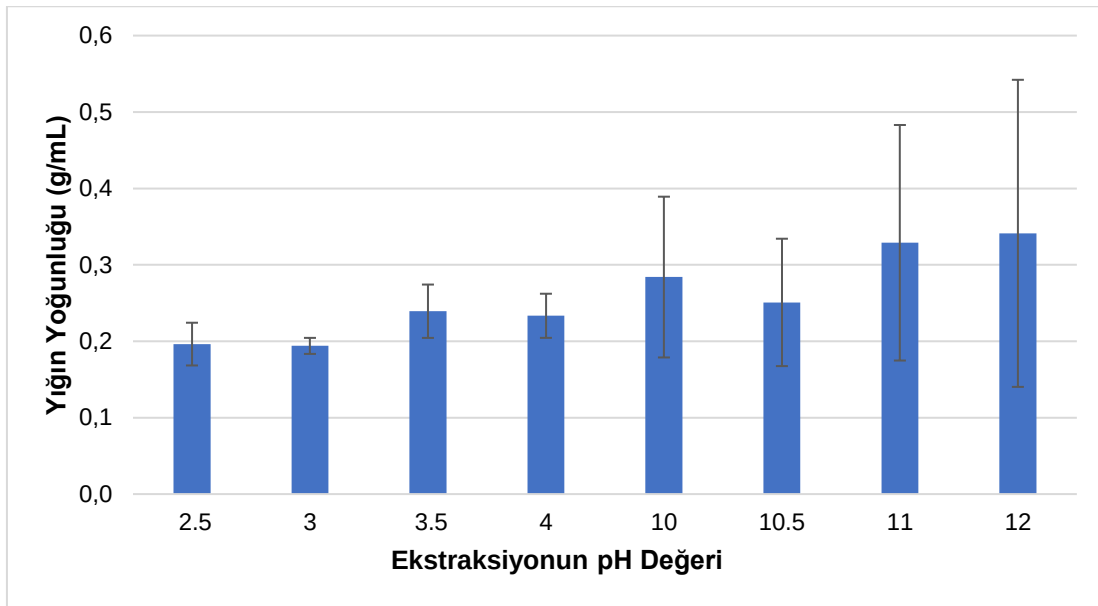
Genellikle kurutma yöntemiyle üretimi gerçekleştirilen ürünlerde ambalajlama parametrelerini etkileyen fiziksel bir özellik olarak nitelendirilen yığın yoğunluğu, katı partiküllerin kütlesinin kapladığı hacme bölünmesiyle elde edilmektedir. Protein hidrolizatlarında daha küçük ve az gözenekli ürün elde edilmesinde hidroliz işlemi ile meydana gelen küçük molekül ağırlıklı peptitler kritik rol oynamaktadır (Kurozawa *et al.* 2009; Jafarpour *et al.* 2020). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının yığın yoğunlukları 0,17 ile 0,57 g/mL arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının yığın yoğunluklarına ait varyans analiz sonuçları Tablo 14'te verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının yığın yoğunluğu üzerine önemli bir etkisinin olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

Tablo 14. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Yığın Yoğunluklarına Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
Yığın yoğunluğu	pH	7	0,009	0,868
	Hata	16	0,011	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının yığın yoğunluğuna ait ortalama sonuçlar Şekil 28'de yer almaktadır. Üretilen protein hidrolizatlarının yığın yoğunluğunun ortalama $0,19\pm0,01$ ile $0,34\pm0,20$ g/mL arasında değiştiği belirlenmiştir.



Şekil 28. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının yığın yoğunluğuna (g/mL) ait ortalama sonuçlar ($\bar{x} \pm SD$)

Wasswa *et al.* (2008) Nil levreği, ot sazanı ve Nil Tilapia derisinden alkalaz enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının yığın yoğunluklarını sırasıyla 0,73, 0,43 ve 0,68 g/mL olarak belirlerken, Foh *et al.* (2010) ise Tilapia balığından alkalaz, flavourzyme ve nötraz enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının yığın yoğunluklarını sırasıyla 0,45, 0,35 ve 0,53 g/mL olarak saptamışlardır.

Morina balık eti ve morina balığının yan ürünlerinden nötraz, alkalaz ve her iki enzim birlikte kullanılarak üretilen protein hidrolizatları üzerine yapılan bir çalışmada (Jafarpour *et al.* 2020), yığın yoğunluğu; morina etinden üretilen protein hidrolizatlarında sırasıyla 0,19, 0,25 ve 0,40 g/mL olarak belirlenirken, morina yan ürünlerinden üretilen protein hidrolizatlarında ise sırasıyla 0,28, 0,31 ve 0,36 g/mL olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar kemiklerden gelen farklı kolajen türevi peptitler ve yüksek mineral içeriği nedeniyle morina yan ürünlerinden üretilen protein hidrolizatlarının yığın yoğunluklarının morina etinden üretilen protein hidrolizatlarının yığın yoğunluğundan genellikle daha yüksek olduğunu açıklamışlardır. Kumari *et al.* (2023) levrek yan ürünlerinden alkalaz enzimi kullanarak elde ettikleri protein hidrolizatının yığın yoğunluğunun 0,30 g/mL olduğunu ve mikrokapsülleme uyguladıkları protein hidrolizatlarının yığın yoğunluğunun ise artarak 0,30 – 0,60 g/mL arasında değişiklik gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Çözünürlük

Çözünürlük; süpernatanttaki protein konsantrasyonunu nitelemektedir (Surasani *et al.* 2018). Protein hidrolizatlarının en önemli özellikleri arasında yer alan çözünürlüğün, ürünün

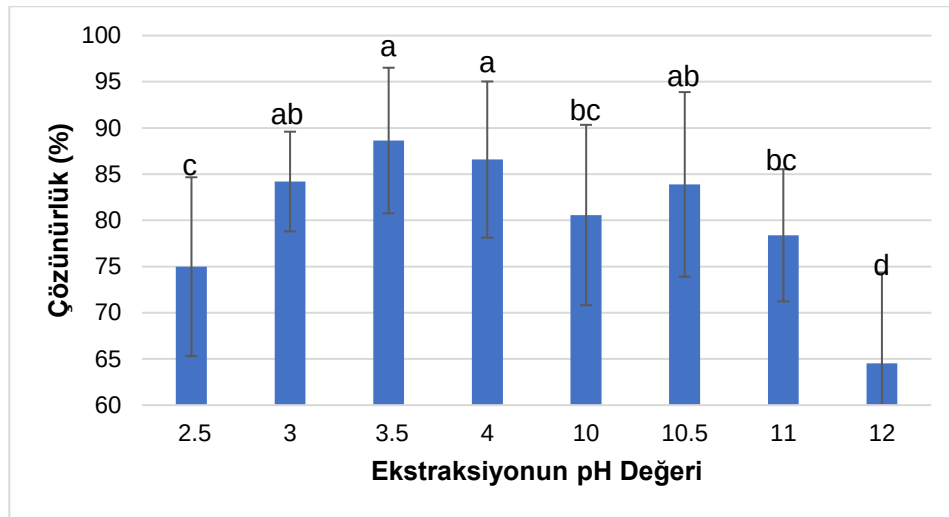
gıda, tıp, eczacılık ve diğer endüstrilerdeki kullanım potansiyelini etkilediği ve çözünürlük üzerine amino asit dizilimi, çeşidi, sırası, hidroliz derecesi, pH değeri, iyonik kuvvet ve sıcaklık gibi faktörlerin etkili olduğu belirtilmektedir (Mahdabi and Shekarabi 2018). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının çözünürlükleri %54,66 ile 98,22 arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının çözünürlüklerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 15’te verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının çözünürlüğü üzerine çok önemli etkisinin olduğu ($p<0,01$) belirlenmiştir. Benzer şekilde, çözünürlük analizi esnasında uygulanan pH değerlerinin (2, 4, 6, 8 ve 10) de protein hidrolizatlarının çözünürlüğü üzerine çok önemli etkisinin olduğu ($p<0,01$) belirlenirken, Ekstraksiyonun pH değeri $\times$ Analizin pH değeri interaksiyonunun ise çözünürlük üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$).

Tablo 15. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Çözünürlüğüne Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
Çözünürlük	Ekstraksiyonun pH Değeri (E)	7	896,221	16,230**
	Analizin pH Değeri (A)	4	370,722	6,714**
	E $\times$ A	28	88,977	1,611
	Hata	80	55,220	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: $p<0.01$

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının çözünürlüğüne ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 29’da verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının çözünürlüğünün ortalama $64,52 \pm 9,84$ ile $88,64 \pm 7,88$ arasında değiştiği ve 12 pH değerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının çözünürlüğünün diğer tüm pH değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının çözünürlüğünden düşük olduğu belirlenmiştir.

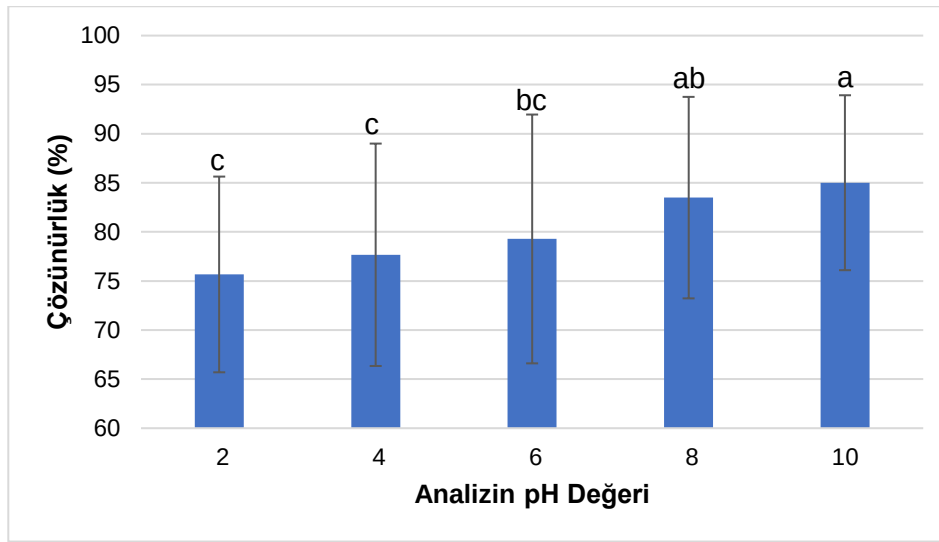


Şekil 29. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının çözünürlüğüne (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Zamorano-Apodaca *et al.* (2020) farklı tür balıkların yan ürünlerinin karışımından elde ettikleri kolajenden alkalaz enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarını ≥ 30 kDa, 10 – 30 kDa, 5 – 10 kDa, 1 – 5 kDa ve ≤ 1 kDa molekül ağırlıklarında fraksiyonlamışlardır. Araştırmada en yüksek çözünürlük değerlerine ($\geq 95\%$); pH 7 değerinde ≥ 30 kDa, 10 – 30 kDa, 5 – 10 kDa molekül ağırlığında fraksiyonlanan örneklerin sahip olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, çözünürlüğün pH değerinden etkilendiğini ve peptit fraksiyonlarının %33 oranında polar amino asit içerdiğini ve buna bağlı olarak elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşturabilme yeteneklerinin çözünürlük değeri üzerinde pozitif etkiler sergilediğini bildirmişlerdir.

González-Serrano *et al.* (2022) sazan balığı yan ürünlerinden elde ettikleri kolajenden üretilen protein hidrolizatlarını >30 kDa, 10 – 30 kDa, 3 – 10 kDa ve <1 kDa molekül ağırlığında fraksiyonlamışlardır. Protein hidrolizatlarının çözünürlüklerinin pH değerinden etkilendiğini ve en düşük çözünürlüğün pH 4'te saptandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar çözünürlük değerlerindeki farklılıkların, pH değerinin izoelektrik noktadan uzaklaşmasıyla peptit net yükünün artmasından ve hidrofobik temas yoluyla agregasyonu artıran yüzey hidrofobikliğinden kaynaklanabileceğini rapor etmişlerdir.

Çözünürlük analizi esnasında uygulanan farklı pH değerlerinde ölçülen protein hidrolizatlarının çözünürlüğüne ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 30'da yer almaktadır. Üretilen protein hidrolizatlarının çözünürlüğünün ortalama $75,67 \pm 9,97$ ile $85,01 \pm 8,91$ arasında değiştiği ve analiz esnasında uygulanan pH değerinin artması ile genellikle çözünürlüğün de arttığı belirlenmiştir.



Şekil 30. Çözünürlük analizi esnasında uygulanan farklı pH değerlerinde ölçülen protein hidrolizatlarının çözünürlüğüne ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

pH değiştirme yöntemi kullanılması durumunda proteinler izoelektrik noktadan uzak pH değerlerinde güçlü pozitif ve negatif yüklere sahip yapılar oluşturmaktadır. Böylelikle, güçlü pozitif ve negatif yükler arasındaki etkileşimler ve itme gücü nedeniyle katlanmış yapıların meydana geldiği ve bu yapıların ise proteinlerin hem fonksiyonel hem de fiziksel özellikleri üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir (Tang *et al.* 2021). Asidik pH değerlerinde myofibriler proteinler (özellikle myosin ve aktin) ve sarkoplazmik proteinler (myoglobin) denatüre olarak çözünürlükleri azalırken, bağ dokusu proteinlerinden kolajenin ise hidrolize uğradığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, myofibriler proteinlerden myosin ve aktin sırasıyla pH 5,5'te ve pH 4,7'de, sarkoplazmik proteinler pH 4 – 5 arasında ve bağ dokusu proteini kolajen ise pH 5,5'te izoelektrik noktalarına ulaşmaktadır. Alkali pH değerlerinde ise myofibriler, sarkoplazmik ve bağ dokusu proteinlerinin denatüre olarak çözünürlük özelliklerini kaybettikleri de bildirilmektedir (Damodaran 1996; Toldrá 2003; Lopez-Enriquez *et al.* 2015; Matak *et al.* 2015; Ochiai and Ozawa 2020).

Benzer şekilde, Tang *et al.* (2021) balıklardan pH değiştirme yöntemi kullanılarak üretilen protein hidrolizatlarının pH 1 – 3 ile pH 11 – 13 arasında en yüksek çözünürlüğe sahip olduklarını ve bu durumun pH 5 – 6 arasında myosinin düşük çözünürlüğe sahip olmasıyla ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Rawdkuen *et al.* (2009) ise asidik işlemlerde değişken çözünürlük değerlerini yüksek asidik koşullarda proteinlerin denatüre olmaları ile ilişkilendirmişlerdir. Sonuç olarak, mevcut araştırmada, et tıraşlama atıklarından asidik ve alkali pH değerlerinde elde edilen protein ekstraktlarından enzimatik hidroliz yöntemi ile üretilen protein hidrolizatlarının farklı çözünürlük değerlerinde, proteinlerin izoelektrik noktalarında çözünürlüklerinin düşük olmalarının ve aynı zamanda yüksek asidik veya alkali noktalarda denatüre olmalarının da etkili olduğu düşünülmektedir.

Su tutma kapasitesi

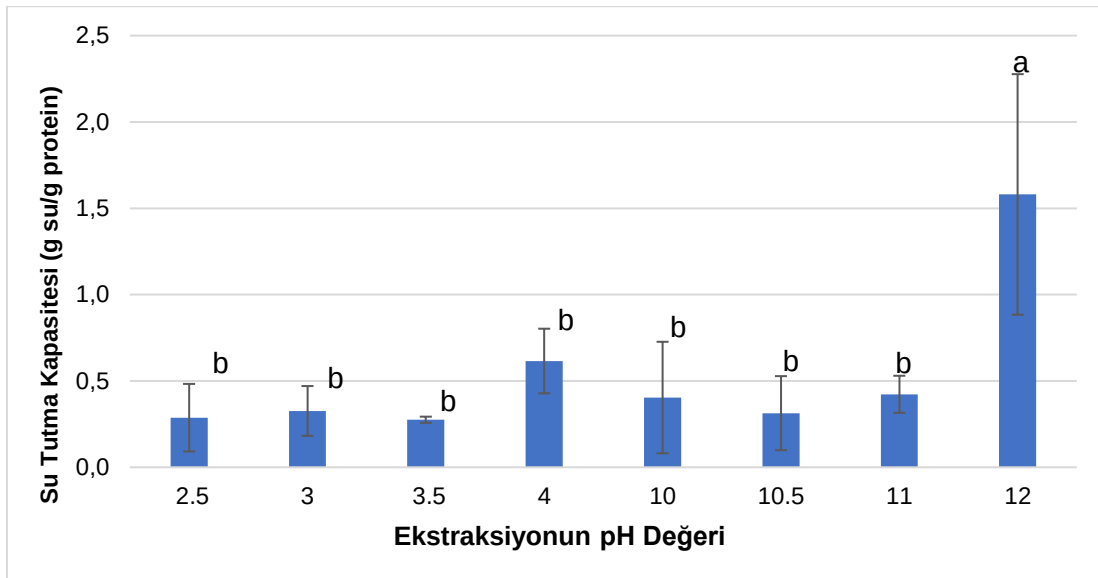
Proteinler ve protein hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri arasında yer alan su tutma kapasitesi, gıda endüstrisinde ekonomik ve duyuşsal özellikler açısından önemli kalite kriterleri arasında gösterilmektedir. Bu bağlamda, gıda endüstrisinde protein hidrolizatlarının su tutma kapasiteleri nedeniyle nemli ürünlerde tekstürel ve duyuşsal özellikleri iyileştirmek amacıyla katkı maddesi olarak kullanılabilir (Chiang *et al.* 1999; Pires and Batista 2013). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının su tutma kapasiteleri 0,13 ile 2,33 g su/g protein arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının su tutma kapasitelerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 16’da verilmiştir. Tablodan da görüldüğü üzere, protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesi üzerine çok önemli etkisinin olduğu ($p<0,01$) belirlenmiştir.

Tablo 16. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Su Tutma Kapasitelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
Su tutma kapasitesi	pH	7	0,578	6,240**
	Hata	16	0,093	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: $p<0,01$

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 31’de yer almaktadır. Üretilen protein hidrolizatlarının su tutma kapasitelerinin ortalama $0,28\pm0,02$ ile $1,58\pm0,69$ g su/g protein arasında değiştiği, 12 pH değerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının su tutma kapasitelerinin, diğer tüm pH değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının su tutma kapasitelerinden yüksek olduğu ve diğer pH değerleri arasında su tutma kapasitesi açısından bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 31. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesine (g su/g protein) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Šližytė *et al.* (2005) moringa balığı yan ürünlerinden farklı enzimler kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarında su tutma kapasitesinin hidroliz derecesiyle ilişkili olmadığını, buna karşın su tutma kapasitesinin belirli amino asitlerle ilişkili olduğunu ve glisin/arjinin, hidroksiprolin, alanin ve hidrofobik amino asitlerin miktarlarının azalmasının su tutma kapasitesini artırdığını rapor etmişlerdir.

Balti *et al.* (2010) *Bacillus licheniformis* NH1'den ekstrakte ettikleri enzimle mürekkep balığı işleme atıklarından protein hidrolizati ürettikleri araştırmalarında, protein hidrolizati örneklerinin su tutma kapasitesinin 3,0 – 5,5 mL su/g arasında değiştiğini ve su tutma kapasitesi üzerine hidroliz işlemi esnasında -COOH ve -NH₂ gibi polar grupların açığa çıkmasının etkili olduğunu bildirmişlerdir. Pires and Batista (2013) ise -COOH ve -NH₂ polar gruplarının suyu bağlama kuvvetini artırarak hidrolizatlara higroskopik özellikler kazandırdığını rapor etmişlerdir.

Mısır and Koral (2019) gökkuşağı alabalığı yan ürünlerinden alkalaz (enzim:substrat, %0,5; pH 8) enzimi kullanarak 1 saat süre ile geleneksel ve ultrasonik destekli hidroliz işlemine tabi tutarak elde ettikleri protein hidrolizatlarının su tutma kapasitelerinin sırasıyla 5,40 mL/g ve 4,70 mL/g olduğunu belirlemişlerdir. Hemker *et al.* (2020) ise yaptıkları çalışmada, Tilapia yan ürünlerinden (baş, kuyruk ve yüzgeçler) izoelektrik çözündürme ve çöktürme yöntemleriyle (pH 11,5 ve pH 5,5) elde ettikleri protein izolatlarından basınç destekli enzimatik hidroliz (alkalaz, 3 mL/100 mL; pH 8, 55°C) yöntemi kullanarak protein hidrolizati üretmişlerdir. Araştırmacılar protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesinin 0,9 g/g olduğunu, su tutma kapasitesi üzerine basınç ve uygulama süresinin etkili olduğunu, basınç ve uygulama

süresindeki artışın su tutma kapasitesini azalttığını, bu durumun ise basınç etkisiyle proteinlerde gerçekleşen konformasyonel değişikliklerden kaynaklandığı rapor etmişlerdir.

