



**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Onchorynchus mykiss*)
FİLETOLARINDA FARKLI ÖLDÜRME
TEKNİKLERİNİN ANTiOKSİDAN DÜZEYİ VE
PROTEİN OKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ**

Abdulcelil IŞIK

**Yüksek Lisans Tezi
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı
Doç. Dr. Gonca ALAK
2019
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Onchorynchus mykiss*)
FİLETOLARINDA FARKLI ÖLDÜRME TEKNİKLERİNİN
ANTİOKSİDAN DÜZEYİ VE PROTEİN OKSİDASYONU
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Abdulcelil IŞIK

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2019

Her Hakkı Saklıdır



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



TEZ ONAY FORMU

**GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Onchorynchus mykiss*) FİLETOLARINDA FARKLI
ÖLDÜRME TEKNİKLERİNİN ANTİOKSİDAN DÜZEYİ VE PROTEİN
OKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ**

Doç. Dr. Gonca ALAK danışmanlığında, Abdulcelil IŞIK tarafından hazırlanan bu çalışma, 21/02/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı – Su Ürünleri Mühendisliği Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği (3/0)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP

İmza :

Üye : Doç. Dr. Gonca ALAK

İmza :

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Aslı ÇİLİNGİR YELTEKİN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .07../03../2019 tarih ve .11../54..... nolu
kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

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

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Onchorynchus mykiss*) FİLETOLARINDA FARKLI ÖLDÜRME TEKNİKLERİNİN ANTIOKSİDAN DÜZEYİ VE PROTEİN OKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

Abdulcelil IŞIK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gonca ALAK

Bu çalışmada, gıda bozulmalarının ana nedeni olarak kabul edilen protein oksidasyonu ile öldürme teknikleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu amaçla başına vurma (T1), boynunu kırma (T2), ve çırpınma (T3) yöntemleri uygulanarak öldürülen gökkuşağı alabalığı (*Onchorynchus mykiss*) filetolarının antioksidan durumu, *in vivo* myofibriller protein (MP) oksidasyonu ve duyarlılığı ile ölüm sonrası oksidasyonu (hidroksil radikal oksidasyon sistemi ile indüklenen) değerlendirilmiştir.

Bu amaçla farklı stres koşulları altında öldürülen balıkların +4°C’de depolanan filetolarında protein oksidasyon parametreleri [pH, laktik asit, glikojen seviyesi, sülfidril grupları (-SH), disülfid bağları (S-S), karbonil miktarları ve protein profilleri] ile antioksidan seviyeleri (superoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx)), malondialdehit (MDA)), ölüm sonrası 72. saat boyunca farklı zaman aralıklarında analiz edilmiştir.

İncelenen tüm parametreler arasında istatistiki olarak önemli farklar belirlenmiş ($p<0,05$) söz konusu yöntemlerde en fazla stres veren tekniğin çırpınma yöntemi olduğu gözlenmiştir. Enzim aktivite sonuçları, yüksek MDA ve karbonil miktarı dikkate alındığında diğer gruplara oranla T3 grubunda en güçlü stres koşullarının oluştuğunu ve *in vivo* miyofibriller protein (MP) oksidasyonunu teşvik ettiğini göstermiştir ($p<0,05$). Bunun yanı sıra, yüksek H₂O₂ konsantrasyonlarında miyosin ağır zincir (MHC) yoğunluklarında ve sülfidril gruplarında ciddi kayıplar olduğu da belirlenmiştir ($p<0,05$).

Protein profillerinde miyosinin öldürme tekniğinden çok etkilendiği aktinde ise oksidasyon kaynaklı azalmaların olduğu belirlenmiştir. Yine S-S ve S-H’ larda azalmalar karbonil konsantrasyonlarında ise artışlar belirlenmiş fakat her iki süreç içinde en etkili değerler çırpınma tekniğinde belirlenmiştir.

Bulgularımız kısa süreyi kapsayan öldürme tekniklerinin (başına vurma ve boynunu kırma) *O. mykiss* refahını ve düşük MP oksidasyon oranları açısından daha iyi et kalitesi sonuçları verdiğini göstermektedir. Genel olarak, T3 grubu filetoların oksidatif hasara daha hassas olduğunu, T1 ve T2 gruplarının ise düşük MP oksidasyon oranları ile et kalitesinin korunmasında daha iyi sonuçlar verdiğini söyleyebiliriz.