Amiri *et al.* (2021) *Longissimus dorsi* kasından ekstrakte ettikleri myofibriler proteinlerini papain enzimi ve sonikasyon işlemi ile muamele etmişlerdir. Myofibriler proteinlere papain enzimi ile birlikte 0, 15 ve 30 dk sonikasyon işlemi uygulanması neticesinde su tutma kapasitesini sırasıyla %59,12, %79,35 ve %62,24 olarak belirlemişlerdir. Araştırmada, sonikasyon ve enzim uygulamasının yüksek su tutma kapasitesiyle sonuçlanmasında yüksek protein-su etkileşimi ve küçük parçacık boyutu dağılımının etkili olduğu bildirilmiştir.

Yağ tutma kapasitesi

Protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesi, ağırlık başına tutulan yağ miktarını ifade etmektedir (Pires and Batista 2013). Protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasiteleri et ürünleri, unlu mamuller, soslar ve şekerleme gibi birçok üründe lezzet ve fonksiyonel özelliği etkilemesinden dolayı önem arz etmektedir (Halim and Sarbon 2020). Protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesindeki değişikliklerin üretim yöntemi, protein kaynağı, hidroliz derecesi, enzim spesifikliği, polar olmayan amino asit içeriği, peptitlerin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu ile protein-lipit etkileşimlerinden kaynaklandığı bildirilmektedir (Fuentes *et al.* 2024). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasiteleri 1,34 ile 3,03 g yağ/g protein arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitelerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 17’de verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesi üzerine önemli etkisinin olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

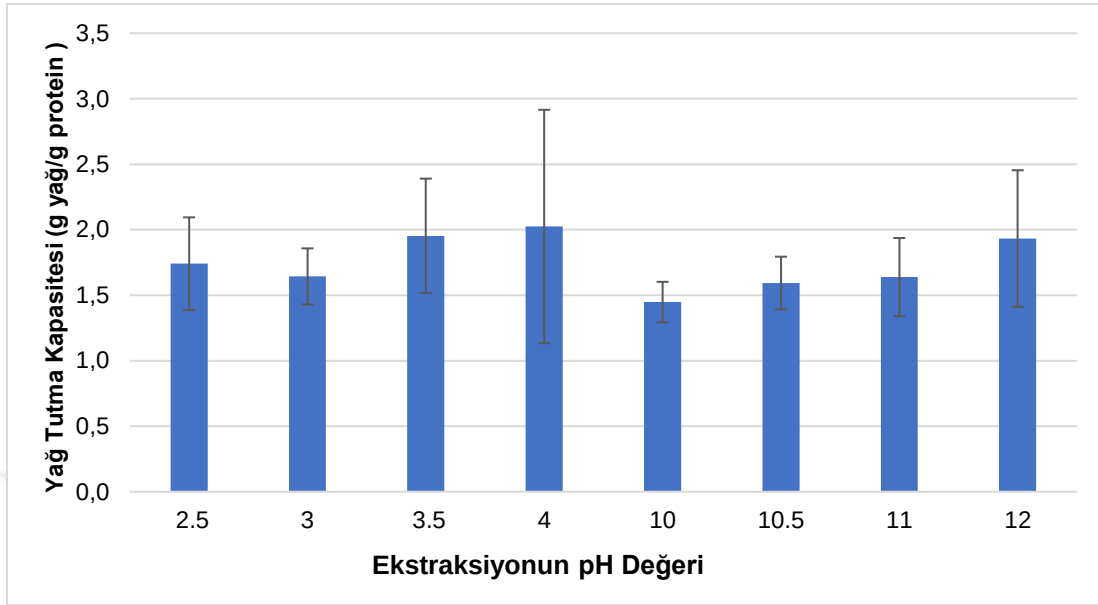
Tablo 17. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının Yağ Tutma Kapasitelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
Yağ tutma kapasitesi	pH	7	0,124	0,629
	Hata	16	0,198	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesine ait ortalama sonuçlar

Şekil 32’de verilmiştir. Üretilen protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitelerinin ortalama $1,45 \pm 0,16$ ile $2,02 \pm 0,89$ g yağ/g protein arasında değiştiği ve örneklerin yağ tutma kapasiteleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 32. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesine (g yağ/g protein) ait ortalama sonuçlar ($\bar{x} \pm SD$)

Mevcut araştırmada üretilen protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesinin hidroliz derecesiyle ilişkili olmadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, çeşitli kaynaklardan elde edilen protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitelerinin hidroliz derecesiyle ilişkili olmadığı Souissi *et al.* (2007), Amiza *et al.* (2013) ve Wachirattanapongmetee *et al.* (2009) tarafından da belirlenmiştir. Proteinlerin yüksek oranda hidroliz edilmesi ile peptit bağları daha çok parçalanmakta ve proteinin konformasyonu açılarak yağ tutma bölgelerinin ortaya çıkması sağlanmaktadır. Protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesi esasen yüzey hidrofobikliği ile ilişkilendirilmekte olup, lipidlerdeki hidrokarbon zincirleri ve hidrofobik veya polar olmayan amino asitler arasındaki etkileşim neticesinde meydana geldiği belirtilmektedir (Alves *et al.* 2021; Razavizadeh *et al.* 2022).

Taheri *et al.* (2013) kümes hayvanları yan ürünleri ve gökkuşağı alabalığı yan ürünlerinden alkalaz enzimi kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitelerinin sırasıyla 2,8 mL/g ve 3,1 mL/g olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar glutamik asit, aspartik asit, lisin ve arjinin gibi amino asitlerin yüksek miktarda bulunmasının yağ tutma kapasitesini artırdığını bildirmişlerdir. de Queiroz *et al.* (2017) ise keçi iç organlarından alkalaz ve brauzyn enzimleri kullanarak elde ettikleri protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitelerinin 5,94 – 6,92 mL yağ/g protein arasında değişiklik gösterdiğini ve yağ tutma kapasiteleri arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmadığını belirlemişlerdir.

ACE inhibitör aktivitesi

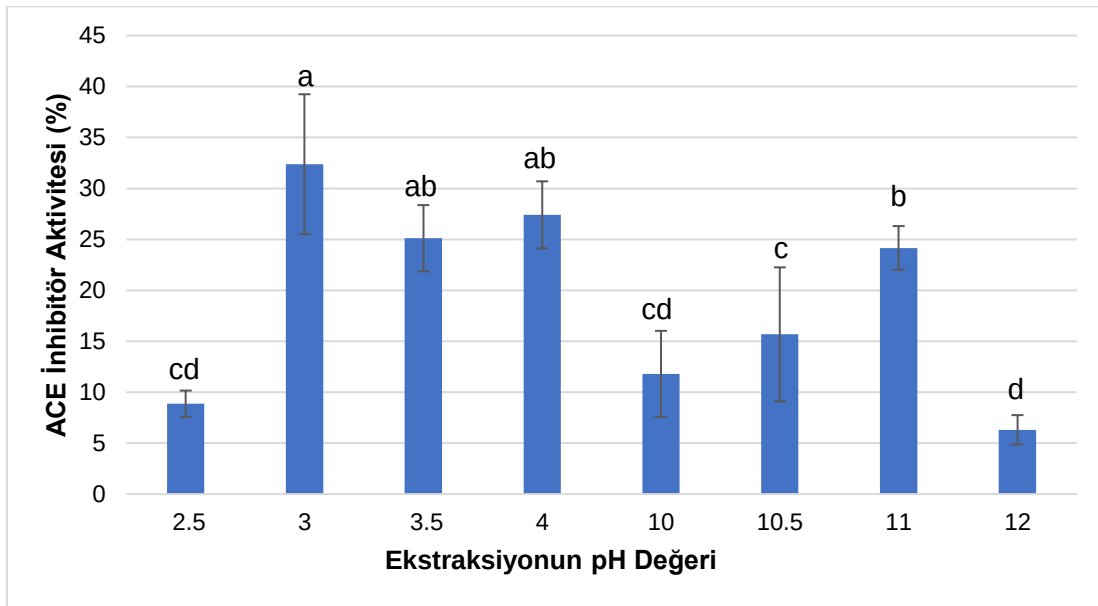
Günümüzde hipertansiyon tedavisinde kullanılabilecek doğal ve etkili ACE inhibitörlerine olan ilgi her geçen gün artmakta olup, bilimsel çalışmalar gıdalardan üretilen biyoaktif peptitlerin ACE inhibitör aktiviteleri üzerine yönelmiştir. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar ACE'yi bloke ederek ACE'nin fonksiyonuna müdahale ederken, ACE inhibitör peptitlerin ise anjiyotensin I'in ACE'ye bağlanmasını engelleme prensibiyle (anjiyotensin I'in ACE'ye bağlanması sonucu oluşan ve güçlü vazokonstriktör özelliğe sahip olan anjiyotensin II'nin oluşumunda rekabetçi bir şekilde davranarak) aktivite sergilediği belirtilmektedir (Ishak and Sarbon 2018; Rivero-Pino *et al.* 2020; López-Pedrouso *et al.* 2023). Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktiviteleri %4,97 ile 36,90 arasında değişiklik göstermiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitelerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 18'de verilmiştir. Protein hidrolizatı üretim aşamasında uygulanan farklı pH (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyonunun protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitesi üzerine çok önemli etkisinin olduğu ($p<0,01$) belirlenmiştir.

Tablo 18. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Ekstrakte Edilen Proteinlerin Enzimatik Hidrolizi Sonucu Üretilen Protein Hidrolizatlarının ACE İnhibitör Aktivitelerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
ACE İnhibitör Aktivitesi	pH	7	274,462	15,897**
	Hata	16	17,265	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: $p<0,01$

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitesine ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Şekil 33'te sunulmuştur. Üretilen protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitelerinin ortalama $6,31\pm1,44$ ile $32,38\pm6,87$ arasında değiştiği belirlenmiştir. 3, 3,5, 4 ve 11 pH değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitelerinin, 2,5, 10, 10,5 ve 12 pH değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitelerinden yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 33. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitesine (%) ait Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Bougatet *et al.* (2024) kalamar atıklarından tripsin, alkalaz ve esperase enzimleri kullanarak ürettikleri protein hidrolizatlarının ACE inhibisyon IC_{50} değerlerinin ve en çok bulunan peptitlerin molekül ağırlıklarının sırasıyla 74 $\mu g/mL$, 37 $\mu g/mL$ ve 53 $\mu g/mL$; 2500 Da, 1100 Da ve 720 Da olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, özellikle 1000 Da'dan düşük molekül ağırlığına sahip peptitlerin daha güçlü ACE inhibitör aktivite sağladığını ve molekül ağırlığı 1000 Da'dan yüksek olanların ise aktif bölgeye ulaşip bağlanamamasından dolayı ACE inhibitör aktivitelerinin düşük olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan, molekül ağırlığı 1100 Da olan ve alkalaz enzimi ile üretilen protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitesinin yüksek olmasında, alkalaz enziminin farklı parçalama spesifikliği ve bundan dolayı da örneğin farklı sekansta daha etkin inhibisyon kabiliyetine sahip peptitler içermesinden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Bu sonuçlar özellikle 3, 3,5, 4 ve 11 pH değerlerinde gerçekleştirilen protein ekstraksiyon işleminin ardından üretilen protein hidrolizatlarının yüksek ACE inhibitör aktivitesine sahip olduğunu ve doğal ACE inhibitör kaynağı olarak kullanılabileceğinin göstermektedir.

Protein Ekstraktı ve Protein Hidrolizatlarında Belirlenen Isıl İşlem Kontaminantlarına Ait Analiz Sonuçları

Kloropropanol esterleri

Çeşitli gıdalarda eser miktarlarda bulunan 2-MCPD ve 3-MCPD bileşiklerinin tespiti için GC uçucu türevleri oluşturmanın, daha verimli olduğu bilinmektedir. HFBI, polar yapıdaki 2-MCPD ve 3-MCPD ile kararlı türevler oluşturmak üzere kolaylıkla reaksiyona girebilme

özelliğine sahip türevlendirme ajanı olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Türevlendirme ajanı olarak HFBI'nın kullanımı 3-MCPD-HFBI türevlerinin kütle spektrumlarının daha fazla sayıda tanınal iyon içermesi, -NH ve -OH gruplarıyla birlikte ekstrakte edilen bileşikleri uçucu hale getirerek GC kolonunun ve enjektörünün kirliliklerden daha az etkilenmesini sağlaması gibi avantajlara sahiptir (Hamlet and Sutton 1997; Hamlet 1998). Mevcut araştırmada analizi yapılan kloropropanol bileşiklerine ait metot validasyon parametreleri [algılama sınırı (limit of detection, LOD), kantitatif ölçme sınırı (limit of quantification, LOQ), regresyon katsayısı ve geri kazanım (Recovery)] değerleri Tablo 19'da verilmiştir. Metot validasyonu ile ilgili elde edilen sonuçların literatürde bildirilen değerler ile uyum içerisinde olduğu tespit edilmiştir (Kim *et al.* 2008; Wang *et al.* 2016; Zheng *et al.* 2021).

Tablo 19. 3-MCPD ve 2-MCPD Bileşiklerinin LOD ve LOQ Değerleri ile Regresyon Katsayıları ve Geri Kazanım Oranları

Bileşikler	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	Regresyon Katsayısı	Geri Kazanım (%)
3-MCPD	164,97	499,92	0,9944	98,48
2-MCPD	52,22	158,23	0,9971	102,25

Mevcut araştırmada analizi yapılan kloropropanol içeriklerinin, hangi üretim aşamasında/aşamalarında oluştuklarının tespiti için protein hidrolizatlarının üretim basamaklarının tamamında yani üç aşamasında da (1- protein ekstraksiyonu, 2- fraksiyonlama öncesi ve 3- fraksiyonlama sonrası, <3 kDa) kloropropanol içerikleri belirlenmiştir. Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde elde edilen protein ekstraktları, bu ekstraktlar kullanılarak üretilen fraksiyonlanmamış protein hidrolizatları ve bu protein ekstraktları kullanılarak üretilen ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarının (<3 kDa) hiçbirinde 3-MCPD bileşiği tespit edilememiştir. Öte yandan, 2-MCPD bileşiği, analizi yapılan protein ekstraktlarında ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarında belirlenemezken, fraksiyonlanmamış protein hidrolizatlarında ise içeriğinin nd – 522,80 ppb seviyelerinde değiştiği belirlenmiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde elde edilen protein ekstraktları, fraksiyonlanmamış protein hidrolizatları ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarının (<3 kDa) 3-MCPD ve 2-MCPD içeriklerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 20'de verilmiştir. 3-MCPD bileşiği üzerine üretim işlem basamakları ve ekstraksiyonun pH değeri ile Üretim işlem basamağı x Ekstraksiyonun pH değeri interaksiyonunun anlamlı bir etkisi ($p>0,05$) tespit edilmemiştir. Öte yandan, 2-MCPD bileşiği üzerine üretim işlem basamaklarının çok önemli etkisinin olduğu ($p<0,01$) belirlenirken, ekstraksiyon pH değeri ve Üretim işlem basamağı x Ekstraksiyonun pH değeri interaksiyonunun anlamlı bir etkisinin olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir.

Tablo 20. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Elde Edilen Protein Ekstraktları, Fraksiyonlanmamış Protein Hidrolizatları ve Fraksiyonlanmış Protein Hidrolizatlarının (<3 kDa) 3-MCPD ve 2-MCPD İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

		Varyans Kaynakları		
		SD	KO	F
3-MCPD	İşlem basamağı (İ)	2	1,125E-8	1,000
	Ekstraksiyonun pH Değeri (E)	7	1,125E-8	1,000
	İ x E	14	1,125E-8	1,712
	Hata	48	1,125E-8	
2-MCPD	İşlem Basamağı (İ)	2	200353,979	21,917**
	Ekstraksiyonun pH Değeri (E)	7	16155,203	1,767
	İşlem x E	14	16155,223	1,767
	Hata	48	9141,607	

İşlem: Ekstraksiyon ve fraksiyonlama, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: p<0,01

Mevcut araştırmada üretilen örneklerin 3-MCPD ve 2-MCPD içerikleri üzerine üretim işlem basamaklarının etkisini gösteren Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 21’de yer almaktadır. Analizi yapılan protein ekstraktları ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarında 3-MCPD ve 2-MCPD bileşikleri belirlenemezken, fraksiyonlanmamış protein hidrolizatlarında 183,73 ppb seviyesinde 2-MCPD bileşiği tespit edilmiştir.

Tablo 21. Örneklerin 3-MCPD ve 2-MCPD İçerikleri Üzerine Üretim İşlem Basamaklarının Etkisini Gösteren Duncan Çoklu Karşılaştırma Test Sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Örnek	n	3-MCPD (ppb)	2-MCPD (ppb)
Protein Ekstraktı	24	nd	nd ^b
Fraksiyonlanmamış Protein Hidrolizatı	24	nd	183,73±165,36 ^a
Fraksiyonlanmış Protein Hidrolizatı (<3 kDa)	24	nd	nd ^b

nd: <LOD; farklı harflerle işaretlenen ortalamalar arasındaki farklar önemlidir.

Kloropropanollerin başlıca prekürsörlerinin mono-, di- ve trigliseritler ile klorlu bileşikler olduğu bildirilirken, oluşan bileşiklerin miktarları üzerine süre, sıcaklık ve pH gibi proses şartlarının etkili olduğu bildirilmektedir (Chung *et al.* 2008; Albuquerque *et al.* 2020). Protein hidrolizatlarının üretimi esnasında uygulanan yağsızlaştırma, santrifüjleme ve filtreleme gibi işlemlerde materyaldeki yağın büyük bir kısmının uzaklaştırılmasına rağmen az da olsa bir miktar yağın materyalde kalabileceği belirtilmektedir (Chalamaiah *et al.* 2012). Nitekim, Klompong *et al.* (2007) yağsızlaştırma işlemi uyguladıkları balık eti kıymasında belirli bir seviyede yağın kaldığını rapor etmişlerdir. Mevcut araştırmada, protein ekstraksiyonu

aşamasında uygulanan santrifüj işleminde üst fazda yağ tabakasının yer aldığı gözlenmiş ve protein eldesi için uzaklaştırılmış olsa da bir miktar yağın protein hidrolizatlarında kalabildiği düşünülmektedir. Ayrıca, mevcut araştırmada kloropropanollerin oluşumlarında enzimatik hidrolizde uygulanan ısı işleminin (50°C’de 4 saatlik inkübasyon işlemi ile 90°C’de 10 dk’lık enzim inaktivasyon işlemi) 2-MCPD bileşiğinin oluşumunda rol oynadığı tahmin edilmektedir. Diğer taraftan, örneklerin 2-MCPD içerikleri incelendiğinde, protein ekstraktları ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarında (<3 kDa) belirlenemeyen 2-MCPD bileşiğinin, fraksiyonlanmamış protein hidrolizatlarında ise pH 4, 10, 10,5, 11 ve 12 değerlerinde üretilen protein hidrolizatlarında oluşabildiği gözlenmiştir. Bu bağlamda, <3 kDa molekül ağırlığında fraksiyonlama işleminin 2-MCPD bileşiğinin miktarını azaltarak olumlu katkı sağladığı söylenebilir. Öte yandan, protein ekstraktlarında pH değerinin ayarlanmasında HCl kullanılmasına rağmen kloropropanol bileşiklerinin oluşmamasında herhangi bir ısı işleminin uygulanmamasının etkili olduğu tahmin edilmektedir. 2-MCPD bileşiğinin alkali pH değerlerinde (10, 10,5, 11 ve 12) ekstrakte edilen proteinlerden üretilen protein hidrolizatlarında yüksek miktarda belirlenmesinde ise ısı işlemleri birlikte alkalaz enziminin optimum pH değerinin ayarlanması için HCl’in kullanılmasının etkili olabileceği düşünülmektedir. Hamlet *et al.* (2002b) tavuk et ekstraktı örneklerinin her beş tanesinden birinde 0,014 mg/kg 3-MCPD belirlemişler, üretim prosesinin 100°C’yi geçmemesine rağmen 3-MCPD oluşumunu kesim sonrası klorlama veya suyla yıkama işlemine bağlı prekürsörlerin varlığıyla açıklamışlardır. Ayrıca her üç enzimle hidrolize edilmiş bitkisel proteinlerin birinde 0,078 mg/kg 3-MCPD tespit etmişler ve bu oluşumu hidroliz işleminde enzimleri inaktive etmek için uygulanan organik asitler veya alkali gibi kimyasal işlemlerle ilişkilendirmişlerdir.

Mevcut araştırmada üretilen örneklerin 3-MCPD ve 2-MCPD içerikleri üzerine protein ekstraksiyonunda uygulanan pH değerinin etkisini gösteren Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 22’de verilmiştir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen protein ekstraktlarından üretilen protein hidrolizatlarında 3-MCPD bileşiği belirlenememiştir. Benzer şekilde, 2,5 ve 3 pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerden üretilen protein hidrolizatlarında 2-MCPD bileşiği de tespit edilememiştir. Öte yandan, diğer pH değerlerinde (3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) ekstrakte edilen protein ekstraktlarından üretilen protein hidrolizatlarının 2-MCPD içeriklerinin 19,50 ile 101,37 ppb seviyesinde değiştiği ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 22. Örneklerin 3-MCPD ve 2-MCPD İçerikleri Üzerine Protein Ekstraksiyonunda Uygulanan pH Değerinin Etkisini Gösteren Duncan Çoklu Karşılaştırma Test Sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

Ekstraksiyonun pH değeri	n	3-MCPD (ppb)	2-MCPD (ppb)
2,5	9	nd	nd
3	9	nd	nd
3,5	9	nd	19,50±58,51 ^a
4	9	nd	97,29±193,40 ^a
10	9	nd	64,79±128,65 ^a
10,5	9	nd	49,04±97,56 ^a
11	9	nd	90,02±188,07 ^a
12	9	nd	101,37±175,91 ^a

nd: <LOD; aynı harfle işaretlenen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

Mevcut araştırmada, üretilen protein ekstraktı ile fraksiyonlanmamış ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarının 3-MCPD ve 2-MCPD içeriklerinin literatürle kıyaslanarak yorumlanması, benzer bir çalışmanın veya örnek incelemesinin olmaması nedeniyle yapılamamıştır. Ayrıca, literatürde 3-MCPD'ye kıyasla 2-MCPD üzerine yapılan çalışmalar da oldukça sınırlıdır. Diğer taraftan, 2-MCPD'nin bebek mamaları, bitkisel yağlar ve fırıncılık ürünleri gibi çeşitli örneklerde incelendiği çalışmalar literatürde mevcuttur (Wang *et al.* 2016; Stauff *et al.* 2020; Cui *et al.* 2021a; Goh *et al.* 2021; Zheng *et al.* 2021; Liao *et al.* 2024).

Hidrolize bitkisel proteinler gibi asit ilaveli hidroliz işlemlerinde HCl ile açilgliserol, gliserol ve fosfolipitler arasındaki reaksiyonlar sonucu önce monokloropropandiol esterleri oluşmakta ve ardından esterler hidroliz olarak monokloropropandioller meydana getirmektedir (Stauff *et al.* 2020). Alkali pH değerinde kararsız yapıda olduğu ve pH değerinin 6'dan yüksek olduğu koşullarda ise bozunduğu ispatlanan 3-MCPD'nin gıdalarda oluşum miktarının azaltılmasında asitle hidroliz işlemini takiben alkali bir işlemin uygulanabileceği bildirilmektedir (Lee and Khor 2015). Starski *et al.* (2013) tarafından da 3-MCPD'nin diğer bileşiklere kıyasla oluşum mekanizmasının bilindiği ve bu nedenle en yaygın tanımlanan kloropropanol bileşiği olduğu bildirilirken, 3-MCPD'nin suda ve etanolde iyi bir çözünürlüğe sahip olduğu ancak alkali ortamlarda kararsız bir bileşik olduğu ifade edilmiştir. Öte yandan, triaçilgliserol içeren model sistemde glisidolün ara ürün olarak rol almasıyla 2-MCPD ve 3-MCPD arasında sıcaklığın da etkisiyle bir ara dönüşüm reaksiyonu olabileceği bildirilmektedir (Rahn and Yaylayan 2011).

HCl sadece asidik hidroliz işlemlerinde kullanılmamakta, aynı zamanda pH değiştirme yöntemiyle protein ekstrakt/izolat/konsantrelerinin üretiminde asidik pH değerlerinin sağlanması ve enzimatik hidroliz yöntemlerinde enzimin optimum pH değerinin ayarlanması işlemlerinde de sıklıkla tercih edilmektedir (Panpipat and Chaijan 2016; Abdollahi and Undeland 2019; Pezeshk *et al.* 2021). Mevcut araştırmada, protein hidrolizatlarında belirlenen kloropropanol içeriklerinde ekstraksiyon ve hidroliz aşamalarında pH değerinin ayarlanmasında kullanılan HCl'in klor donörü olarak rol oynadığı düşünülmektedir. Nitekim, mevcut çalışmada da hem asidik pH değerlerinde (2,5, 3, 3,5 ve 4) ekstrakte edilen proteinlerin hazırlanmasında hem de alkali pH değerinde (10, 10,5, 11 ve 12) ekstrakte edilen proteinlerin hidroliz işleminde alkalaz enziminin optimum pH değeri olan pH 8'in ayarlanmasında HCl kullanılmıştır. 3-MCPD'nin oluşumunun ortadan kaldırılması için asidik hidroliz yönteminde, HCl yerine H₂SO₄ kullanımı tercih edilebilecek ilk seçenek olarak karşımıza çıksa da H₂SO₄ kullanımının H₂SO₄'teki ikinci protonun amino asitlerin stabilitesini ve dolayısıyla proteinlerin fonksiyonel özelliklerini etkileyebileceği de bilinmektedir (Flork 1989).

Crews *et al.* (2002) maksimum 3-MCPD içeriğini füme pastırma örneklerinde 0,047 mg/kg, kömürde pişirilen dana burgerlerde 0,071 mg/kg, paket servis sığır burgerlerinde 0,028 mg/kg, pişmiş çeşitli etlerde 0,011 mg/kg ve salam örneklerinde ise 0,069 mg/kg olarak saptamışlardır.

Vicente *et al.* (2015) Brezilya'da satışa sunulan hidrolize bitkisel protein içeren ürünlerde 3-MCPD içeriğini nd – 2529 µg/kg arasında tespit ederlerken, et örneklerinde ise nd – 500 µg/kg arasında saptamışlardır. Ayrıca 3-MCPD içeriği sosis örneklerinde nd – 15 µg/kg arasında, pastırma örneklerinde nd – 12 µg/kg arasında, hindi göğüs etinde nd – 6 µg/kg arasında ve tavuk göğüs etinde <5,9 µg/kg olarak saptanmıştır. EFSA (2016) raporunda 3-MCPD içeriklerini hidrolize bitkisel proteinlerde ortalama 25 µg/kg, fırında pişirilmiş veya kızartılmış balıklarda ortalama 42 µg/kg, fırında pişirilmiş veya kızartılmış etlerde ortalama 23 µg/kg, tütsülenmiş balıklarda ortalama 18 µg/kg ve tütsülenmiş et ürünlerinde ortalama 24 µg/kg olduğunu bildirmiştir. 2-MCPD içeriklerini ise fırında pişirilmiş veya kızartılmış balıklarda ortalama 14 µg/kg, fırında pişirilmiş veya kızartılmış etlerde ortalama 8,38 µg/kg, tütsülenmiş balıklarda ortalama 6,1 µg/kg ve tütsülenmiş et ürünlerinde ortalama 6,8 µg/kg olarak rapor etmişlerdir.

3-MCPD için tolere edilebilir günlük alım miktarı son düzenlemelerle EFSA tarafından 2 µg/kg vücut ağırlığı/gün olarak bildirilmiştir (Cui *et al.* 2021b). Mevcut araştırmada incelenen örneklerde 3-MCPD bileşiğinin tespit edilmemesi, örneklerin bu kapsamda güvenilirliğini ortaya koymaktadır. Öte yandan, toksikolojik verilerin yeterli olmamasından dolayı 2-

MCPD'nin tolere edilebilir günlük alım miktarına dair herhangi bir yasal sınır bulunmadığından (Wöhrlin *et al.* 2015), mevcut araştırmada günlük alım miktarı açısından herhangi bir değerlendirme yapılamamıştır.

HAA içeriği

Mevcut araştırmada incelenen HAA bileşiklerine ait metot validasyon parametre (LOD, LOQ, regresyon katsayı ve geri kazanım) değerleri Tablo 23'te yer almaktadır. Bireysel HAA'ların LOD, LOQ, regresyon katsayısı ve geri kazanım değerlerinin sırasıyla 0,004 – 0,025 ng/g, 0,013 – 0,085 ng/g, 0,981 – 0,999 ve %70,93 – 94,29 arasında değiştiği belirlenmiştir. Metot validasyonu ile ilgili elde edilen sonuçların, literatürde bildirilen değerler ile uyum içerisinde olduğu tespit edilmiştir (Oz and Yuzer 2017; Unal *et al.* 2018; Oz *et al.* 2021).

Tablo 23. Standart Karışımında Yer Alan Bireysel HAA Bileşiklerinin LOD ve LOQ Değerleri ile Regresyon Katsayıları ve Geri Kazanımları

HAA bileşiği	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Regresyon katsayı	Geri kazanım (%)
IQ	0,009	0,029	0,985	74,35
IQx	0,004	0,013	0,990	70,93
MeIQ	0,014	0,047	0,992	94,29
MeIQx	0,024	0,081	0,999	82,84
4,8-DiMeIQx	0,008	0,025	0,997	92,32
7,8-DiMeIQx	0,005	0,018	0,997	93,51
PhIP	0,025	0,085	0,981	78,64
AαC	0,012	0,039	0,996	93,89
MeAαC	0,010	0,035	0,998	76,41

Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde elde edilen protein ekstraktları, fraksiyonlanmamış protein hidrolizatları ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarında (<3 kDa) değişen düzeylerde IQx (0,06 – 1,31 ng/g), IQ (nd – 2,94 ng/g), MeIQx (nd – 8,04 ng/g), MeIQ (nd – 4,61 ng/g), 7,8 – DiMeIQx (nd – 6,62 ng/g), 4,8-DiMeIQx (nd – 2,76 ng/g), PhIP (nd – 36,94 ng/g), AαC (nd – 4,80 ng/g) ve MeAαC (nd – 4,47 ng/g) bileşikler tespit edilmiştir. Örneklerin toplam HAA içeriğinin ise 0,96 – 45,20 ng/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Mevcut araştırmada, IQx bileşiğinin, analiz edilen tüm örneklerde belirlendiği ve bu nedenle de mevcut araştırmanın en baskın bireysel HAA bileşiği olduğu tespit edilmiştir. IQx bileşiğini takiben; sırasıyla MeIQx bileşiği (70 örnek) ile MeIQ ve PhIP bileşiklerinin (69 örnek) örneklerde yaygın olarak olduğu gözlenmiştir. Ayrıca 7,8-DiMeIQx bileşiğinin analiz edilen 72 örnek grubundan sadece 15'inde bulunması nedeniyle en az rastlanan HAA bileşiği olduğu belirlenmiştir. IQx bileşiği tüm örneklerde bulunmasına rağmen,

tespit edildiği en yüksek konsantrasyonun 1,4 ng/g'ı aşmadığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda, incelenen protein ekstraktı ve protein hidrolizatı örneklerinin bireysel HAA içeriğinin hiçbirisi 10 ng/g'ın üzerinde değilken, bazı örneklerin PhIP içeriğinin bu sınırı aşarak 36,94 ng/g seviyesine ulaştığı görülmüştür. Bunun yanı sıra, farklı pH değerlerinde üretilen protein ekstraktlarında PhIP ve MeIQ bileşiklerinin diğer bireysel HAA bileşiklerinden daha yüksek miktarlarda bulunduğu, PhIP ve MeIQx bileşiklerinin ise fraksiyonlanmamış protein hidrolizatları ile fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarında (<3 kDa) diğer bireysel HAA bileşiklerine kıyasla daha yüksek miktarlarda oluştuğu tespit edilmiştir.

Literatürde protein ekstraktı veya protein hidrolizatlarında HAA oluşumunun incelendiği çalışmaya rastlanılmadığı için elde ettiğimiz sonuçların başka çalışmalar ile kıyaslanması yapılamamıştır. Öte yandan, literatürde HAA'lar ile ilgili yapılan çalışmalarda HAA profili ve konsantrasyonlarında görülen farklılıkların; ürünün serbest amino asit profili ve miktarı, peptit içeriği, peptit kompozisyonu, yapısı ve karakteristiği, üretim aşamaları ve koşulları ve üretim sırasında uygulanan ısıl işlem koşullarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda, ısıl işlem sıcaklığı ve süresinin, HAA profili ve oluşum düzeyi üzerine önemli bir etkiye sahip olduğu çeşitli çalışmalarda da bildirilmiştir (Alaejos and Afonso 2011; Oz and Kaya 2011; Oz and Zikarov 2015; Aenehvand *et al.* 2016; Bulan and Oz 2022; Khan *et al.* 2022; Oz *et al.* 2023; Savaş *et al.* 2023; Aoudeh *et al.* 2024). Protein ekstraktları ve hidrolizatlarının üretimi sırasında uygulanan farklı ısıl işlemlerin bireysel HAA oluşumlarına etki ettiği düşünülmektedir. Bu nedenle, protein hidrolizatı üretiminde kullanılan alkalaz enzimini inaktive etmek için uygulanan ısıl işlemin (90°C, 10 dk) şiddetli bir ısıl işlem olmamasına karşın protein ekstraktlarından üretilen protein hidrolizatlarında farklı düzeyde HAA oluşumlarına neden olabileceği düşünülmektedir. Zira literatürde <100°C sıcaklıklarda dahi HAA'ların oluşabileceğini kanıtlayan araştırmalar bulunmaktadır (Oz and Zikarov 2015). Benzer şartlarda (90°C, 10 dk) ısıtılan soya protein izolatında farklı oranlarda IQ, MeIQx, AαC, DMIP, Trp-P-2, Harman ve Norharman bileşiklerinin oluştuğu da bilinmektedir (Xi and Chen 2021a). Ayrıca HAA'ların oluşum prekürsörlerinin varlığı ve konsantrasyonlarının HAA profili ve oluşum düzeyi üzerine etki ettiği bilinmektedir (Skog *et al.* 1998; Gu *et al.* 2002; Szterk 2015; Khan and Azam 2021; Oz *et al.* 2023; Aoudeh *et al.* 2024; Shi *et al.* 2024). İlaveten, protein hidrolizatlarının farklı serbest amino asit ve oligopeptit içeriği ve profiline sahip olmasının, protein ekstraktı ve protein hidrolizatlarında HAA'ların oluşumunu etkileyen bir diğer faktör olduğu da değerlendirilmektedir. Enzimatik hidroliz işleminin serbest amino asitlerde ve peptitlerin moleküler ağırlık dağılımında, protein ekstraktına kıyasla önemli değişikliklere neden olduğu da birçok çalışmada bildirilmiştir (Chiang *et al.* 2019; Batish *et al.* 2020; Li *et al.* 2023; Xu *et al.* 2024). Bunun yanı sıra, ultrafiltrasyon işlemi protein

hidrolizatlarının amino asit profilini ve içeriğini etkileyebilmektedir. Nitekim, balon balığından (*Takifugu obscurus*) elde edilen protein hidrolizatlarında ultra ve nanofiltrasyona bağlı olarak peptitlerin amino asit içeriği ve tipinde önemli farklılıkların tespit edildiği bildirilmiştir (Wang *et al.* 2019). Bilindiği üzere bazı amino asitlerin, çeşitli HAA bileşiklerinin önemli prekürsörleri olduğu belirtilmekte ve bu amino asitler farklı bireysel HAA'ların oluşumunda önemli rol oynayabilmektedir (Zamora *et al.* 2013; Hidalgo *et al.* 2021; Hidalgo and Zamora 2022; Li *et al.* 2023). Bu nedenle, HAA prekürsörlerinin farklı kompozisyonlarının, HAA profili ve içeriğinde önemli farklılıklara yol açması anlaşılabilmektedir. Dolayısıyla bahsedilen amino asitlerdeki farklılığın, protein ekstraktı ve protein hidrolizatlarında oluşan HAA profilinde çeşitli farklılıklara sebep olabildiği düşünülmektedir.

Literatürde, üretilen protein izolatlarının ısıya tabi tutulması neticesinde HAA oluşumunun araştırıldığı bazı çalışmalar mevcuttur. Nitekim, Xi and Chen (2021a) farklı sıcaklıklarda (90 – 210°C) ve sürelerde (10 ve 60 dk) fırında ısıtılan soya proteini izolatlarında farklı oranlarda IQ, MeIQx, AαC, DMIP, Trp-P-2, Harman ve Norharman bileşiklerinin oluştuğunu, ancak MeIQ, 4,8-DiMeIOx, 7,8-DiMeIQx, MeAαC, PhIP, Trp-P-1 ve Glu-P-2 bileşiklerinin oluşmadığını rapor etmişlerdir. Aynı araştırma grubu tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, 170°C'de 30 dk süre ile fırında ısıtılan soya proteini izolatlarında Norharman (yaklaşık 90 ng/g) ve Harman (yaklaşık 525 ng/g) bileşiklerinin oluştuğu bildirilmiştir (Xi and Chen 2021b). Benzer şartlarda kuru ısıtılan soya proteini izolatlarının IQ, MeIQx, AαC, DMIP, Harman ve Norharman bileşiklerinin içeriği sırasıyla 20, 70, 40, 8,5, 550 ve 360 ng/g olarak belirlenmiştir (Chen and Xi 2022). Belirtilen çalışmalar ile mevcut araştırmada belirlediğimiz sonuçlar arasındaki farklılığın (HAA profili ve konsantrasyonu); protein kaynağı, protein kompozisyonu, protein üretim metodu, uygulanan ısı işlem vb. faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Mevcut araştırmada et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde elde edilen protein ekstraktları, fraksiyonlanmamış protein hidrolizatları ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarının (<3 kDa) toplam HAA içeriklerine ait varyans analiz sonuçları Tablo 24'te verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi, işlem basamağı, ekstraksiyonun pH değeri ve İşlem basamağı x Ekstraksiyonun pH değeri interaksiyonunun toplam HAA içeriği üzerine çok önemli ($p<0,01$) etkilerinin olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 24. Et Tıraşlama Atıklarından Farklı pH Değerlerinde Elde Edilen Protein Ekstraktları, Fraksiyonlanmamış Protein Hidrolizatları ve Fraksiyonlanmış Protein Hidrolizatlarının (<3 kDa) Toplam HAA İçeriklerine Ait Varyans Analiz Sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
İşlem Basamağı (İ)	2	203,429	6,999**
Ekstraksiyonun pH değeri (E)	7	145,960	5,022**
İ × E	14	79,247	2,727**
Hata	48	29,064	

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, F: Faktör, **: p<0,01

Mevcut araştırmada üretilen örneklerin toplam HAA içerikleri üzerine işlem basamağının etkisini gösteren Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 25'te sunulmuştur. Tablodan da görüldüğü gibi, fraksiyonlanmamış protein hidrolizatlarının toplam HAA içeriğinin protein ekstraktlarının toplam HAA içeriğinden önemli düzeyde yüksek olduğu, buna karşın, fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarının toplam HAA içeriğinin ise protein ekstraktı ve fraksiyonlanmamış protein hidrolizatlarının toplam HAA içeriğinden farklı olmadığı (p>0,05) belirlenmiştir.

Tablo 25. Örneklerin Toplam HAA İçerikleri Üzerine Üretim İşlem Basamaklarının Etkisini Gösteren Duncan Çoklu Karşılaştırma Test Sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

İşlem	n	Toplam HAA içeriği (ng/g)
Protein ekstraktı	24	7,26±5,08 ^b
Fraksiyonlanmamış protein hidrolizatı	24	13,08±10,41 ^a
Fraksiyonlanmış protein hidrolizatı (<3KDa)	24	9,99±4,37 ^{ab}

a-b: farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

Fraksiyonlanmamış protein hidrolizatlarında belirlenen toplam HAA içeriğinin protein ekstraktlarında belirlenen toplam HAA içeriğinden yüksek oluşu; farklı serbest amino asit, peptit ve farklı üretim işleminin uygulanması ile ilgili olabilir. Bilindiği üzere, protein hidrolizatları, hidrolize olmayan proteine (protein ekstraktı) kıyasla daha yüksek miktarda serbest amino asit ve düşük molekül ağırlığına sahip peptitler içermektedir (Chiang *et al.* 2019; Batish *et al.* 2020; Xi and Chen 2021a; Li *et al.* 2023; Xu *et al.* 2024). Bu bileşiklerin HAA oluşumunda önemli bir role sahip olduğu ve bazı amino asitlerin çeşitli HAA bileşiklerinin prekürsörleri olduğu bilinmektedir. Örneğin; fenilalanin PhIP bileşiğinin, metiyonin ve treonin MeIQx bileşiğinin ve triptofan ise β -karbolinlerin ana prekürsörleridir (Zamora *et al.* 2013; Hidalgo *et al.* 2021; Hidalgo and Zamora 2022; Li *et al.* 2023; Aoudeh *et al.* 2024). Bunun yanı sıra, sistein, glisin, treonin ve triptofan gibi bazı amino asitlerin ortamda bulunması durumunda bazı HAA bileşiklerin (örn. PhIP) oluşumunun artabildiği belirlenmiştir (Overvik *et al.* 1989;

Zamora *et al.* 2013). Bu nedenle, hidroliz işlemi ile HAA'ların prekürsörü olarak bilinen serbest amino asit konsantrasyonundaki artışın, HAA oluşumunun artmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, oligopeptitlerin, HAA oluşumunda önemli olan pirazin oluşumunda artırıcı bir etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (Li *et al.* 2023). Öte yandan, protein hidrolizatlarının, serbest radikal giderme özelliği göstermesi neticesinde HAA oluşumunu da engelleyebileceği düşünülebilmektedir (Ahn *et al.* 2012; Chen *et al.* 2012; Chen *et al.* 2021b; Garmidolova *et al.* 2022; Chen *et al.* 2023; Li *et al.* 2023). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda, histidin, lösin, prolin ve lisin gibi nükleofil özellik gösteren bazı amino asitlerin ortamda bulunması durumunda bazı HAA bileşiklerinin (örn. PhIP) oluşumunun engellendiği belirtilmektedir (Linghu *et al.* 2017; Deng *et al.* 2022). Kısaca, hidroliz işlemi HAA oluşumunu iki şekilde etkileyebilmektedir. Bunlardan birincisi; hidroliz işlemi HAA oluşumu için gerekli prekürsörlerin oluşumuna/artmasına neden olabilir. İkincisi ise; serbest radikal giderme yetenekleri ile HAA'ların oluşumunu engelleyici etki de gösterebilmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak HAA oluşumu üzerine, protein hidrolizatlarında HAA prekürsörlerinin varlığı ve protein hidrolizatlarının üretiminde uygulanan ısıtma işleminin (90°C'de 10 dk), ortamda bulunan amino asit ve peptitlerin radikal giderme aktivitesinden daha etkili olduğu ve HAA oluşumunu artırdığı sonucuna varılmıştır.