2019, 60 sayfa

Anahtar Kelimeler: Öldürme tekniği, protein oksidasyonu, antioksidan durumu, stres, SDS-PAGE

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECT OF DIFFERENT SLAUGHTER TECHNIQUES ON ANTIOXIDANT STATUS AND PROTEIN OXIDATION OF RAINBOW TROUT (*Onchorynchus mykiss*) FILLETS

Abdulcelil IŞIK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Gonca ALAK

In recent years, protein oxidation has been accepted as the main cause of food spoilage. In this study, it is aimed to evaluate the status of antioxidant, in vivo myofibrillary protein (MP) oxidation - sensitization and post-death oxidation (induced by hydroxyl radical oxidation system) of commonly used slaughter techniques (T1; hitting to head, T2; neck crushing and T3; fluttering) on rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) filets.

For this purpose, in this study, activities of antioxidant enzyme, stress conditions and protein oxidation parameters [pH, lactic acid, glycogen level, antioxidant enzyme activities (CAT; catalase, GPx; glutathione peroxidase and SOD; superoxide dismutase), malondialdehyde level (MDA), sulfhydryl groups (-SH), disulfide bonds (S-S), carbonyl amounts and protein profiles were analyzed at different time intervals for 72 hours post-death.

Significant differences were found among all the parameters investigated ($p<0.05$) and it was observed that the most stressing technique was the fluttering method. When enzyme activity results, high MDA and carbonyl content were taken into consideration, it was determined that the strongest stress conditions occurred in fluttering group compared to other groups and in vivo myofibrillar protein (MP) oxidation was encouraged ($p<0.05$). Also, high concentrations of hydrogen peroxide were found to have serious losses in myosin heavy chain (MHC) concentrations and sulfhydryl groups ($p<0.05$).

It was determined that myosin was affected by the techniques in protein profiles, and in actin oxidation induced decreases. Reductions in disulfide bonds (S-S) and sulfhydryl groups (S-H) have also been shown to increase in carbonyl concentrations, but the most effective values in both processes have emerged in the T3 group (fluttering).

Our results showed that fluttering group (T3) filets were more sensitive to oxidative damage and hitting to head (T1) and neck crushing (T2) groups showed lower MP oxidation rates and improved meat quality.

2019, 60 pages

Key Words: Slaughter method, protein oxidation, antioxidant status, stress, SDS-PAGE

TEŞEKKÜR

Araştırmanın planlanmasında, yürütülmesinde ve değerlendirilmesinde bilgi birikimini, yardımlarını, maddi manevi desteğini benden hiç esirgemeyen ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gonca ALAK'a,

Desteğini ve bilgi birikimini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP'e,

Protein profilinin belirlenmesinde yardımlarını esirgemeyen Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Öğretim Üyelerinden Sayın Doç. Dr. Özgür KAYNAR ve Sayın Araş. Gör. Mustafa İLERİTÜRK'e,

Yüksek lisans eğitimimiz boyunca her zaman yanımda olup moral ve motivasyonumuzda destekçi olan Sayın Prof. Dr. İhsan Güngör ŞAT, Sayın Prof. Dr. Mustafa ARIK, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Özkan AÇIŞLI, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Arzu UÇAR ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Veysel PARLAK'a,

Tüm yaşamım boyunca bana her zaman güvenen, destekleyen, teşvik eden ve yalnız bırakmayan sevgili aileme, bu süreçte bana destek olan gıda mühendisi olarak görev yaptığım Erzurum Atatürk Üniversitesi yemekhanesi müdürlerime ve iş arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi yönden hep yanımda olan eşim Yasemin IŞIK'a ve minik kızım Sena'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Abdulcelil IŞIK

Şubat, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Su Ürünlerinin Kimyasal Bileşimi	1
1.2. Balık Eti Kalitesi Üzerine Rigor-mortisin Etkisi	6
1.3. Protein ve Lipid Oksidasyonu	9
1.4. Antioksidan Enzimler	12
1.5. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ	16
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1. Fileto Hazırlama ve Deneme Prosedürü.....	25
3.2. Kas Glikojen Seviyesinin Belirlenmesi.....	25
3.3. Laktik Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi	26
3.4. pH Ölçümü	26
3.5. Antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü	27
3.5.1. Homejenat hazırlama.....	27
3.5.2. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	27
3.5.3. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin ölçülmesi	27
3.5.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	28
3.5.5. Lipid peroksidasyonun (MDA) ölçülmesi.....	28
3.5.6. Protein miktarı ölçümü	29
3.6. Miyofibriler Proteinlerin Hazırlanması	29
3.7. Protein Oksidasyonu.....	29
3.8. Protein miktarının biüret yöntemi ile belirlenmesi.....	30
3.9. Sülfidril grupları ve disülfid bağlarının tayini.....	30