Mevcut araştırmada, ultrafiltrasyon işlemiyle <3 kDa molekül ağırlığında fraksiyonlanan protein hidrolizatlarının toplam HAA içeriklerinin, protein ekstraktları ile fraksiyonlanmamış protein hidrolizatlarının toplam HAA içeriklerinden istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p>0,05$) belirlenmiştir. Ultrafiltrasyon işlemi protein hidrolizatlarının toplam HAA içeriğinde bir azalmaya neden olmuş, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı gözlenmiştir. Ultrafiltrasyon işlemiyle <3 kDa molekül ağırlığında fraksiyonlanan protein hidrolizatlarının toplam HAA içeriğinde görülen azalmanın ultrafiltrasyon işlemi sırasında 3 kDa'dan yüksek olan peptitler ile proteinlere bağlı HAA'ların ortadan kaldırılmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Mevcut araştırmada üretilen örneklerin toplam HAA içerikleri üzerine protein ekstraksiyonunda uygulanan pH değerinin etkisini gösteren Duncan Çoklu karşılaştırma test sonuçları Tablo 26'da verilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi, en yüksek toplam HAA içeriği (18,19 ng/g) 2,5 pH değerinde ekstrakte edilen proteinlerden üretilen protein hidrolizatlarında belirlenmiştir ($p<0,05$). Üretim sırasında uygulanan pH değeri ile protein ekstraktı ve protein hidrolizatlarının HAA içeriği arasında doğrusal olmayan bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir. Bu bağlamda, genel olarak, ekstraksiyon pH değerinin artması ile toplam HAA içeriğinin azaldığı belirtilebilir. Elde edilen sonuçların, HAA oluşumunda prekürsör olarak kullanılan amino asit

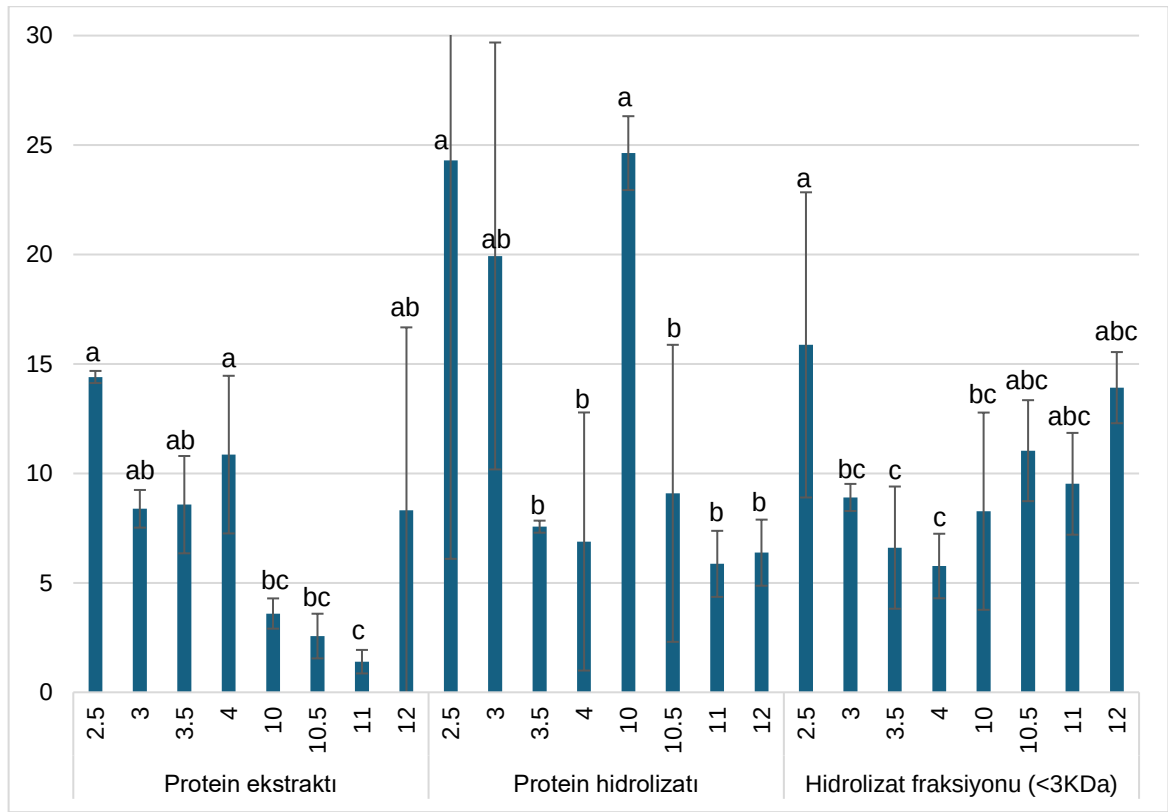
ve oligopeptitlerin varlığı, profili ve konsantrasyonuna bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu bağlamda, çeşitli ürünlerde farklı pH değerleri kullanılarak farklı proteinler ve dolayısıyla farklı amino asitlerin ekstrakte edilebildiği belirtilmiştir. Nitekim, Guoyuan *et al.* (2016) tavuk karaciğerinden protein ekstraksiyonunda asidik (pH 2,0, 2,5, 3,0 ve 3,5) ve alkali (pH 10,5, 11,0, 11,5 ve 12,0) koşulların uygulanmasıyla farklı protein kategorilerinin ekstrakte edildiğini ve alkali ekstraktta daha yüksek myosin (ağır zincir) ve aktin konsantrasyonunun bulunduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, pH değerinin 8'den 12'ye yükselmesi durumunda bira posasından elde edilen protein ekstraktının amino asit profilinin önemli ölçüde değiştiği de belirtilmiştir (Hadinoto *et al.* 2024).

Tablo 26. Mevcut Araştırmada Üretilen Örneklerin Toplam HAA İçerikleri Üzerine Protein Ekstraksiyonunda Uygulanan pH Değerinin Etkisini Gösteren Duncan Çoklu Karşılaştırma Test Sonuçları ($\bar{x} \pm SD$)

pH değeri	n	Toplam HAA içeriği (ng/g)
2,5	9	18,19±10,79 ^a
3	9	12,41±7,48 ^b
3,5	9	7,58±1,98 ^b
4	9	7,84±4,22 ^b
10	9	12,17±9,87 ^b
10,5	9	7,57±5,28 ^{bc}
11	9	5,60±3,80 ^c
12	9	9,54±5,49 ^b

a-c: farklı harfle işaretlenmiş ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p<0,05)

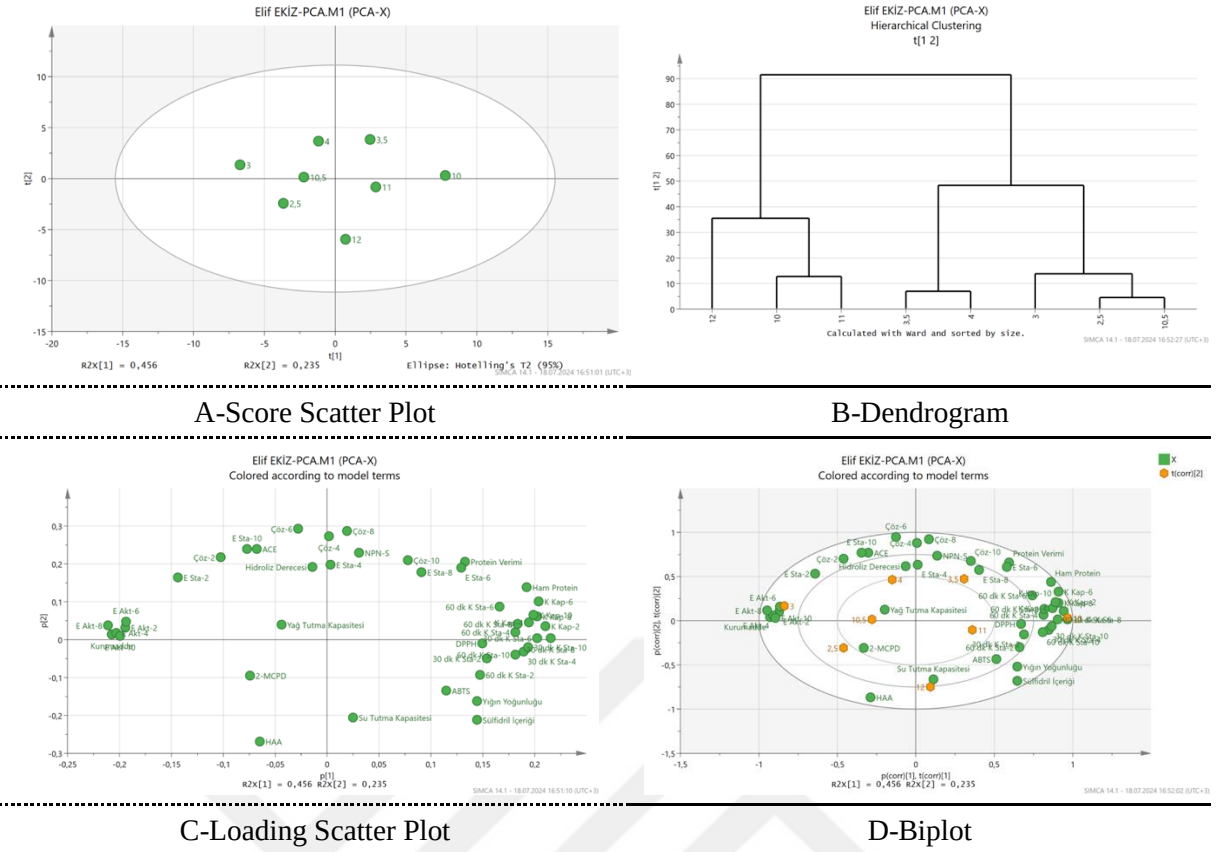
Et tıraşlama atıklarından elde edilen protein ekstraktları, fraksiyonlanmamış protein hidrolizatları ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatlarının (<3 kDa) üretiminde uygulanan İşlem basamağı × Ekstraksiyonun pH değeri interaksiyonunun etkisi Şekil 34'te gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, düşük pH değeri (2,5) uygulanması durumunda elde edilen tüm ürünlerde (protein ekstraktı, fraksiyonlanmamış protein hidrolizatları ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatları) genellikle daha yüksek toplam HAA içeriği gözlenmiştir. Bu sonucun, HAA prekürsörlerinin varlığının ve kullanılabilirliğinin artması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 34. Protein ekstraktı ve protein hidrolizatlarının üretiminde uygulanan işlem × pH değeri interaksiyonunun toplam HAA içeriği üzerine etkisi (ng/g) ($\bar{x} \pm SD$)

Protein Hidrolizatlarında Yapılan Analizlere Ait Temel Bileşen Analizi Sonuçları

Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatlarında yapılan kalite kriterleri, fonksiyonel özellikler ve gıda toksikantları analizlerinin daha detaylı bir şekilde değerlendirilmesi amacıyla yapılan temel bileşen analizi (Principal Component Analysis, PCA) sonuçları Şekil 35'te (A: Score Scatter Plot, B: Dendrogram, C: Loading Scatter Plot ve D: Biplot) verilmiştir. Şekilden de görüldüğü üzere, PC1= %45,6 ve PC2= %23,5 olmak üzere ilk iki temel bileşen toplam varyansın %69,1'ini nitelemektedir. Et tıraşlama atıklarından farklı pH değerlerinde (2,5, 3, 3,5, 4, 10, 10,5, 11 ve 12) ekstrakte edilen proteinlerin enzimatik hidrolizi sonucu üretilen protein hidrolizatları iki gruba ayrılmıştır (Şekil 35-A ve Şekil 35-B). Bu bağlamda, 10, 11 ve 12 pH değerlerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatları ve 2,5, 3, 3,5, 4 ve 10,5 pH değerlerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatları olmak üzere 2 grup meydana gelmiştir (Şekil 35-B). Nitekim, burada protein hidrolizatları arasında önemli farklılıkların olması iki gruba ayrılmasıyla açıklanabilmektedir.



Şekil 35. Temel bileşen analizi

Şekil 35-C’den de görüldüğü gibi parselin sağ üst kısmında ham protein içeriği, NPN-S içeriği, protein verimi, köpürme kapasitesi (analizin pH’sı 2, 4, 6, 8 ve 10), köpürme stabilitesi₃₀ (analizin pH’sı 6 ve 10), köpürme stabilitesi₆₀ (analizin pH’sı 4, 6 ve 8), emülsiyon stabilite indeksi (analizin pH’sı 4, 6 ve 8) ve çözünürlük (analizin pH’sı 4, 8 ve 10) analiz sonuçları toplanmış ve protein hidrolizatlarında bu parametreler arasında pozitif korelasyon sergilenmiştir. Benzer şekilde Noman *et al.* (2018) protein hidrolizatlarının emülsiyon özelliklerinin çözünürlüğün yanı sıra hidroliz derecesi, pH ve enzim çeşidiyle ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Parselin sağ alt kısmında ise DPPH serbest radikal giderme aktivitesi, ABTS serbest radikal giderme aktivitesi, yığın yoğunluğu, toplam SH içeriği, su tutma kapasitesi, köpürme stabilitesi₃₀ (analizin pH’sı 2, 4 ve 8) ve köpürme stabilitesi₆₀ (analizin pH’sı 2 ve 10) analiz sonuçları kümelenmiş ve protein hidrolizatlarında bu parametreler arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir.

Parselin sol üst kısmında kurumadde içeriği, hidroliz derecesi, ACE inhibitör aktivite değeri, yağ tutma kapasitesi, emülsiyon aktivite indeksi (analiz pH’sı 2, 4, 6, 8 ve 10), emülsiyon stabilite indeksi (analizin pH’sı 2 ve 10) ve çözünürlük (analizin pH’sı 2 ve 6) analizleri kümelenmiş ve protein hidrolizatlarında bu parametreler arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. İlaveten, parselin sol üst kısmında kümelenen bu analiz sonuçları bakımından 3,

4 ve 10,5 pH değerlerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının diğer protein hidrolizatlarına kıyasla daha üstün olduğu Şekil 35-D'den anlaşılmaktadır. Klompong *et al.* (2007) proteinlerin küçük peptitlere parçalanmasının yanı sıra yüksek hidroliz derecesine sahip olmalarını yüksek çözünürlük özelliğiyle ilişkilendirmişlerdir. Parselin sol alt kısmında ise sadece 2-MCPD ve HAA içeriği kümelenmiş ve protein hidrolizatlarında bu parametreler arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir.

Bununla birlikte, 10 pH değerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının ham protein, köpürme kapasitesi (analizin pH'sı 2, 4, 8 ve 10), köpürme stabilitesi₃₀ (analizin pH'sı 4, 6, 8 ve 10) ve köpürme stabilitesi₆₀ (analizin pH'sı 4, 6, 8 ve 10) analizleri açısından diğer protein hidrolizatlarına kıyasla üstün olduğu ve bir arada toplandığı gözlenmiştir. Taheri *et al.* (2013) protein hidrolizatlarının iyi bir köpürme yeteneğine sahip olmasında protein konsantrasyonunun ve molekül ağırlığının önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Ayrıca yüksek asidik veya alkali pH değerlerinde iyonik itme gücü nedeniyle peptitlerin birbirini iterek köpük stabilitesini etkileyebileceğini rapor etmişlerdir. 3 pH değerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının kurumadde ve emülsifiye edici aktivite indeksi (analiz pH'sı 2, 4, 6, 8 ve 10) ile bir arada kümelenmesi, bu örneğin bahsi geçen analizler açısından diğer protein hidrolizatlarına kıyasla daha yüksek değere sahip olduğunu nitelemektedir. Benzer şekilde, 12 pH değerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesi değerlerinin diğer protein hidrolizatlarına kıyasla yüksek olması birlikte kümelenmesiyle ifade edilebilmektedir. İlaveten, parselin sol alt kısmında kümelenen bu analiz sonuçları bakımından 2,5 pH değerinde yapılan protein ekstraksiyonunun ardından üretilen protein hidrolizatlarının diğer protein hidrolizatlarına kıyasla daha yüksek değerlere sahip olduğu Şekil 35-D'den görülmektedir. Sonuç olarak, farklı pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerden alkalaz kullanılarak enzimatik hidrolizle protein hidrolizatı üretiminin kalite kriterleri, fonksiyonel özellikler ve gıda toksikantları açısından değişken etkilere sahip olduğu kanıtlanmıştır. Protein hidrolizatlarının fonksiyonel özellikleri üzerinde hammadde bileşimi, hidroliz derecesi, düşük molekül ağırlıklı peptitlerin varlığı, enzim çeşidi, enzim:substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve süre gibi pek çok parametre etkili olmaktadır (Klompong *et al.* 2007; Bordbar *et al.* 2018; Mahdabi and Shekarabi 2018). Bu bağlamda, farklı pH değerlerinde ekstraksiyon işleminde farklı proteinlerin elde edilmesinin yanı sıra protein ekstraksiyonu aşamasında uygulanan homojenizasyon, santrifüj ve filtreleme gibi işlemlerin de protein hidrolizatlarının fonksiyonel ve kalite özelliklerini etkilediği düşünülmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Et tıraşlama atıklarından enzimatik hidroliz yöntemiyle farklı proses koşulları altında üretilen protein hidrolizatlarının çeşitli fonksiyonel özellikleri ile gıda toksikantları açısından durumunun irdelendiği bu çalışmada, farklı pH değerlerinde protein ekstraksiyonunun esas alındığı sekiz farklı muamele grubu oluşturulmuştur. Muamele grubu örnekleri alkalaz enzimi ile hidroliz edilmiş, ardından ultrafiltrasyon işlemine tabi tutularak molekül ağırlığı <3 kDa olan hidrolizat fraksiyonları elde edilmiştir. Elde edilen hidrolizat fraksiyonları kurumadde, ham protein ve NPN-S içerikleri, hidroliz derecesi, protein verimi, toplam SH miktarı, SDS-PAGE profili, antioksidan aktivite, köpürme kapasitesi ve stabilitesi, emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi indeksi, yığın yoğunluğu, çözünürlük, su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi, ACE inhibitör aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca hidrolizat üretim aşamalarının gıda toksikantları açısından değerlendirilebilmesi amacıyla protein ekstraksiyonu, hidroliz sonrası (fraksiyonlanmamış protein hidrolizatı) ve ultrafiltrasyon sonrası (fraksiyonlanmış protein hidrolizatı) olmak üzere 3 ayrı işlem basamağında kloropropanol esterleri ve HAA içerikleri açısından analiz edilmiştir. Araştırma neticesinde elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

- 1) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının kurumadde içeriği üzerinde önemli etkiye sahip olmadığı ($p>0,05$) ve örneklerin ortalama kurumadde içeriklerinin %92,11 – 95,36 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.
- 2) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının ham protein içeriği üzerinde çok önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu ve örneklerin ortalama ham protein içeriklerinin %53,06 – 68,77 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir.
- 3) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının NPN-S içeriği üzerinde çok önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu ve örneklerin ortalama NPN-S içeriklerinin %5,98 – 7,66 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.
- 4) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının hidroliz derecesi üzerinde çok önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu ve örneklerin ortalama hidroliz derecelerinin %15,88 – 40,83 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir.

- 5) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının protein verimi üzerinde çok önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu ve örneklerin ortalama protein verimlerinin %42,92 – 52,94 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.
- 6) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının toplam SH içeriği üzerinde önemli ($p<0,05$) etkiye sahip olduğu ve örneklerin ortalama toplam SH içeriğinin 44,21 – 80,05 $\mu\text{mol/g}$ arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir.
- 7) Farklı pH değerlerinde protein ekstraksiyonunun, protein hidrolizatlarında farklı SDS-PAGE profillerinin ortaya çıkmasına ve benzer bantların bant yoğunluklarında çeşitli varyasyonların gözlenmesine neden olduğu belirlenmiştir. Genel olarak asidik pH ekstraksiyonunun, molekül ağırlığı 40 – 1,7 kDa aralığında değişen geniş bir bant profili sergilediği (34,1, 31,5, 29, 25,4, 22,3, 19,3, 12,8, 6,5, 5,5, 3,7, 2,9, 2,2, 1,7 kDa) gözlenmiştir. Asidik ekstraksiyonun aksine alkali ekstraksiyonla elde edilen proteinlerin hidrolizi neticesinde oluşan hidrolizatlarda daha az sayıda bant fragmentasyonu gözlenmiştir. Bu gruba ait örneklerin yüksek molekül ağırlıklı bant profilinin oldukça zayıf olduğu, düşük molekül ağırlıklı (6,9, 5,7, 4,9 kDa) proteinlerde ise bant yoğunluğunun yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, tüm alkali ekstraksiyon gruplarında molekül ağırlığı 1,7 kDa'dan düşük olan 2 adet protein bandı olduğu ve bu bantların bant yoğunluklarının 10,5, 11 ve 12 pH değerlerinde ekstrakte edilen proteinlerin hidrolizi ile elde edilen örneklerde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Söz konusu bantlar asidik grupta, 3 ve 4 pH değerlerinde ekstrakte edilen örneklerden elde edilen protein hidrolizatlarında tespit edilmiştir.
- 8) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının DPPH ve ABTS serbest radikal giderme aktiviteleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı ($p>0,05$) saptanmıştır. Protein hidrolizatlarının DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ortalama IC_{50} değerleri 6,39 – 14,57 mg/mL arasında değişirken, ABTS serbest radikal giderme aktivitesi ortalama IC_{50} değerleri ise 20,66 – 26,84 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişim göstermiştir.
- 9) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının köpürme kapasitesi, köpürme stabilitesi (30. dk) ve köpürme stabilitesi (60. dk) değerleri üzerinde çok önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Protein hidrolizatlarının ortalama

köpürme kapasitesi (analiz pH değeri 2, 4, 6, 8 ve 10) %38,09 – 125,04 arasında, köpürme stabilitesi (30. dk) (analiz pH değeri 2, 4, 6, 8 ve 10) değerleri %25,43 – 92,17 arasında ve köpürme stabilitesi (60. dk) (analiz pH değeri 2, 4, 6, 8 ve 10) değerleri ise %17,48 – 66,54 arasında değişim göstermiştir.

- 10) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının emülsiyon aktivite indeksi üzerinde çok önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu belirlenirken, emülsiyon stabilite indeksi üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Protein hidrolizatlarının ortalama emülsiyon aktivite indeksi (analiz pH değeri 2, 4, 6, 8 ve 10) değerleri 12,14 – 16,44 m²/g arasında değişirken, emülsiyon stabilite indeksi (analiz pH değeri 2, 4, 6, 8 ve 10) değerleri 43,26 – 60,03 dk arasında değişiklik göstermiştir.
- 11) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının yığın yoğunluğu üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$). Protein hidrolizatlarının ortalama yığın yoğunluğu değerleri 0,19 – 0,34 g/mL arasında değişiklik göstermiştir.
- 12) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının çözünürlükleri üzerinde çok önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Protein hidrolizatlarının ortalama çözünürlük (analiz pH değeri 2, 4, 6, 8 ve 10) değerleri %64,52 – 88,64 arasında değişim göstermiştir.
- 13) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının su tutma kapasitesi üzerinde çok önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu belirlenmiş ve protein hidrolizatlarının ortalama su tutma kapasitesi değerleri 0,28 – 1,58 g su/g protein arasında değişim göstermiştir.
- 14) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının yağ tutma kapasitesi üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı ($p>0,05$) belirlenirken, protein hidrolizatlarının ortalama yağ tutma kapasitesi değerleri 1,45 – 2,02 g yağ/g protein arasında değişim göstermiştir.
- 15) Protein hidrolizatı üretiminde farklı pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin, protein hidrolizatlarının ACE inhibitör aktivitesi üzerinde çok önemli ($p<0,01$) etkiye sahip olduğu belirlenmiş ve protein hidrolizatlarının

ortalama ACE inhibitör aktivite değerlerinin %6,31 – 32,38 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir.

- 16) Hidrolizat üretim aşamasının, 3-MCPD bileşiği üzerinde önemli bir etki göstermediği ($p>0,05$), ancak 2-MCPD bileşiği içeriği üzerinde çok önemli bir etkiye ($p<0,01$) sahip olduğu belirlenmiştir. 3-MCPD bileşiği analiz edilen hidrolizat örneklerin hiçbirinde tespit edilememiştir ($<LOD$). 2-MCPD bileşiği ise, protein ekstraktlarında ve ultrafiltrasyon işlemine tabi tutulmuş fraksiyonlarda (<3 kDa) tespit edilemezken ($<LOD$), fraksiyonlanmamış protein hidrolizatlarında ortalama 183,73 ppb seviyesinde tespit edilmiştir. Ekstraksiyon pH değerinin etkisinin incelendiği koşullarda ise ortalama $nd - 101,37$ ppb seviyeleri arasında 2-MCPD bileşiği belirlenmiştir.
- 17) Analizi yapılan örneklerin tamamında IQx bileşiği ($0,06 - 1,31$ ng/g) belirlenirken, değişen düzeylerde diğer HAA'lar da (IQ ($nd - 2,94$ ng/g), MeIQx ($nd - 8,04$ ng/g), MeIQ ($nd - 4,61$ ng/g), 7,8-DiMeIQx ($nd - 6,62$ ng/g), 4,8-DiMeIQx ($nd - 2,76$ ng/g), PhIP ($nd - 36,94$ ng/g), AαC ($nd - 4,80$ ng/g) ve MeAαC ($nd - 4,47$ ng/g)) belirlenmiştir. Protein hidrolizatı üretim işlem basamağı ve protein ekstraksiyonunda uygulanan pH değerinin toplam HAA içeriği üzerine çok önemli ($p<0,01$) etkilerinin olduğu belirlenmiştir. En yüksek toplam HAA içeriği sırasıyla; fraksiyonlanmamış protein hidrolizatları (ortalama $13,08$ ng/g) $\geq$ fraksiyonlanmış protein hidrolizatları (ortalama $9,99$ ng/g) $\geq$ protein ekstraktlarında (ortalama $7,26$ ng/g) belirlenmiştir. Ayrıca düşük pH değeri ($2,5$) uygulanması durumunda elde edilen ürünlerin (protein ekstraktı, fraksiyonlanmamış protein hidrolizatları ve fraksiyonlanmış protein hidrolizatları) genellikle daha yüksek toplam HAA içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Mevcut araştırma bulguları neticesinde, et tıraşlama atıklarından protein hidrolizatı üretiminde asidik veya alkali pH değerlerinde uygulanan protein ekstraksiyonu işleminin protein hidrolizatlarının incelenen kalite kriterleri ve fonksiyonel özellikleri üzerinde farklı etkiler sergilediği tespit edilmiştir. Ham protein içeriği açısından; 3,5, 4, 10 ve 11 pH değerlerinde gerçekleştirilen ekstraksiyonun ardından üretilen protein hidrolizatlarının, NPN-S içeriği açısından; 4 pH değerinde gerçekleştirilen ekstraksiyonun ardından üretilen protein hidrolizatlarının, hidroliz derecesi açısından; 4, 3,5 ve 10,5 pH değerlerinde gerçekleştirilen ekstraksiyonun ardından üretilen protein hidrolizatlarının, protein verimi açısından; 4, 3,5, 10 ve 11 pH değerlerinde gerçekleştirilen ekstraksiyonun ardından üretilen protein hidrolizatlarının, köpürme kapasitesi açısından; 3,5 ve 10 pH değerlerinde gerçekleştirilen ekstraksiyonun ardından üretilen protein hidrolizatlarının, emülsiyon aktivitesi açısından;

özellikle 2,5 ve 3 pH değerlerinde gerçekleştirilen ekstraksiyonun ardından üretilen protein hidrolizatlarının, çözünürlük açısından; özellikle 3,5 ve 4 pH değerlerinde gerçekleştirilen ekstraksiyonun ardından üretilen protein hidrolizatlarının, su tutma kapasitesi açısından; 12 pH değerinde gerçekleştirilen ekstraksiyonun ardından üretilen protein hidrolizatlarının, ACE inhibitör aktivitesi açısından; 3, 3,5, 4 ve 11 pH değerlerinde gerçekleştirilen ekstraksiyonun ardından üretilen protein hidrolizatlarının daha etkili olduğu belirlenmiştir. Öte yandan, kurumadde, DPPH radikal giderme aktivitesi, ABTS radikal giderme aktivitesi, yığın yoğunluğu ve yağ tutma kapasitesi açısından üretilen protein hidrolizatları arasında bir farklılık tespit edilmemiştir. Öte yandan, et tıraşlama atıklarından protein hidrolizatı üretiminde, hidrolizatların toksik bileşikler bakımından durumu ilk kez ortaya konmuştur. Bu kapsamda yapılan mevcut araştırmanın sonuçları, üretim aşamasına bağlı olarak 2-MCPD'nin protein hidrolizatlarında değişen seviyelerde oluştuğunu, HAA'ların ise tüm üretim aşamalarında yine değişen seviyelerde oluştuğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, et tıraşlama atıklarından üretilen protein hidrolizatlarının çeşitli endüstri kollarında emülsifiye edici, köpük oluşturunca, yağ tutucu ve su tutucu ajanlar olarak kullanım potansiyelinin bulunduğu, yine ACE inhibitör aktivite ve antioksidan aktivite özellikleri nedeniyle halihazırda kullanılan sentetik antihipertansif ilaçlar ile antioksidan maddelerin yan etkilerinden kaçınmak için ikame ürünler olarak değerlendirilme potansiyeline sahip olduğu söylenebilir. Bununla birlikte, protein hidrolizatlarının üretim aşamalarında ısıt işlemlerinin kontaminantlarının oluşumu nedeniyle, bu ürünlerin üretimlerinde gıda güvenliği noktasını da dikkate alan optimizasyon çalışmalarının gerekli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M. and Undeland, I., 2019. Physicochemical and gel-forming properties of protein isolated from salmon, cod and herring by-products using the pH-shift method. *LWT-Food Science and Technology*, 101, 678-684. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.087>
- Abeer, M.M., Trajkovic, S. and Brayden, D.J., 2021. Measuring the oral bioavailability of protein hydrolysates derived from food sources: A critical review of current bioassays. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 144, 112275. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112275>
- Abu-El-Haj, S., Bogusz, M.J., Ibrahim, Z., Hassan, H. and Al Tufail, M., 2007. Rapid and simple determination of chloropropanols (3-MCPD and 1, 3-DCP) in food products using isotope dilution GC-MS. *Food Control*, 18(1), 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.08.014>
- Aeenehvand, S., Toudehrousta, Z., Kamankesh, M., Mashayekh, M., Tavakoli, H.R. and Mohammadi, A., 2016. Evaluation and application of microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of polar heterocyclic aromatic amines in hamburger patties. *Food Chemistry*, 190, 429-435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.103>
- Ahn, C.-B., Je, J.-Y. and Cho, Y.-S., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Research International*, 49(1), 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.002>
- Alaejos, M. and Afonso, A., 2011. Factors that affect the content of heterocyclic aromatic amines in foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 52-108. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00141.x>
- Albuquerque, T.G., Costa, H.S., Silva, M.A. and Oliveira, M.B.P., 2020. Are chloropropanols and glycidyl fatty acid esters a matter of concern in palm oil?. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 494-514. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.005>
- Álvarez, C., Lélou, P., Lynch, S.A. and Tiwari, B.K., 2018. Optimised protein recovery from mackerel whole fish by using sequential acid/alkaline isoelectric solubilization precipitation (ISP) extraction assisted by ultrasound. *LWT*, 88, 210-216. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.045>
- Alves, F.E.D.S.B., Carpiné, D., Teixeira, G.L., Goedert, A.C., Scheer, A.D.P. and Ribani, R.H., 2021. Valorization of an abundant slaughterhouse by-product as a source of highly technofunctional and antioxidant protein Hydrolysates. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 263-279. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00985-8>
- Amiri, A., Sharifian, P., Morakabati, N., Mousakhani-Ganjeh, A., Mirtaheri, M., Nilghaz, A., Guo, Y.G. and Pratap-Singh, A., 2021. Modification of functional, rheological and structural characteristics of myofibrillar proteins by high-intensity ultrasonic and papain treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 72, 102748. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102748>
- Amiza, M.A., Ow, Y.W. and Faazaz, A.L., 2013. Physicochemical properties of silver catfish (*Pangasius* sp.) frame hydrolysate. *International Food Research Journal*, 20(3), 1255-1262.

- Anonymous, 1989. Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach 35 LMBG. Untersuchung von Lebensmitteln. Bestimmung des Gehaltes an Nichtprotein-Stickstaffsubstanz in Fleischerzeugnissen.
- Anonymous, 2005. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/10490>.
- Aoudeh, E., Oz, E. and Oz, F., 2024. Understanding the heterocyclic aromatic amines: An overview and recent findings. In *Advances in Food and Nutrition Research*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2024.02.002>
- Araujo, M., Beekman, J.K., Mapa, M.S.T., MacMahon, S., Zhao, Y., Flynn, T.J., Flannery, B., Mossoba, M.E., and Sprando, R.L. 2020., Assessment of intestinal absorption/metabolism of 3-chloro-1, 2-propanediol (3-MCPD) and three 3-MCPD monoesters by Caco-2 cells. *Toxicology in Vitro*, 67, 104887. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104887>
- Arihara, K., Yokoyama, I. and Ohata, M., 2021. Bioactivities generated from meat proteins by enzymatic hydrolysis and the Maillard reaction. *Meat Science*, 180, 108561. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108561>
- Arris, F.A., Thai, V.T.S., Manan, W.N. and Sajab, M.S., 2020. A revisit to the formation and mitigation of 3-chloropropane-1, 2-diol in palm oil production. *Foods*, 9(12), 1769. <https://doi.org/10.3390/foods9121769>
- Aspevik, T., 2016. Fish protein hydrolysates based on Atlantic Salmon by-products. Enzyme cost-efficiency and characterization of sensory, surface-active and nutritional properties. PhD Thesis, Dissertation for the degree of philosophiae doctor (PhD) at the University of Bergen.
- Babbitt, C.W., Neff, R.A., Roe, B.E., Siddiqui, S., Chavis, C. and Trabold, T.A., 2022. Transforming wasted food will require systemic and sustainable infrastructure innovations. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 54, 101151. <https://doi.org/10.1016/j.cosust.2022.101151>
- Balti, R., Bougatef, A., El-Hadj Ali, N., Zekri, D., Barkia, A. and Nasri, M., 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12), 2006-2014. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4045>
- Batish, I., Brits, D., Valencia, P., Miyai, C., Rafeeq, S., Xu, Y., Galanopoulos, M., Sismour, E. and Ovissipour, R., 2020. Effects of enzymatic hydrolysis on the functional properties, antioxidant activity and protein structure of black soldier fly (*Hermetia illucens*) protein. *Insects*, 11(12), 876. <https://doi.org/10.3390/insects11120876>
- Batista, I., Pires, C. and Nelhas, R., 2007. Extraction of sardine proteins by acidic and alkaline solubilisation. *Food Science and Technology International*, 13(3), 189-194. <https://doi.org/10.1177/10820132013207079619>
- Bezus, B., Ruscasso, F., Garmendia, G., Vero, S., Cavello, I. and Cavalitto, S., 2021. Revalorization of chicken feather waste into a high antioxidant activity feather protein hydrolysate using a novel psychrotolerant bacterium. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, 101925. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101925>
- Bhaskar, N., Modi, V.K., Govindaraju, K., Radha, C. and Lalitha, R.G., 2007. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology*, 98(2), 388-394. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.017>

- Bielecka, M., Cichosz, G. and Czczot, H., 2022. Antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities of bovine milk proteins and their hydrolysates-A review. *International Dairy Journal*, 127, 105208. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105208>
- Bonilla, F., Garcia, A., Calumba, K., Reyes, V. and Sathivel, S., 2022. Functional and morphological characterization of undersized crawfish minced meat hydrolysate powders produced with alkaline protease and bacterial protease. *Food Structure*, 31, 100250. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2022.100250>
- Bordbar, S., Ebrahimpour, A., Zarei, M., Hamid, A.A. and Saari, N., 2018. Alcalase-generated proteolysates of stone fish (*Actinopyga lecanora*) flesh as a new source of antioxidant peptides. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 1541-1559. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1497060>
- Borges, S., Piccirillo, C., Scalera, F., Martins, R., Rosa, A., Couto, J.A., Almeida, A. and Pintado, M., 2022. Valorization of porcine by-products: a combined process for protein hydrolysates and hydroxyapatite production. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00522-6>
- Bougatef, H., Sila, A., Bougatef, A. and Martínez-Alvarez, O., 2024. Protein Hydrolysis as a way to valorise squid-processing byproducts: obtaining and identification of ACE, DPP-IV and PEP inhibitory peptides. *Marine Drugs*, 22(4), 156. <https://doi.org/10.3390/md22040156>
- Brereton, P., Kelly, J., Crews, C., Honour, S. and Wood, R., 2001. Determination of 3-chloro-1, 2-propanediol in foods and food ingredients by gas chromatography with mass spectrometric detection: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84(2), 455-465. <https://doi.org/10.1093/jaoac/84.2.455>
- Bui, X.D., Vo, C.T., Bui, V.C., Pham, T.M., Bui, T.T.H., Nguyen-Sy, T., Nguyen, T.D.P., Chew, K.W., Mukatova, M.D. and Show, P.L., 2021. Optimization of production parameters of fish protein hydrolysate from *Sarda Orientalis* black muscle (by-product) using protease enzyme. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 23, 31-40. <https://doi.org/10.1007/s10098-020-01867-2>
- Bulan, R. and Oz, F., 2022. Impact of tarragon usage on lipid oxidation and heterocyclic aromatic amine formation in meatball. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(2), 942-950. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15430>
- Chai, Q., Karangwa, E., Duhoranimana, E., Zhang, X., Xia, S. and Yu, J., 2018. Tallow beef flavor: Effect of processing conditions and ingredients on 3-chloropropane-1, 2-diol esters generation, and sensory characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(1), 1700337. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700337>
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V. and Kumar, B.D., 2015. Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 5817-5825. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1714-6>
- Chalamaiah, M., Kumar, B.D., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020-3038. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>
- Chalamaiah, M., Ulug, S.K., Hong, H. and Wu, J., 2019. Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. *Journal of Functional Foods*, 58, 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.050>

- Chalamaiah, M., Yu, W. and Wu, J., 2018. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food Chemistry*, 245, 205-222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.087>
- Chantarasuwan, C., Benjakul, S. and Visessanguan, W., 2011. The effects of sodium bicarbonate on conformational changes of natural actomyosin from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 129(4), 1636-1643. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.023>
- Chen, C., Chi, Y.-J., Zhao, M.-Y. and Xu, W., 2012. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 21(1), 27-34. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0004-6>
- Chen, H., Tsao, C., Chang, Y. and Lee, W., 2021a. Occurrence of thermally induced glycidyl esters and 3-monochloropropane-1,2-diol esters in refined oils and pressed oils manufactured by different processes and associated with human health risks in Taiwan. *Food Chemistry*, 360, 130053. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130053>
- Chen, H.-J., Dai, F.-J., Chen, C.-Y., Fan, S.-L., Zheng, J.-H., Chau, C.-F., Lin, Y.-S. and Chen, C.-S., 2023. Effects of molecular weight fraction on antioxidation capacity of rice protein hydrolysates. *Scientific Reports*, 13(1), 3464. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14314-7>
- Chen, H.-J., Dai, F.-J., Chen, C.-Y., Fan, S.-L., Zheng, J.-H., Huang, Y.-C., Chau, C.-F., Lin, Y.-S. and Chen, C.-S., 2021b. Evaluating the antioxidants, whitening and antiaging properties of rice protein hydrolysates. *Molecules*, 26(12), 3605. <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/12/3605>
- Chen, Y. and Xi, J., 2022. Effects of the non-covalent interactions between polyphenols and proteins on the formations of the heterocyclic amines in dry heated soybean protein isolate. *Food Chemistry*, 373, 131557. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131557>
- Cheng, D., Liu, Y., Ngo, H.H., Guo, W., Chang, S.W., Nguyen, D.D., Zhang, S., Luo, G. and Bui, X.T., 2021. Sustainable enzymatic technologies in waste animal fat and protein management. *Journal of Environmental Management*, 284, 112040.
- Chi, C.F., Cao, Z.H., Wang, B., Hu, F.Y., Li, Z.R. and Zhang, B., 2014. Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*, 19(8), 11211-11230. <https://doi.org/10.3390/molecules190811211>
- Chiang, J.H., Loveday, S.M., Hardacre, A.K. and Parker, M.E., 2019. Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo-and exoproteases. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(1), 111-120. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13911>
- Chiang, J.H., Loveday, S.M., Hardacre, A.K. and Parker, M.E., 2019. Effects of enzymatic hydrolysis treatments on the physicochemical properties of beef bone extract using endo- and exoproteases. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(1), 111-120. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13911>
- Chiang, W.D., Shih, C.J. and Chu, Y.H., 1999. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chemistry*, 65(2), 189-194. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00193-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00193-9)
- Chotikachinda, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Rustad, T. and Kumarnsit, E., 2013. Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition*, 19, 773-784.