3.10. Karbonil Konsatrasyonunun Belirlenmesi	30
3.11. Protein Profilinin Belirlenmesi.....	31
3.11.1. SDS-PAGE analizi	31
3.11.2. Protein standardı.....	32
3.11.3. Proteinlerin molekül ağırlıklarının hesaplanması.....	32
3.12. İstatiksel Analizler.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	33
4.1. Kas glikojen seviyesi, laktik asit ve pH	33
4.2. Post-mortem Döneme Ait Antioksidan Enzim Aktivite ve MDA Seviyesi Değişimi.....	36
4.3. Post-mortem ve Oksidasyon Durumunda Sülfidril Grupları (SH), Disülfür Bağları (S-S) ve Karbonil Konsantrasyonları	39
4.4. Post-mortem ve Oksidasyon Aşamasına Ait Protein Profil Değişimi.....	45
5. SONUÇ	48
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	61

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
μmol	Mikromol
BHT	Butil Hidroksi Toluen
CAT	Katalaz
CuCl ₂	Bakır (II) Klorür
DNPH	2,4 –Dinitrofenilhidrazin
DTNB	2 –Nitrobenzoik Asit
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
EGTA	Etilen Glikol Bis
EU	Enzim Ünitesi
g	Gram
GPx	Glutasyon Peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
KH ₂ PO ₄	Potasyum <i>di</i> – Hidrojen Fosfat
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre
mmol	Milimol
MP	Miyofibriler Protein
NaCl	Sodyum Klorür
NADP ⁺	Nikotinamid Adenozin Difosfat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
mM	Mili molar
PİPES	2-Etansülfonik Asit
rpm	Dakikada Dönme Hızı
SDS - PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat – Poliakrilamid Jel Elektroferez

SOD	Süperoksit Dismutaz
t	Zaman
TBA	Tiyobarbitürik Asit
TCA	Trikloroasetik Asit
Vö	Örnek Hacmi
Vt	Toplam Hacim
μL	Mikrolitre
S-S	Disülfür Bağları
SH	Sülfidril Grupları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Somon balığı kas yapısı	4
Şekil 1.2. Kas dokusunda meydana gelen post-mortem değişimler	8
Şekil 3.1. Kas glikojen seviyesi standart eğrisi.....	26
Şekil 4.1. 0 ve 24. saate ait MP ve okside protein jel görüntüsü	46
Şekil 4.2. 48 ve 72. saate ait MP ve okside protein jel görüntüsü	47



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Balıkların yağlılık durumlarına göre sınıflandırılması	2
Çizelge 4.1. Farklı öldürme teknikleri ile öldürülen gökkuşacağı alabalığı filetolarının soğuk depolama ($4\pm0.5^{\circ}\text{C}$) boyunca kas glikojen seviyesi, laktik asit miktarı ve pH değişimleri	34
Çizelge 4.2. Farklı öldürme tekniklerinin antioksidan enzim aktivitesi; Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Malondialdehit (MDA) seviyesi üzerine etkisi.....	38
Çizelge 4.3. Farklı öldürme tekniklerinin miyofibriller proteinlerin disülfid (SS), sülfidril (SH) ve karbonil grupları (C=O) seviyesi üzerine etkisi	42
Çizelge 4.4. Farklı öldürme tekniklerinin okside proteinlerin disülfid (SS), sülfidril (SH) ve karbonil grupları (C=O) seviyesi üzerine etkisi	44

1. GİRİŞ

Nüfus artışı, gelişmiş ülkelerdeki sağlıklı beslenme bilinci gibi nedenler su ürünleri talebinde bir artışa neden olmuştur. Su ürünleri sanayisi, yüz milyonlarca insan için gıda temin ve gelir kaynağı olmanın yanı sıra sahip oldukları protein, yağ, karbonhidrat, vitamin ve mineral maddeleri açısından da dengeli beslenmede her geçen gün gıda sanayiinde önde gelen bir sektör halini almıştır.