- Chung, S.W.C., Kwong, K.P., Yau, J.C.W., Wong, A.M.C. and Xiao, Y., 2008. Chloropropanols levels in foodstuffs marketed in Hong Kong. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(7), 569-573. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.04.010>
- Collier, P.D., Cromie, D.D.O. and Davies, A.P., 1991. Mechanism of formation of chloropropanols present in protein Hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 785-790.
- Crews, C., Hough, P., Brereton, P., Harvey, D., Macarthur, R. and Matthews, W., 2002. Survey of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in selected food groups, 1999-2000. *Food Additives & Contaminants*, 19(1), 22-27. <https://doi.org/10.1080/02652030110085395>
- Cui, X., Zhang, L., Yang, D., Li, J., Liu, Q., Sui, H., Liu, Z. and Zhou, P., 2021a. Occurrence of 3-and 2-monochloropropanediol esters in infant formulas in China and exposure assessment. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(9), 1470-1480. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1925164>
- Cui, X., Zhang, L., Zhou, P., Liu, Z., Fan, S., Yang, D., Li, J. and Liu, Q., 2021b. Dietary exposure of general Chinese population to fatty acid esters of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) from edible oils and oil-containing foods. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(1), 60-69. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1834151>
- Custodio-Mendoza, J.A., Ramos, A., Lorenzo, R.A. and Carro, A.M., 2023. Ultrasound-assisted enzymatic indirect determination of total 3-monochloropropane-1, 2-diol esters in canned fish oil fraction. *Food Chemistry*, 403, 134423. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134423>
- Damodaran, S., 1996. Amino acids, peptides, and proteins. In *Food chemistry* (pp. 321-429). Springer, Boston, MA.
- Daud, N.A., Babji, A.S. and Yusop, S.M. 2015. Effects of enzymatic hydrolysis on the antioxidative and antihypertensive activities from red tilapia fish protein. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 5(4), 387. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9600.1000387>
- de Queiroz, A.L.M., Bezerra, T.K.A., de Freitas Pereira, S., da Silva, M.E.C., de Almeida Gadelha, C.A., Gadelha, T.S., Pacheco, M.T.B. and Madruga, M.S., 2017. Functional protein hydrolysate from goat by-products: Optimization and characterization studies. *Food Bioscience*, 20, 19-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2017.07.009>
- Deng, P., Xue, C., He, Z., Wang, Z., Qin, F., Oz, E., Chen, J., El Sheikha, A.F., Proestos, C., Oz, F. and Zeng, M., 2022. Synergistic inhibitory effects of selected amino acids on the formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in both benzaldehyde– and phenylacetaldehyde–creatinine model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(35), 10858-10871. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c03122>
- Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F.J., Zhang, W. and Lorenzo, J.M., 2019. A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8(10), 429. <https://doi.org/10.3390/antiox8100429>
- Dong, Y., Yan, W., Zhang, Y.Q. and Dai, Z.Y., 2024. A novel angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from tilapia skin: Preparation, identification and its potential antihypertensive mechanism. *Food Chemistry*, 430, 137074. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137074>
- dos Santos K.P., Mellinger-Silva, C., Brígida, A.I.S. and Gonçalves, L.R.B., 2020. Modifying alcalase activity and stability by immobilization onto chitosan aiming at the production of bioactive peptides by hydrolysis of tilapia skin gelatin. *Process Biochemistry*, 97, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.019>

- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2016. Risks for human health related to the presence of 3-and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. EFSA Journal, 14(5), e04426.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Knutsen, H.K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hoogenboom, L., Nebbia, C. S., Oswald, I.P, Petersen, A., Rose, M., Roudot, A.C., Schwerdtle, T., Vleminckx, V., Vollmer, G., Wallace, H., Lampen, A., Morris, I., Piersma, A., Schrenk, D., Binaglia, M., Levorato, S. and Hogstrand, C., 2018. Update of the risk assessment on 3-monochloropropane diol and its fatty acid esters. EFSA Journal, 16(1), e05083. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5083>
- EFSA, 2013. Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009-2011 and preliminary exposure assessment. EFSA Journal, 11(9), 3381.
- Eisenreich, A., Monien, B.H., Götz, M.E., Buhrke, T., Oberemm, A., Schultrich, K., Abraham, K., Braeuning, A. and Schäfer, B., 2023. 3-MCPD as contaminant in processed foods: state of knowledge and remaining challenges. Food Chemistry, 403, 134332.
- Ekiz, E. and Oz, F., 2019. The effects of different frying oils on the formation of heterocyclic aromatic amines in meatballs and the changes in fatty acid compositions of meatballs and frying oils. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(4), 1509-1518. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9325>
- Etemadian, Y., Ghaemi, V., Shaviklo, M.R., Pourashouri, P., Mahoonak, A.R.S. and Rafipour, F., 2021. Development of animal/ plant-based protein hydrolysate and its application in food, feed and nutraceutical industries: State of the art. Journal of Cleaner Production 278, 123219. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123219>
- Eymard, S., Baron, C.P. and Jacobsen, C., 2009. Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. Food Chemistry, 114(1), 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.030>
- Fencioglu, H., Oz, E., Turhan, S., Proestos, C. and Oz, F., 2022. The effects of the marination process with different vinegar varieties on various quality criteria and heterocyclic aromatic amine formation in beef steak. Foods, 11(20), 3251. <https://doi.org/10.3390/foods11203251>
- Filippo, D.G., Melchior, S., Plazzotta, S., Calligaris, S. and Innocente, N., 2024. Effect of enzymatic hydrolysis with alcalase or protamex on technological and antioxidant properties of whey protein hydrolysates. Food Research International, 188, 114499. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114499>
- Flork, M., 1989. Using sulfuric acid and specific conditions. U.S. 4874893 A.
- Foh, M.B.K., Amadou, I., Foh, B.M., Kamara, M.T. and Xia, W., 2010. Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. International Journal of Molecular Sciences, 11(4), 1851-1869. <https://doi.org/10.3390/ijms11041851>
- Foh, M.B.K., Wenshui, X., Amadou, I. and Jiang, Q., 2012. Influence of pH shift on functional properties of protein isolated of tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscles and of soy protein isolate. Food and Bioprocess Technology, 5, 2192-2200. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0496-0>

- Fontoura, R., Daroit, D.J., Correa, A.P.F., Meira, S.M.M., Mosquera, M. and Brandelli, A., 2014. Production of feather hydrolysates with antioxidant, angiotensin-I converting enzyme- and dipeptidyl peptidase-IV- inhibitory activities. *New Biotechnology*, 31 (5), 506-513.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2023. Meat Market Review: Emerging trends and outlook 2023. Rome.
- Fuentes, C., Verdú, S., Grau, R., Barat, J.M. and Fuentes, A., 2024. Impact of raw material and enzyme type on the physico-chemical and functional properties of fish by-products hydrolysates. *LWT*, 201, 116247. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116247>
- Gallego, M., Mora, L. and Toldrá, F., 2018. Health relevance of antihypertensive peptides in foods. *Current Opinion in Food Science*, 19, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.004>
- Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., Yang, M., Yuan, L., McClements, D.J. and Sun, Q., 2021. Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 687-699.
- Gao, Z., Shen, P., Lan, Y., Cui, L., Ohm, J.B., Chen, B. and Rao, J., 2020. Effect of alkaline extraction pH on structure properties, solubility, and beany flavor of yellow pea protein isolate. *Food Research International*, 131, 109045. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109045>
- Garmidolova, A., Desseva, I., Mihaylova, D., Fidan, H., Terziyska, M. and Pavlov, A., 2022. Papain hydrolysates of lupin proteins with antioxidant, antimicrobial, and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Applied Sciences*, 12 (23), 12370. <https://doi.org/10.3390/app122312370>
- Gathercole, J., Maes, E., Thomas, A., Wieliczko, R., Grosvenor, A., Haines, S., Clerens, S. and Deb-Choudhury, S., 2023. Unlocking the bioactivity of meat proteins: Comparison of meat and meat hydrolysate via simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Proteomics*, 273, 104806. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2022.104806>
- Goh, K.M., Wong, Y.H., Tan, C.P. and Nyam, K.L., 2021. A summary of 2-, 3-MCPD esters and glycidyl ester occurrence during frying and baking processes. *Current Research in Food Science*, 4, 460-469. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.07.002>
- González, N., Marquès, M., Calderón, J., Collantes, R., Corraliza, L., Timoner, I., Bosch, J., Castell, V., Domingo, J.L. and Nadal, M., 2022. Occurrence and dietary intake of food processing contaminants (FPCs) in Catalonia, Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106, 104272. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104272>
- González-Serrano, D.J., Hadidi, M., Varcheh, M., Jelyani, A.Z., Moreno, A. and Lorenzo, J.M., 2022. Bioactive peptide fractions from collagen hydrolysate of common carp fish byproduct: Antioxidant and functional properties. *Antioxidants*, 11(3), 509. <https://doi.org/10.3390/antiox11030509>
- Gökalg, H.Y., Kaya, M., Tülek, Y. ve Zorba, Ö., 2010. Et ve ürünlerinde kalite kontrolü ve laboratuvar uygulama klavuzu (V. Baskı). Atatürk Üniversitesi Yayınları, Yayın No: 751, Ziraat Fakültesi Yayın No: 318. Ders Kitapları Seri No:69 Atatürk Üniversitesi Ofset Tesisi, Erzurum.
- Gu, Y.S., Kim, I.S., Ahn, J.K., Park, D.C., Yeum, D.M., Ji, C.I. and Kim, S.B., 2002. Mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines as affected by muscle types/skin and cooking in pan-roasted mackerel. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 515(1), 189-195. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00336-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00336-9)

- Gulcin, İ. and Alwasel, S.H., 2023. DPPH radical scavenging assay. *Processes*, 11(8), 2248. <https://doi.org/10.3390/pr11082248>
- Gulcin, İ., 2020. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>
- Guo, C., Zhao, X., Yang, Y., Li, M. and Yu, L., 2022. Effect of Limited enzymatic hydrolysis on structural and functional properties of *Elaeagnus mollis* oil meal protein. *Foods*, 11(21), 3393. <https://doi.org/10.3390/foods11213393>
- Guo, Q., Chen, P. and Chen, X., 2023. Bioactive peptides derived from fermented foods: Preparation and biological activities. *Journal of Functional Foods*, 101, 105422. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105422>
- Guo, Y., Zhang, Y., Liu, R., Chang, M., Huang, J. and Wang, X., 2021. Contributions of different factors to ratio of 3-monochloro-1,2-propanediol to 2-monochloro-1,3-propanediol esters during frying simulation. *Food Control*, 124, 107853. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107853>
- Guoyuan, X., Xueqin, G., Peng, W., Xinglian, X. and Guanghong, Z., 2016. Comparative study of extraction efficiency and composition of protein recovered from chicken liver by acid-alkaline treatment. *Process Biochemistry*, 51(10), 1629-1635. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.007>
- Hadinoto, K., Ling, J. K.-U., Pu, S. and Tran, T.-T., 2024. Effects of alkaline extraction pH on amino acid compositions, protein secondary structures, thermal stability, and functionalities of brewer's spent grain proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6369. <https://doi.org/10.3390/ijms25126369>
- Halim, N.R.A. and Sarbon, N.M., 2020. Characterization of Asian swamp eel (*Monopterus* sp.) protein hydrolysate functional properties prepared using Alcalase® enzyme. *Food Research*, 4(1), 207-215.
- Halim, N.R.A., Yusof, H.M. and Sarbon, N.M., 2016. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 24-33.
- Halldórsdóttir, S.M., Hamaguchi, P.Y., Sveinsdóttir, H., Kristinsson, H.G., Bergsson, A.B. and Thorkelsson, G., 2011. Properties of hydrolysed saithe protein isolates prepared via pH shift process with and without dewatering. *LWT-Food Science and Technology*, 44(10), 1999-2004. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.017>
- Hamlet, C.G. and Sutton, P.G., 1997. Determination of the chloropropanols, 3-chloro-1, 2-propanediol and 2-chloro-1, 3-propanediol, in hydrolysed vegetable proteins and seasonings by gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(13), 1417-1424.
- Hamlet, C.G., 1998. Analytical methods for the determination of 3-chloro-1, 2-propanediol and 2-chloro-1, 3-propanediol in hydrolysed vegetable protein, seasonings and food products using gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants*, 15(4), 451-465. <https://doi.org/10.1080/02652039809374666>
- Hamlet, C.G., Jayaratne, S.M. and Matthews, W., 2002b. 3-Monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in food ingredients from UK food producers and ingredient suppliers. *Food Additives & Contaminants*, 19(1), 15-21. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030110072344>
- Hamlet, C.G., Sadd, P.A., Crews, C., Velíšek, J. and Baxte, D.E., 2002a. Occurrence of 3-chloro-propane-1,2-diol (3-MCPD) and related compounds in foods: A review. *Food Additives and Contaminants*, 19(7), 619-631.

- Hamzalıoğlu, A. and Gökmen, V., 2020. Potential reactions of thermal process contaminants during digestion. *Trends in Food Science & Technology*, 106, 198-208.
- He, S., Franco, C. and Zhang, W., 2012. Process optimisation and physicochemical characterisation of enzymatic hydrolysates of proteins from co-products of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi*). *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2397-2404.
- Heffernan, S., Giblin, L. and O'Brien, N., 2021. Assessment of the biological activity of fish muscle protein hydrolysates using in vitro model systems. *Food Chemistry*, 359, 129852.
- Hemker, A.K., Nguyen, L.T., Karwe, M. and Salvi, D., 2020. Effects of pressure-assisted enzymatic hydrolysis on functional and bioactive properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product protein hydrolysates. *LWT*, 122, 109003. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.109003>
- Hettiarachchy, N.S., Sato, K., Marshall, M.R. and Kannan, A., 2012. Food proteins and peptides: chemistry, functionality, interactions, and commercialization. CRC Press.
- Heydari, H., Taleizadeh, A.A. and Jolai, F., 2023. Financing a two-stage sustainable supply chain using green bonds: Preventing environmental pollution and waste generation. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 117(Part B), 105583. <https://doi.org/10.1016/j.engappai.2022.105583>
- Hidalgo, F.J. and Zamora, R., 2022. Carbonyl chemistry and the formation of heterocyclic aromatic amines with the structure of aminoimidazoazaarene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(1), 79-86. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06842>
- Hidalgo, F.J., Lavado-Tena, C.M. and Zamora, R., 2021. Identification of acrolein as the reactive carbonyl responsible for the formation of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx). *Food Chemistry*, 343, 128478. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128478>
- Hidalgo-Ruiz, J.L., Romero-Gonzalez, R., Vidal, J.L.M. and Frenich, A.G., 2021. Determination of 3-chloropropanediol esters and glycidyl esters in fatty matrices by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1639, 461940. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461940>
- Hofmann, M., Winzer, M., Weber, C. and Gieseler, H., 2018. Low-volume solubility assessment during high-concentration protein formulation development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(5), 636-647. <https://doi.org/10.1111/jphp.12621>
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G. and Wu, G. 2022., Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Bioactive Peptides from Food*, 8, 209-232. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>
- Hsu, K.C., Li-Chan, E.C. and Jao, C.L., 2011. Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chemistry*, 126(2), 617-622. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.066>
- Ibarz-Blanch, N., Alcaide-Hidalgo, J.M., Cortés-Espinar, A.J., Albi-Puig, J., Suárez, M., Mulero, M., Morales, D. and Bravo, F.I., 2023. Chicken slaughterhouse by-products: A source of protein hydrolysates to manage non-communicable diseases. *Trends in Food Science & Technology*, 139, 104125. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104125>
- Ishak, N.H. and Sarbon, N.M., 2018. A Review of Protein Hydrolysates and Bioactive Peptides Deriving from Wastes Generated by Fish Processing. *Food and Bioprocess Technology*, 11, 2-16. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1940-1>

- Islam, M.S., Wang, H., Admassu, H., Sulieman, A.A. and Wei, F.A., 2022. Health benefits of bioactive peptides produced from muscle proteins: Antioxidant, anti-cancer, and anti-diabetic activities. *Process Biochemistry*, 116, 116-125. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.007>
- Jafarpour, A., Gomes, R.M., Gregersen, S., Sloth, J.J., Jacobsen, C. and Sørensen, A.D.M., 2020. Characterization of cod (*Gadus morhua*) frame composition and its valorization by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 89, 103469. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103469>
- Jägerstad, M., Laser-Reuterswärd, A., Olsson, R., Grivas, S., Nyhammar, T., Olsson, K. and Dahlqvist, A., 1983. Creatin(ine) and maillard reaction products as precursors of mutagenic compounds: effects of various amino acids. *Food Chemistry*, 12(4), 255-264. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(83\)90014-6](https://doi.org/10.1016/0308-8146(83)90014-6)
- Jang, A. and Lee, M., 2005. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Science*, 69(4), 653-661. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.10.014>
- Jang, A., Jo, C., Kang, K.S. and Lee, M., 2008. Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chemistry*, 107(1), 327-336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.036>
- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K. and Bawa, A.S., 2012. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 49, 278-293. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0290-7>
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2002. 3-Chloro-1,2-propanediol. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the fifty-seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), GenevaWHO Food Additives Series, 48.
- JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2007. 3-Chloro-1,2-propanediol (addendum). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the sixty- seventh meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), GenevaWHO Food Additives Series, 58, 239-267.
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R.B.S.B., Mehiri, M., Hajji, M. and Nasri, M., 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, 49(6), 963-972. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.004>
- Jiang, H., Tong, T., Sun, J., Xu, Y., Zhao, Z. and Liao, D., 2014. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 154, 158-163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.074>
- Jiang, J., Chen, J. and Xiong, Y.L., 2009. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7576-7583. <https://doi.org/10.1021/jf901585n>
- Jiang, S., Ding, J., Andrade, J., Rababah, T.M., Almajwal, A., Abulmeaty, M.M. and Feng, H., 2017. Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 835-842. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.046>
- Kadir, N.S.A., Khor, Y.P., Lee, Y.J., Lan, D., Qi, S., Wang, Y. and Tan, C.P., 2022. Formation of 3-MCPD and glycidyl esters in biscuits produced using soybean oil-based

- diacylglycerol stearin-shortening blends: Impacts of different baking temperatures and blending ratios. *Food Research International*, 162(Part B), 112055. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112055>
- Karami, Z. and Akbari-adergani, B., 2019. Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 535-547. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>
- Khan, I.A., Khan, A., Zou, Y., Zongshuai, Z., Xu, W., Wang, D. and Huang, M., 2022. Heterocyclic amines in cooked meat products, shortcomings during evaluation, factors influencing formation, risk assessment and mitigation strategies. *Meat Science*, 184, 108693. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108693>
- Khan, M.R. and Azam, M., 2021. Shrimp as a substantial source of carcinogenic heterocyclic amines. *Food Research International*, 140, 109977. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109977>
- Khan, R.H., Siddiqi, M.K. and Salahuddin, P., 2017. Protein structure and function. *Basic Biochemistry*, 5, 1-39.
- Kim, E., Park, S. and Choi, D., 2008. A sensitive analytical method for determination of 3-monochloropropane-1, 2-diol and 1, 3-dichloropropan-2-ol in various foods by gas chromatography with mass spectrometer. *Analytical Science and Technology*, 21(6), 543-552. <https://doi.org/10.5806/AST.2008.21.6.543>
- Kirton, K.T., Ericsson, R.J., Ray, J.A. and Forbes, A.D., 1970. Male antifertility compounds: Efficacy of U-5897 in primates (*Macacamulatta*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 21(2), 275-278.
- Klassen, R.D., Lewis, D., Lau, B.P.-Y. and Sen, N.P., 2002. Heterocyclic aromatic amines in cooked hamburgers and chicken obtained from local fast food outlets in the Ottawa Region. *Food Research International*, 35(9), 837-847. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00087-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00087-X)
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F., 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), 1317-1327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>
- Knasmüller, S., Steinkellner, H., Hirschl, A.M., Rabot, S., Nobis, E.C. and Kassie, F., 2001. Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutation Research*, 480-481, 129-138. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00176-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00176-2)
- Knize, M.G., Kulp, K.S., Salmon, C.P., Keating, G.A. and Felton, J.S., 2002. Factors affecting human heterocyclic amine intake and the metabolism of PhIP. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 506-507, 153-162. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00162-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00162-8)
- Ko, J.Y., Lee, J.H., Samarakoon, K., Kim, J.S. and Jeon, Y.J., 2013. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 113-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.058>
- Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A., 2000. Fish Protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>

- Ktari, N., Fakhfakh, N., Balti, R., Ben Khaled, H., Nasri, M. and Bougatef, A., 2013. Effect of degree of hydrolysis and protease type on the antioxidant activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(5), 436-448. <https://doi.org/10.1080/10498850.2012.658961>
- Kumari, A., Kaushik, N., Slizyte, R. and Khushboo., 2023. Production and microencapsulation of protein hydrolysate of pink perch (*Nemipterus japonicus*) by-products obtained from surimi industry for its sustainable utilization. *Waste and Biomass Valorization*, 14(1), 209-226. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01853-3>
- Kurbanoglu, E.B. and Algur, Ö.F., 2004. A new medium from ram horn hydrolysate for enumeration of aerobic bacteria. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 28(2), 343-350.
- Kurozawa, L.E., Park, K.J. and Hubinger, M.D., 2009. Effect of carrier agents on the physicochemical properties of a spray dried chicken meat protein hydrolysate. *Journal of Food Engineering*, 94(3-4), 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.025>
- Laser Reuterswärd, A., Skog, K. and Jägerstad, M., 1987a. Effects of creatine and creatinine content on the mutagenic activity of meat extracts, bouillons and gravies from different sources. *Food and Chemical Toxicology*, 25(10), 747-754. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(87\)90229-8](https://doi.org/10.1016/0278-6915(87)90229-8)
- Laser Reuterswärd, A., Skog, K. and Jägerstad, M., 1987b. Mutagenicity of pan-fried bovine tissues in relation to their content of creatine, creatinine, monosaccharides and free amino acids. *Food and Chemical Toxicology*, 25(10), 755-762. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(87\)90230-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(87)90230-4)
- Lee, B.Q. and Khor, S.M. 2015. 3-Chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in soy sauce: A review on the formation, reduction, and detection of this potential carcinogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(1), 48-66. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12120>
- Lee, S.Y. and Hur, S.J., 2017. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants. *Food Chemistry*, 228, 506-517. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.039>
- Lee, S.Y., Yim, D.G., Kim, O.Y., Kang, H.J., Kim, H.S., Jang, A., Park, T.S., Jin, S.K. and Hur, S.J., 2020. Overview of the effect of natural products on reduction of potential carcinogenic substances in meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 568-579. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.034>
- Leni, G., Soetemans, L., Caligiani, A., Sforza, S. and Bastiaens, L., 2020. Degree of hydrolysis affects the techno-functional properties of lesser mealworm protein hydrolysates. *Foods*, 9(4), 381. <https://doi.org/10.3390/foods9040381>
- Li, Q., Fu, Y., Zhang, L., Otte, J. and Lametsch, R., 2020. Plastein from hydrolysates of porcine hemoglobin and meat using alcalase and papain. *Food Chemistry*, 320, 126654. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126654>
- Li, W., Wan, X., Chen, C., Guo, Y., Jiao, Y., He, Z., Chen, J., Li, J. and Yan, Y., 2023. Effects of soy protein and its hydrolysates on the formation of heterocyclic aromatic amines in roasted pork. *Meat Science*, 204, 109236. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109236>
- Li, Y., Zhang, S., Bao, Z., Sun, N. and Lin, S., 2022. Exploring the activation mechanism of alcalase activity with pulsed electric field treatment: Effects on enzyme activity, spatial conformation, molecular dynamics simulation and molecular docking parameters.