Sağlıklı beslenme bilinci ile su ürünlerinin önemi hayvansal protein kaynakları arasında giderek artmıştır. Bu bağlamda, gıdaların kimyasal bileşimine önemli ölçüde dikkat edilerek, özellikle yağ ve kolesterolün yüksek seviyelerinin sağlığa olan olumsuz etkileri dikkate alınmış, doymamış yağlar ve omega grubu (ω -3, ω -6) yağ asitlerini içermelerinden dolayı balık ve su ürünlerinin tüketimi artmıştır (Gökoğlu 2002; Alak 2011).

1.1. Su Ürünlerinin Kimyasal Bileşimi

Ana bileşimi; su, yağ ve proteinden oluşan su ürünlerinin kimyasal bileşimi çeşitli faktörlere (çevre sıcaklığı, ürünün boyu, yaşı ve olgunluk gibi) bağlı olarak değişiklik gösterir. Su ürünlerinin % 98’ni oluşturan bu bileşenler, etin besin değeri, fonksiyonel özellikleri (koku ve damak tadı), duyu kalitesi, depolama stabilitesi üzerinde etkiye sahiptir. Karbonhidratlar, vitaminler, mineraller gibi diğer bileşenler az miktarda bulunmakla birlikte birçok biyokimyasal olaylarda önemli rol oynamaktadır (Çaklı 2008).

Su ürünlerinin temel bileşenlerinden birisi yağlardır. Balıklarda yağ miktarı proteinde olduğu gibi sabit olmayıp çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Balığın türü, yaşı, büyüklüğü, yaşadığı ortam, suyun sıcaklığı ve kirlilik durumu, beslenme koşulları, mevsim gibi faktörler yağ içeriği üzerinde önemli etkiye sahiptirler. Tüm dokularda bulunmalarına rağmen, daha çok yağlı balıkların deri altındaki yağlı

tabakalarında, yağsız balıkların karaciğer ve kas dokusunda bulunduğu rapor edilmiştir (Achman 1995; Dönmez ve Tatar 2001; Konar ve Köprücü 2002; Çaklı 2008).

Balıklarda lipidler fosfolipidler, steroller, trigliseroller, mum esterleri, gliseril esterleri, glikolipidler, sülfolipidler olarak bulunarak temel hücre fonksiyonlarına katılırlar (Gökoğlu 2002; Çaklı 2008). Yağlar, insan organizması için gerekli olan en önemli unsurlardan bir tanesidir. Sadece yüksek enerji kaynağı olmayıp aynı zamanda yağda çözünen vitaminleri bulundurmaları, proteinlerle bileşik oluşturmaları sonucunda lipoproteinleri oluşturmaları ve kan lipid düzeylerinde rol oynamaları bakımından oldukça önemlidir (Kaya vd 2004).

Balıklar içerdiği yağ oranları açısından yağsız, hafif yağlı, orta yağlı ve yağlı balıklar olarak sınıflandırılmaktadırlar (Çizelge 1.1.) (Çaklı 2008; Oehlenschläger and Rehbein 2009).

Çizelge 1.1. Balıkların yağlılık durumlarına göre sınıflandırılması (Çaklı 2008; Oehlenschläger and Rehbein 2009).

	Yağ oranı	Balık türü
Yağsız balıklar	<1	Mezgit, turna
Hafif yağlı balıklar	1-5	Kefal, alabalık
Orta yağlı balıklar	5-10	Sardalya, ton balığı, somon balığı
Yağlı balıklar	>10	Uskumru, ringa

Yağ miktarı, balığın türüne ve biyolojik durumuna göre %1'in altında olabildiği gibi %30'ların üzerine kadar da çıkabilmektedir (Oehlenschläger and Rehbein 2009). Yağlar gliserolün yağ asitleri ile oluşturduğu ester sınıfı bileşiklerdir. Bir molekül gliserolün üç molekül yağ asidi ile esterleşmesiyle bir trigliserid oluşmaktadır (Kaya vd 2004). Yağ asitleri genel olarak çift sayıda karbon atomu içeren, düz zincirli ve değişik zincir

uzunluğuna sahip monobazik organik asitler şeklinde tanımlanmaktadır (Achman 1995; aklı 2008). Yağ asitleri içerdikleri karbon atomlarının sayısı, zincir uzunlukları, karbon atomları arasındaki çift bağların sayıları ve doymamışlık derecelerine göre sınıflandırılmaktadırlar (Dönmez ve Tatar 2001). Bugüne kadar tanımlanabilmiş yağ asitleri en az 2, en çok 26 karbon atomu içerirler. Karbon sayısı 6’dan az olan yağ asitlerine kısa, 6-12 karbonlu yağ asitlerine orta, 14 ve daha fazla karbon atomu içeren yağ asitlerine uzun zincirli yağ asitleri denir (Achman 1995; aklı 2008).