- Liao, Z., Gao, Z., Yang, Q. and Cao, D., 2024. Occurrence and exposure evaluation of 2-and 3-monochloropropanediol (MCPD) esters and glycidyl esters in refined vegetable oils marketed in Tianjin of China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 130, 106150. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106150>
- Li-Chan, E.C.Y., Hunag, S.L., Jao, C.L., Ho, K.P. and Hsu, K.C., 2012. Peptides derived from Atlantic Salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973-978. [dx.doi.org/10.1021/jf204720q](https://doi.org/10.1021/jf204720q)
- Lima, D.A.S., Santos, M.M.F., Duval, R.L.F., Bezerra, T.K.A., Araújo, Í.B.D.S., Madruga, M.S. and da Silva, F.A.P., 2021b. Technological properties of protein hydrolysate from the cutting byproduct of serra spanish mackerel (*Scomberomorus brasiliensis*). *Journal of Food Science and Technology*, 58, 2952-2962. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04797-5>
- Lima, K.O., Aleman, A., Lopez-Caballero, M.E., Gomez-Guillen, M.C., Montero, M.P., Prentice, C., Huisa, A.J.T. and Monserrat, J.M., 2021a. Characterization, stability, and in vivo effects in *Caenorhabditis elegans* of microencapsulated protein hydrolysates from stripped weakfish (*Cynoscion guatucupa*) industrial byproducts. *Food Chemistry*, 364, 130380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130380>
- Lima, K.O., Quadros, C.C., Rocha, M., Lacerda, J.T.J.G., Juliano, M.A., Dias, M., Mendes, M.A. and Prentice, C., 2019. Bioactivity and bioaccessibility of protein hydrolyzates from industrial byproducts of Stripped weakfish (*Cynoscion guatucupa*). *LWT - Food Science and Technology*, 111, 408-413. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.043>
- Lin, D., Sun, L.C., Chen, Y.L., Liu, G.M., Miao, S. and Cao, M.J., 2022. Peptide/protein hydrolysate and their derivatives: Their role as emulsifying agents for enhancement of physical and oxidative stability of emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 129, 11-24. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.08.012>
- Ling, Z., Thakur, N., El-Dalatony, M.M., Salama, E.S. and Li, X., 2022. Protein biometanation: insight into the microbial nexus. *Trends in Microbiology*, 30(1), 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.06.004>
- Linghu, Z., Karim, F. and Smith, J.S., 2017. Amino acids inhibitory effects and mechanism on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) formation in the maillard reaction model systems. *Journal of Food Science*, 82(12), 3037-3045. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13959>
- Liu, H., Li, Y., Diao, X., Kong, B. and Liu, Q., 2018. Effect of porcine bone protein hydrolysates on the emulsifying and oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 538, 757-764. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.11.061>
- Liu, R., Xing, L., Fu, Q., Zhou, G.H. and Zhang, W.G., 2016. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. *Antioxidants*, 5(3), 32. <https://doi.org/10.3390/antiox5030032>
- Lopez-Enriquez, R.L., Ocano-Higuera, V.M., Torres-Arreola, W., Ezquerro-Brauer, J.M. and Marquez-Rios, E., 2015. Chemical and functional characterization of sarcoplasmic proteins from giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle. *Journal of Chemistry*, 2015(1), 538721. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/538721>
- López-Pedrouso, M., Lorenzo, J.M., Bou, R., Vazquez, J.A., Valcarcel, J., Toldrà, M. and Franco, D., 2023. Valorisation of pork by-products to obtain antioxidant and

- antihypertensive peptides. Food Chemistry, 423, 136351. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136351>
- MacMahon, S., 2018. MCPD Esters and glycidyl esters: a review of analytical methods. U.S. Food and Drug Administration, College Park, MD, United States.
- Mahdabi, M. and Shekarabi, S.P.H. 2018. A comparative study on some functional and antioxidant properties of kilka meat, fishmeal, and stick-water protein hydrolysates. Journal of Aquatic Food Product Technology, 27, 844-858. <https://doi.org/10.1080/10498850.2018.1500503>
- Martin, A.A., Fodjo, E.K., Marc, G.B.I., Albert, T. and Kong, C., 2021. Simple and rapid detection of free 3-monochloropropane-1, 2-diol based on cysteine modified silver nanoparticles. Food Chemistry, 338, 127787. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127787>
- Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S. and Brenes, A., 2015. Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. Food Research International, 73, 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005>
- Matak, K.E., Tahergorabi, R. and Jaczynski, J., 2015. A review: Protein isolates recovered by isoelectric solubilization/precipitation processing from muscle food by-products as a component of nutraceutical foods. Food Research International, 77, 697-703. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.048>
- Meinke, W.W., Rahman, M.A. and Mattil, K.F., 1972. Some factors influencing the production of protein isolates from whole fish. Journal of Food Science, 37(2), 195-198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1972.tb05815.x>
- Mejri, L., Vázquez-Villanueva, R., Hassouna, M., Marina, M.L. and García, M.C., 2017. Identification of peptides with antioxidant and antihypertensive capacities by RP-HPLC-Q-TOF-MS in dry fermented camel sausages inoculated with different starter cultures and ripening times. Food Research International, 100(Part 1), 708-716. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.07.072>
- Meshginfar, N., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M. and Aalami, M., 2016. Effects of protein hydrolysate from sheep visceral on oxidative stability of soybean oil and chicken sausage. Journal of Food Processing and Preservation, 41(2), e12875. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12875>
- Messner, C. and Murkovic, M., 2004. Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. Journal of Chromatography B, 802(1), 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.11.015>
- Mısır, G.B. and Koral, S., 2019. Effects of ultrasound treatment on structural, chemical and functional properties of protein hydrolysate of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by-products. Italian Journal of Food Science, 31(2), 205-223. <https://doi.org/10.14674/IJFS-1218>
- Mihalache, O.A. and Dall'Asta, C., 2023. Food processing contaminants: Dietary exposure to 3-MCPD and glycidol and associated burden of disease for Italian consumers. Environmental Research, 234, 116559. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116559>
- Miyazaki, K., Takagishi, Y., Sakamoto, K., Yamada, Y. and Koyama, K., 2022. Development of indirect quantitative methods for 3-MCPD fatty acid esters (3-MCPDEs) and glycidyl fatty acid esters (GEs) in thermally processed foodstuffs. Journal of Oleo Science, 71(1), 15-29. <https://doi.org/10.5650/jos.ess21114>

- Mou, Y., Sun, L., Geng, Y., Xie, Y., Chen, F., Xiao, J., Hu, X., Ji, J. and Ma, L., 2023. Chloropropanols and their esters in foods: Exposure, formation and mitigation strategies. *Food Chemistry Advances*, 3, 100446. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100446>
- Mouat, A.R., 2022. Sustainability in food-waste reduction biotechnology: a critical review. *Current Opinion in Biotechnology*, 77, 102781. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102781>
- Murray, B.A. and FitzGerald, R.J., 2007. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production. *Current Pharmaceutical Design*, 13(8), 773-791. <https://doi.org/10.2174/138161207780363068>
- Najafian, L. and Babji, A.S., 2012. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33(1), 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.013>
- Nasri, R., Abdelhedi, O., Nasri, M. and Jridi, M., 2022. Fermented protein hydrolysates: biological activities and applications. *Current Opinion in Food Science*, 43, 120-127. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.11.006>
- Neves, A.C., Harnedy, P.A. and FitzGerald, R.J., 2016. Angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory, and antioxidant activities of a Blue Mussel (*Mytilus edulis*) meat protein extract and its hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(8), 1221-1233. <https://doi.org/10.1080/10498850.2015.1051259>
- Neves, A.C., Harnedy, P.A., O'Keeffe, M.B. and FitzGerald, R.J., 2017. Bioactive peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory, and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 218, 396-405. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.053>
- Nguyen, H.T., Bao, H.N.D., Dang, H.T.T., Tómasson, T., Arason, S. and Gudjónsdóttir, M., 2022b. Protein recovery of tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*) protein-rich side streams by the pH-shift method. *Foods*, 11(11), 1531. <https://doi.org/10.3390/foods11111531>
- Nguyen, H.T., Hilmarisdóttir, G.S., Tómasson, T., Arason, S. and Gudjónsdóttir, M., 2022c. Changes in protein and non-protein nitrogen compounds during fishmeal processing- Identification of unoptimized processing steps. *Processes*, 10(4), 621. <https://doi.org/10.3390/pr10040621>
- Nguyen, K.H., Fromberg, A., Duedahl-Olesen, L., Christensen, T. and Granby, K., 2022a. Processing contaminants in potato and other vegetable crisps on the Danish market: levels and estimation of exposure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 108, 104411. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104411>
- Nikoo, M., Regenstein, J.M. and Yasemi, M., 2023. Protein hydrolysates from fishery processing by-products: Production, characteristics, food applications, and challenges. *Foods*, 12(24), 4470. <https://doi.org/10.3390/foods12244470>
- Nikoo, M., Regenstein, J.M., Noori, F. and Gheshlaghi, S.P., 2021. Autolysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by-products: Enzymatic activities, lipid and protein oxidation, and antioxidant activity of protein hydrolysates. *LWT*, 140, 110702. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110702>
- Nisov, A., Kakko, T., Alakomi, H.L., Lantto, R. and Honkapää, K., 2022. Comparison of enzymatic and pH shift methods to extract protein from whole Baltic herring (*Clupea harengus membras*) and roach (*Rutilus rutilus*). *Food Chemistry*, 373(Part B), 131524. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131524>

- Noman, A., Xu, Y., Al-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H. and Xia, W., 2018. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, 67, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.009>
- Ocak, B., 2021. Chitosan/collagen hydrolysate based films obtained from hide trimming wastes reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Biophysics*, 16(3), 381-394. <https://doi.org/10.1007/s11483-021-09678-8>
- Ochiai, Y. and Ozawa, H., 2020. Biochemical and physicochemical characteristics of the major muscle proteins from fish and shellfish. *Fisheries Science*, 86(5), 729-740. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01444-y>
- Ogunwolu, S.O., Henshaw, F.O., Mock, H.P., Santos. A. and Awonorin, S.O., 2009. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. *Food Chemistry*, 115(3), 852-858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.011>
- Overvik, E., Kleman, M., Berg, I. and Gustafsson, J.A., 1989. Influence of creatine, amino acids and water on the formation of the mutagenic heterocyclic amines found in cooked meat. *Carcinogenesis*, 10(12), 2293-2301. <https://doi.org/10.1093/carcin/10.12.2293>
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115(1), 238-242. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.013>
- Oz, E. and Kaya, M., 2019. The proteolytic changes in two different types of pastırma during the production. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(8), e14042. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14042>
- Oz, E. and Oz, F., 2022. Mutagenic and/or carcinogenic compounds in meat and meat products: Heterocyclic aromatic amines perspective. *Теория и практика переработки мяса*, 7 (2), 112-117.
- Oz, E., Aoudeh, E., Murkovic, M., Toldra, F., Gomez-Zavaglia, A., Brennan, C., Proestos, C., Zeng, M. and Oz, F., 2023. Heterocyclic aromatic amines in meat: Formation mechanisms, toxicological implications, occurrence, risk evaluation, and analytical methods. *Meat Science*, 205, 109312. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109312>
- Oz, F. and Kaya, M., 2011. Heterocyclic aromatic amines in meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 35(6), 739-753. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00524.x>
- Oz, F. and Yuzer, M.O., 2016. The effects of cooking on wire and stone barbecue at different cooking levels on the formation of heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in beef steak. *Food Chemistry*, 203, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.041>
- Oz, F. and Yuzer, M.O., 2017. The effects of different cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in turkey meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), e13196. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13196>
- Oz, F. and Zikarov, E., 2015. The effects of sous-vide cooking method on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef chops. *LWT-Food Science and Technology*, 64(1), 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.050>
- Oz, F., 2011. Quantitation of heterocyclic aromatic amines in ready to eat meatballs by ultra fast liquid chromatography. *Food Chemistry*, 126(4), 2010-2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.076>

- Oz, F., Kızıl, M., Zaman, A. and Turhan, S., 2016. The effects of direct addition of low and medium molecular weight chitosan on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef chop. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 861-867. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.023>
- Oz, F., Oz, E., Aoudeh, E., Abd El-Aty, A.M., Zeng, M. and Varzakas, T., 2021. Is ultra-high temperature processed milk safe in terms of heterocyclic aromatic amines?. *Foods*, 10(6), 1247. <https://doi.org/10.3390/foods10061247>
- Önal, B., Özdikicierler, O. ve Yemişçioğlu, F., 2016. Türkiye piyasasında satışa sunulan patates cipslerinde 3-MCPD esterleri ve glisidil esterleri miktarları. *Akademik Gıda*, 14(3), 267-274.
- Pais, P., Salmon, C.P., Knize, M.G. and Felton, J.S., 1999. Formation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines in dry-heated model systems, meats, and meat drippings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1098-1108.
- Panpipat, W. and Chaijan, M., 2016. Potential production of healthier protein isolate from broiler meat using modified acid-aided pH shift process. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 1259-1267. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1716-z>
- Panpipat, W. and Chaijan, M., 2017. Functional properties of pH-shifted protein isolates from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) head by-product. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 596-610. <http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2016.1171778>
- Park, S., Brewer, M.S., McKeith, F.K., Bechtel, P.J. and Novakofski, J., 1996. Composition of surimi-like material from beef or pork. *Journal of Food Science*, 61(4), 717-720.
- Pasupuleti, V.K. and Braun, S., 2008. State of the art manufacturing of protein hydrolysates. *Protein Hydrolysates in Biotechnology*, (pp.11-32).
- Pezeshk, S., Rezaei, M., Hosseini, H. and Abdollahi, M., 2021. Impact of pH-shift processing combined with ultrasonication on structural and functional properties of proteins isolated from rainbow trout by-products. *Food Hydrocolloids*, 118, 106768. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106768>
- Pires, C. and Batista, I., 2013. Functional properties of fish protein hydrolysates. *Utilization of fish waste*, 59-75. CRC Press.
- Pires, C., Clemente, T. and Batista, I., 2012. Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from Cape hake by-products prepared by three different methodologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 771-780. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5796>
- Polanco-Lugo, E., Dávila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D.A. and Chel-Guerrero, L.A., 2014. Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of Phaseolus lunatus protein isolate. *Food Science and Technology*, 34, 441-448. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457X.6349>
- Qi, X., Li, Y., Zhang, W., Shen, M., Chen, Y., Yu, Q. and Xie, J., 2024. Proteolysis improves the foaming properties of rice protein fibrils: Structure, physicochemical properties changes, and application in angel food cake. *Food Chemistry*, 437, 137765. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137765>
- Quan, T.H., Benjakul, S., Sae-leaw, T., Balange, A.K. and Maqsood, S., 2019. Protein–polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 507-517. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.049>

- Rahn, A.K.K. and Yaylayan, V.A., 2011. What do we know about the molecular mechanism of 3-MCPD ester formation?. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 323-329. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201000310>
- Ramakrishnan, S.R., Jeong, C.R., Park, J.W., Cho, S.S. and Kim, S.J., 2023. A review on the processing of functional proteins or peptides derived from fish by-products and their industrial applications. *Heliyon*, 9(3), e14188. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14188>
- Rani, S., Pooja, K. and Pal, G.K., 2018. Exploration of rice protein hydrolysates and peptides with special reference to antioxidant potential: Computational derived approaches for bio-activity determination. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.013>
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597-635.
- Rawdkuen, S., Sai-Ut, S., Khamson, S., Chaijan, M. and Benjakul, S., 2009. Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. *Food Chemistry*, 112(1), 112-119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.047>
- Razavizadeh, S.R., Farmani, J. and Motamedzadegan, A., 2022. Enzyme-assisted extraction of chicken skin protein hydrolysates and fat: Degree of hydrolysis affects the physicochemical and functional properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 99(7), 621-632. <https://doi.org/10.1002/aocs.12591>
- Ricardo, F., Pradilla, D., Cruz, J.C. and Alvarez, O., 2021. Emerging emulsifiers: Conceptual basis for the identification and rational design of peptides with surface activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4615. <https://doi.org/10.3390/ijms22094615>
- Rivero-Pino, F., Espejo-Carpio, F.J. and Guadix, E.M., 2020. Evaluation of the bioactive potential of foods fortified with fish protein hydrolysates. *Food Research International*, 137, 109572. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109572>
- Robert, M.C., Oberson, J.M. and Stadler, R.H., 2004. Model studies on the formation of monochloropropanediols in the presence of lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5102-5108. <https://doi.org/10.1021/jf049837u>
- Rodrigues, D.P., Calado, R., Ameixa, O.M.C.C., Valcarcel, J. and Vazquez, A., 2021. Valorisation of Atlantic codfish (*Gadus morhua*) frames from the cure-salting industry as fish protein hydrolysates with in vitro bioactive properties. *LWT-Food Science and Technology*, 149, 111840. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111840>
- Romero-Garay, M.G., Montalvo-González, E., Hernández-González, C., Soto-Domínguez, A., Becerra-Verdín, E.M. and García-Magaña, M.D.L., 2022. Bioactivity of peptides obtained from poultry by-products: A review. *Food Chemistry: X*, 13, 100181. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100181>
- Rossi, D.M., Flores, S.H., Heck, J.X. and Ayub, M.A.Z., 2009. Production of high-protein hydrolysate from poultry industry residue and their molecular profiles. *Food Biotechnology*, 23(3), 229-242. <https://doi.org/10.1080/08905430903102828>
- Rutherford, S.M., 2010. Methodology for determining degree of hydrolysis of proteins in hydrolysates: A review. *Journal of AOAC International*, 93(5), 1515-1522. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>

- Ryan, G., O'Regan, J. and FitzGerald, R.C., 2023. Foaming and sensory properties of bovine milk protein isolate and its associated enzymatic hydrolysates. *International Dairy Journal*, 137, 105511. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105511>
- Saeed, M., Khan, M.I., Butt, M.S. and Riaz, F., 2020. Characterization of peptides fractions produced through enzymatic hydrolysis of meat byproducts for their antihypertensive and antioxidant activities. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 57(2), 545-551. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/19.8506>
- Samojlik, E. and Chang, M.C., 1970. Antifertility activity of 3-chloro-1, 2-propanediol (U-5897) on male rats. *Biology of Reproduction*, 2(2), 299-304.
- Savaş, A., Ekiz, E., Elbir, Z., Savaş, B.D., Proestos, C., Elobeid, T., Khan, M.R. and Oz, F., 2023. Advantageous effects of sumac usage in meatball preparation on various quality criteria and formation of heterocyclic aromatic amines. *Separations*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.3390/separations10010029>
- Schmidt, M.M., da Fontoura, A.M., Vidal, A.R., Dornelles, R.C.P., Kubota, E.H., Mello, R.D.O., Cansian, L.R., Demiate, I.M. and Oliveira, C.S.D., 2020. Characterization of hydrolysates of collagen from mechanically separated chicken meat residue. *Food Science and Technology*, 40, 355-362. <https://doi.org/10.1590/fst.14819>
- Selmane, D., Christophe, V. and Gholamreza, D., 2008. Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Science*, 79(4), 640-647. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.10.029>
- Shabanpour, B., Etemadian, Y. and Alami, M., 2015b. Comparative study on some biochemical characteristics of surimi from common carp and silver carp and proteins recovered using an acid-alkaline process. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(3), 583-597.
- Shabanpour, B., Etemadian, Y. and Taghipour, B., 2015a. Physicochemical and rheological parameters changes for determining the quality of surimi and kamaboko produced by conventional, acid and alkaline solubilization process methods from common kila (*Clupeonella cultriventris caspia*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(4), 826-845. <https://doi.org/10.22092/ijfs.2018.114486>
- Shi, H., Gao, R., Liu, H., Wang, Z., Zhang, C. and Zhang, D., 2024. Qualitative and quantitative assessment of key aroma compounds, advanced glycation end products and heterocyclic amines in different varieties of commercially roasted meat products. *Food Chemistry*, 436, 137742. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137742>
- Shin, H-S., Strasburg, G.M. and Gray, J.I., 2002. A Model system study of the inhibition of heterocyclic aromatic amine formation by organosulfur compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7684-7690. <https://doi.org/10.1021/jf025707e>
- Sim, B.I., Khor, Y.P., Lai, O.M., Yeoh, C.B., Wang, Y., Liu, Y., Nehdi, I. A. and Tan, C.P., 2020. "Mitigation of 3-MCPD esters and glycidyl esters during the physical refining process of palm oil by micro and macro laboratory scale refining. *Food Chemistry*, 328, 127147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127147>
- Skog, K.I., Johansson, M.A. and Jägerstad, M.I., 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food and Chemical Toxicology*, 36(9-10), 879-896. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(98\)00061-1](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(98)00061-1)
- Šližytė, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I. and Rustad, T., 2005. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40(6), 2021-2033. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.016>

- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2007. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 187-194.
- Spellman, D., McEvoy, E., O'cuinn, G. and FitzGerald, R.J., 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447-453. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0)
- Starski, A., Jedra, M., Gawarska, H. and Postupolski, J., 2013. Assessing exposure to 3-MCPD from bakery products based on monitoring studies undertaken throughout Poland. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 64(4), 277-283.
- Stauff, A., Schneider, E. and Heckel, F., 2020. 2-MCPD, 3-MCPD and fatty acid esters of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidol in fine bakery wares. *European Food Research and Technology*, 246(10), 1945-1953. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03546-4>
- Sugimura, T., 1995. History, present and future of heterocyclic amines, cooked food mutagens. In *Heterocyclic Amines in Cooked Foods: Possible Human Carcinogens* (R.H. Adamson, ed.) pp. 214- 231.
- Sujitha, P. and Shanthi, C., 2023. Importance of enzyme specificity and stability for the application of proteases in greener industrial processing-A review. *Journal of Cleaner Production*, 425, 138915. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.138915>
- Sun, C., Wu, N., Kou, S., Wu, H., Liu, Y., Pei, A. and Li, Q., 2023. Occurrence, formation mechanism, detection methods, and removal approaches for chloropropanols and their esters in food: An updated systematic review. *Food Chemistry: X*, 17, 100529. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100529>
- Surasani, V.K.R., Kudre, T. and Ballari, R.V., 2018. Recovery and characterization of proteins from pangas (*Pangasius pangasius*) processing waste obtained through pH shift processing. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 11987-11998. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1456-x>
- Surasani, V.K.R., Tyagi, A. and Kudre, T., 2017. Recovery of proteins from rohu processing waste using pH shift method: characterization of isolates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 26(3), 356-365. <https://doi.org/10.1080/10498850.2016.1186130>
- Sylvestre, M.N., Feidt, C. and Brun-Bellut, J., 2001. Post-mortem evolution of non-protein nitrogen and its peptide composition in growing lamb muscles. *Meat Science*, 58(4), 363-369. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00029-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00029-8)
- Szterk, A., 2015. Heterocyclic aromatic amines in grilled beef: The influence of free amino acids, nitrogenous bases, nucleosides, protein and glucose on HAAs content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.011>
- Tacias-Pascacio, V.G., Morellon-Sterling, R., Siar, E.H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, A. and Fernandez-Lafuente, R., 2020. Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143-2196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>
- Taghizadeh, S. F., Naseri, M., Ahmadpourmir, H., Azizi, M., Rezaee, R. and Karimi, G., 2023. Determination of 3 monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) and 1, 3-dichloropropan-2-ol (1, 3-DCP) levels in edible vegetable oils: A health risk assessment for Iranian consumers. *Microchemical Journal*, 192, 108946. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108946>
- Taghizadeh, S.F., Iranmanesh, O., Tsitsimpikou, C., Tsatsakis, A., Karimi, G. and Rezaee, R., 2024. Determination of 3 monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) level in chocolate:

- A probabilistic health risk assessment for Iranian consumers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 125, 105800. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105800>
- Taheri, A., Anvar, S.A.A., Ahari, H. and Fogliano, V., 2013. Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry by-products and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(1), 154-169.
- Tan, M., Xu, J., Gao, H., Yu, Z., Liang, J., Mu, D., Li, X., Zhong, X., Luo, S., Zhao, Y., Jiang, S. and Zheng, Z., 2021. Effects of combined high hydrostatic pressure and pH-shifting pretreatment on the structure and emulsifying properties of soy protein isolates. *Journal of Food Engineering*, 306, 110622. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110622>
- Tang, Z.X., Ying, R.F. and Shi, L.E., 2021. Physicochemical and functional characteristics of proteins treated by a pH-shift process: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(2), 515-529. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14758>
- Tejpal, C.S., Vijayagopal, P., Elavarasan, K., Prrabu, D.L., Lekshmi, R.G.K., Anandan, R., Sanal, E., Asha, K.K., Chatterjee, N.S., Mathew, S. and Ravishankar, C.N., 2021. Evaluation of pepsin derived tilapia fish waste protein hydrolysate as a feed ingredient for silver pompano (*Trachinotus blochii*) fingerlings: Influence on growth, metabolism, immune and disease resistance. *Animal Feed Science and Technology*, 272, 114748. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114748>
- Tian, Y., Wang, W., Yuan, C., Zhang, L., Liu, J. and Liu, J., 2017. Nutritional and digestive properties of protein isolates extracted from the muscle of the common carp using pH-shift processing. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12847. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12847>
- Tkaczewska, J., Borawska-Dziadkiewicz, J., Kulawik, P., Duda, I., Morawska, M. and Mickowska, B., 2020. The effects of hydrolysis condition on the antioxidant activity of protein hydrolysate from *Cyprinus carpio* skin gelatin. *LWT*, 117, 108616. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108616>
- Toldrá, F., 2003. Muscle foods: water, structure and functionality. *Food Science and Technology International*, 9(3), 173-177. <https://doi.org/10.1177/1082013203035048>
- Toribio, F., Moyano, E., Puignou, L. and Galceran, M.T., 2002. Ion-Trap Tandem Mass Spectrometry for the determination of heterocyclic amines in food. *Journal of Chromatography A*, 948(1-2), 267-281. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01476-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01476-5)
- Tu, M., Cheng, S., Lu, W. and Du, M., 2018. Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.005>
- Turan, S., Solak, R. ve Keskin, Ş., 2018. Gıdalarda monokloropropandiol esterlerinin oluşumu ve belirlenmesi. *Akademik Gıda*, 16(2), 210-217. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.449866>
- Türk Gıda Kodeksi (TGK), 2011. Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, Gıdalardaki Bulaşanların Maksimum Limitleri, 28157.
- Udenigwe, C.C. and Mohan, A., 2014. Mechanisms of food protein-derived antihypertensive peptides other than ACE inhibition. *Journal of Functional Foods*, 8, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.03.002>
- Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G. and Balasubramanian, T., 2014. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive

- peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). Biomedicine & Preventive Nutrition, 4(3), 343-353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bionut.2014.04.006>
- Unal, K., Karakaya, M. and Oz, F., 2018. The effects of different spices and fat types on the formation of heterocyclic aromatic amines in barbecued sucuk. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98(2), 719-725. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8519>
- Valcarcel, J., Sanz, N. and Vázquez, J.A., 2020. Optimization of the enzymatic protein hydrolysis of by-products from seabream (*Sparus aurata*) and seabass (*Dicentrarchus labrax*), chemical and functional characterization. Foods, 9(10), 1503. <https://doi.org/10.3390/foods9101503>
- Velíšek, J., Calta, P., Crews, C., Hasnip, S. and Doležal, M., 2003. 3-Chloropropane-1,2-diol in models simulating processed foods: precursors and agents causing its decomposition. Czech Journal of Food Sciences, 21(5), 153-161. <https://doi.org/10.17221/3493-CJFS>
- Velíšek, J., Davídek, J., Hajšová, J., Kubelka, V., Janíček, G. and Mánková, B., 1978. Chlorohydrins in protein hydrolysates. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 167, 241-244.
- Vellido-Perez, J.A., Ochando-Pulido, J.M., Brito-de la Fuente, E. and Martinez-Ferez, A., 2021. Novel emulsions-based technological approaches for the protection of omega-3 polyunsaturated fatty acids against oxidation processes-A comprehensive review. Food Structure, 27, 100175. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2021.100175>
- Vicente, E., Ariseto, A.P., Furlani, R.P.Z., Monteiro, V., Gonçalves, L.M., Pereira, A.L.D. and Toledo, M.C.F., 2015. Levels of 3-monochloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in selected processed foods from the Brazilian market. Food Research International, 77(Part 3), 310-314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.035>
- Vidal, A.R., Cansian, R.L., Mello, R.D.O., Demiate, I.M., Kempka, A.P., Dornelles, R.C.P., Rodriguez, J. M.L. and Campagnol, P.C.B., 2022. Production of collagens and protein hydrolysates with antimicrobial and antioxidant activity from sheep slaughter by-products. Antioxidants, 11(6), 1173. <https://doi.org/10.3390/antiox11061173>
- Villamil, O., Váquiro, H. and Solanilla, J.F., 2017. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. Food Chemistry, 224, 160-171. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.057>
- Waarde, A.V., 1988. Biochemistry of non-protein nitrogenous compounds in fish including the use of amino acids for anaerobic energy production. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 91(2), 207-228.
- Wachirattanapongmetee, K., Katekaew, S., Weerapreeyakul, N. and Thawornchinsombut, S., 2024. Differentiation of protein types extracted from tilapia byproducts by FTIR spectroscopy combined with chemometric analysis and their antioxidant protein hydrolysates. Food Chemistry, 437, 137862. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137862>
- Wachirattanapongmetee, K., Thawornchinsombut, S., Pitirit, T., Yongsawatdigul, J. and Park, J.W., 2009. Functional properties of protein hydrolysates prepared from alkali-aided protein extraction of hybrid catfish frame. Trends in Food Science & Technology, 1, 71-81.
- Wang, D. and Shahidi, F., 2018. Protein hydrolysate from turkey meat and optimization of its antioxidant potential by response surface methodology. Poultry Science, 97(5), 1824-1831. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex457>
- Wang, K., Han, L., Tan, Y., Hong, H. and Luo, Y., 2023. Generation of novel antioxidant peptides from silver carp muscle hydrolysate: Gastrointestinal digestion stability and

- transepithelial absorption property. *Food Chemistry*, 403, 134136. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134136>
- Wang, L., Ying, Y., Hu, Z., Wang, T., Shen, X. and Wu, P., 2016. Simultaneous determination of 2-and 3-MCPD esters in infant formula milk powder by solid-phase extraction and GC-MS analysis. *Journal of AOAC International*, 99(3), 786-791. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.15-0310>
- Wang, R., Tao, M., Zhu, Y., Fan, D., Wang, M. and Zhao, Y., 2021. Pueararin inhibited 3-chloropropane-1,2-diol fatty acid esters formation by reacting with glycidol and glycidyl esters. *Food Chemistry*, 358, 129843. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129843>
- Wang, W., Zhang, L., Wang, Z., Wang, X. and Liu, Y., 2019. Physicochemical and sensory variables of Maillard reaction products obtained from *Takifugu obscurus* muscle hydrolysates. *Food Chemistry*, 290, 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.065>
- Wang, Z., Xu, Y., Zhang, J., Li, X., Lin, Z. and Ma, C., 2011. Proteolysis, protein oxidation and protease activity in dry-cured Xuanwei ham during the salting stages. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(7), 1370-1377. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02626.x
- Wasswa, J., Tang, J. and Gu, X., 2008. Functional properties of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), Nile perch (*Lates niloticus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin hydrolysates. *International Journal of Food Properties*, 11(2), 339-350. <https://doi.org/10.1080/10942910701381188>
- Wasswa, J., Tang, J., Gu, X.H. and Yuan, X.Q., 2007. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 104(4), 1698-1704. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.044>
- Webster, J.D., Ledward, D.A. and Lawrie, R.A., 1982. Protein hydrolysates from meat industry by-products. *Meat Science*, 7(2), 147-157. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(82\)90080-8](https://doi.org/10.1016/0309-1740(82)90080-8)
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y. and Ma, H., 2020. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 308-322. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.019>
- Wong, S.F., Lee, B.Q., Low, K.H., Jenatabadi, H.S., Radzi, C.W.J.B.W.M. and Khora, S.M., 2020. Estimation of the dietary intake and risk assessment of food carcinogens (3-MCPD and 1,3-DCP) in soy sauces by Monte Carlo simulation. *Food Chemistry*, 311, 126033. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126033>
- Wouters, A.G.B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K. and Delcour, J.A., 2016. Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 786-800. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12209>
- Wöhrlin, F., Fry, H., Lahrssen-Wiederholt, M. and Preiß-Weigert, A., 2015. Occurrence of fatty acid esters of 3-MCPD, 2-MCPD and glycidol in infant formula. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(11), 1810-1822. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2015.1071497>
- Wu, D., Tu, M., Wang, Z., Wu, C., Yu, C., Battino, M., El-Seedi, H.R. and Du, M., 2020. Biological and conventional food processing modifications on food proteins: Structure,

- functionality, and bioactivity. *Biotechnology Advances*, 40, 107491. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107491>
- Xi, J. and Chen, Y., 2021a. Analysis of the relationship between heterocyclic amines and the oxidation and thermal decomposition of protein using the dry heated soy protein isolate system. *LWT*, 148, 111738. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111738>
- Xi, J. and Chen, Y., 2021b. Effects of tetrahydro-curcumin on the formation of β -carboline heterocyclic amines in dry-heated soy protein isolate in the presence of glucose. *LWT*, 152, 112362. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112362>
- Xiang, L., Qiu, Z., Zhao, R., Zheng, Z. and Qiao, X., 2023. Advancement and prospects of production, transport, functional activity and structure-activity relationship of food-derived angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(10), 1437-1463. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1964433>
- Xing-qian, Y., Dong-hong, L. and Cui, H., 2001. Some factors' effects on the solubility of protein from yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L) larvae. *Journal of Zhejiang University-Science A*, 2(4), 436-438. <https://doi.org/10.1631/BF02840562>
- Xu, X., Bi, K., Wu, G., Yang, P., Li, H., Jia, W. and Zhang, C., 2024. The effect of enzymatic hydrolysis and maillard reaction on the flavor of chicken osteopontin. *Foods*, 13(5), 702. <https://doi.org/10.3390/foods13050702>
- Yaman, Y.T., Bolat, G., Saygin, T.B. and Abaci, S., 2021. Molecularly imprinted label-free sensor platform for impedimetric detection of 3-monochloropropane-1,2-diol. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 328, 128986. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128986>
- Yan, Y., Zhou, Y.Q., Huang, J.J., Wan, X., Zeng, M.M., Chen, J., Li, W.W. and Jiang, J., 2022. Influence of soybean isolate on the formation of heterocyclic aromatic amines in roasted pork and its possible mechanism. *Food Chemistry*, 369, 130978. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130978>
- Yao, S., Li, W., Martin, G.J.O. and Ashokkumar, M., 2023. An investigation into the mechanism of alkaline extraction-isoelectric point precipitation (AE-IEP) of high-thiol plant proteins. *Applied Sciences*, 13(11), 6469. <https://doi.org/10.3390/app13116469>
- Yıldırım, A. ve Yorulmaz, A., 2017. Gıdalarda bulunan 3-Monokloropropan-1,2-diol ve glisidil esterlerinin analiz yöntemleri, azaltılmalarına yönelik çalışmalar ve sağlık üzerine etkilerine ilişkin güncel gelişmeler. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(12), 1497-1507. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i12.1497-1507.1192>
- Yıldız, N. ve Bircan, H., 1991. Uygulamalı istatistik. Atatürk Üniversitesi Yayınları, No: 704-308- 60.
- Yuan, Y., Cui, C., Liu, H., Li, X., Cao, Y., Zhang, Y. and Yan, H., 2022. Effects of oxidation and hydrolysis of frying oil on MCPD esters formation in Chinese fried dough sticks. *LWT*, 154, 112576. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112576>
- Zamora, R. and Hidalgo, F.J., 2020. Formation of heterocyclic aromatic amines with the structure of aminoimidazoazarenes in food products. *Food Chemistry*, 313, 126128. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126128>
- Zamora, R., Alcón, E. and Hidalgo, F.J., 2013. Effect of amino acids on the formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in creatinine/phenylalanine and creatinine/phenylalanine/4-oxo-2-nonenal reaction mixtures. *Food Chemistry*, 141(4), 4240-4245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.036>

- Zamorano-Apodaca, J.C., García-Sifuentes, C.O., Carvajal-Millán, E., Vallejo-Galland, B., Scheuren-Acevedo, S.M. and Lugo-Sánchez, M.E., 2020. Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species. *Food Chemistry*, 331, 127350. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127350>
- Zastrow, L., Albert, C., Speer, K., Schwind, K. H. and Jira, W., 2023. Formation of pyrolysis-affected PAHs, oxygenated PAHs and MCPDs in home smoked meat. *LWT*, 184, 114971. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114971>
- Zhang, B., Fang, C.D., Hao, G.J. and Zhang, Y.Y., 2018. Effect of kappa-carrageenan oligosaccharides on myofibrillar protein oxidation in peeled shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during long-term frozen storage. *Food Chemistry*, 245, 254-261. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.112>
- Zhang, H., Huang, X., Zhang, Y., Zou, X., Tian, L., Hong, H., Luo, Y. and Tan, Y., 2023. Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) by-product hydrolysates: A new nitrogen source for *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12. *Food Chemistry*, 404(Part B), 134630. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134630>
- Zhang, H., Zhang, Y., Javed, M., Cheng, M., Xiong, S. and Liu, Y., 2022b. Gelatin hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) improve the antioxidant and cryoprotective properties of unwashed frozen fish mince. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(5), 2619-2627. <https://doi.org/10.1111/ijfs.15121>
- Zhang, Y., Rui, X., Vaugeois, R. and Simpson, B.K., 2022a. Seal meat enzymatic hydrolysates and its digests: A comparison on protein and minerals profiles. *LWT*, 157, 113072. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113072>
- Zhao, S., Thakur, N., Salama, E.S., Zhang, P., Zhang, L., Xing, X., Yue, J., Song, Z., Nan, L., Yujun, S. and Li, X., 2022. Potential applications of protein-rich waste: Progress in energy management and material recovery. *Resources, Conservation and Recycling*, 182, 106315. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2022.106315>
- Zheng, X., Fu, W., Zheng, K., Gao, B., Lin, L., Liu, W., Lin, Z. and Fang, Q., 2021. A novel method for the simultaneous determination of esterified 2-/3-MCPD and glycidol in foods by GC-MS/MS. *Food Control*, 123, 107766. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107766>
- Zhong, H.N., Zeng, Y., Zhu, L., Pan, J.J., Wu, S.L., Li, D., Dong, B., Li, H.K., Wang, X.H., Zhang, H. and Zheng, J.G., 2022. The occurrence of Mono/Di-Chloropropanol contaminants in food contact papers and their potential health risk. *Food Packaging and Shelf Life*, 34, 101002. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.101002>
- Zou, Y., Shi, H., Chen, X., Xu, P., Jiang, D., Xu, W. and Wang, D., 2019. Modifying the structure, emulsifying and rheological properties of water-soluble protein from chicken liver by low-frequency ultrasound treatment. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 810-817. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.062>

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Elif EKİZ
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Tokat Atatürk Lisesi
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
Doktora:	Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	B1-Orta Üstü
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
- Ekiz, E., Oz, E., Oz, F. (2022). Protein Hydrolysate Production And Antioxidant Activity. Tokat 1st International Conference on Scientific Researches, Tokat, Türkiye, 20-21 Ağustos 2022, ss.123-129. -Ekiz, E., Oz, E., Oz, F. (2023). Functional and Rheological Properties of Protein Hydrolysates. International Congress on Food Researches, Sivas, Türkiye, 16-18 Ekim 2023, ss.508-514.	