Yağ asitlerinin zincir yapısındaki farklılıklar düz ya da dallanmış yapıda olmalarının yanı sıra doymuş, doymamış ve halkalı yapıda olup olmamalarına göre de değişkenlik göstermektedir. Molekül yapılarındaki bu farklılıklar, yağ asitlerinin fiziksel, kimyasal ve fizyolojik niteliklerinde de değişikliklere neden olduklarından, sınıflandırılarak incelenmektedir (Achman 1995).

Balık eti, yağların yanı sıra ortalama olarak %17-22 civarında protein ve %75-80 oranında su içermektedir. Balığın kalitesini önemli ölçüde belirleyen su miktarı çok sayıda faktörden etkilenmektedir. Özellikle beslenme ve cinsel olgunluk durumu, kasın su içeriği üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir. Pek çok balık türünde yumurtlama esnasında besin elementlerinin ve enerji rezervlerinin tükenmesi nedeniyle özellikle yağsız balıkların su miktarında bir artış görülmektedir (Sikorski *et al.* 1990; Gökoğlu 2002).

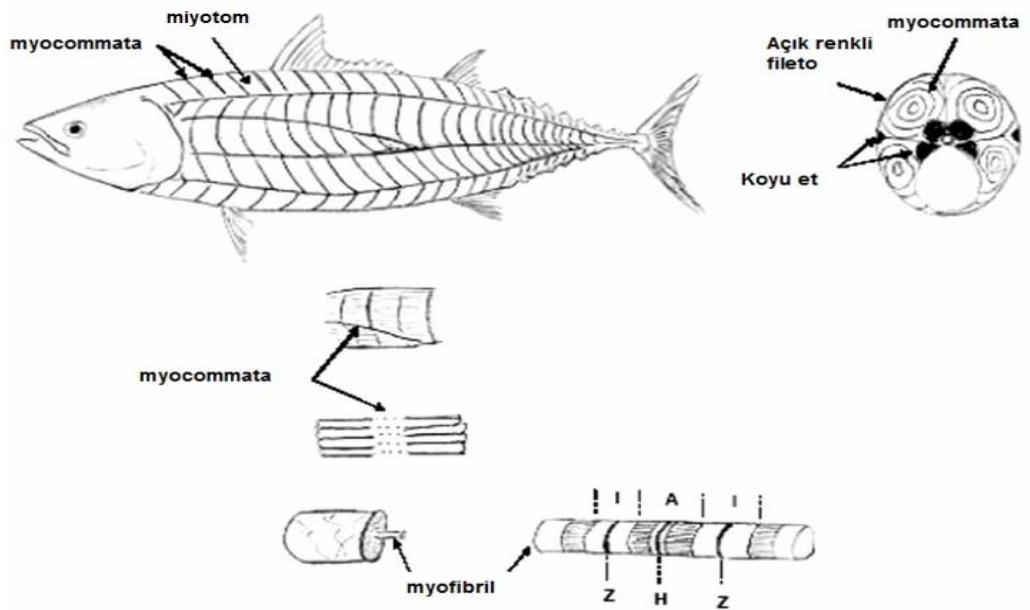
Beslenme durumu ve türlere bağlı olarak balık kas dokuları ortalama %50-85 oranında su içermektedir (Sikorski *et al.* 1990). Toplam suyun çok az miktarı (ortalama % 4) kimyasal olarak bağlanmışır. Balık etinde yağ miktarı arttıkça su miktarı azalma eğilimi göstermektedir. Canlının yaşı, boyu ve beslenme durumu su oranında etkilidir (Varlık 2004).

Kimyasal bileşiminde bulunan esansiyel aminoasitlerden dolayı, biyolojik değerleri oldukça yüksek protein ve yağ içeriği su ürünlerini diğer gıdalara oranla daha ayrıcalıklı bir hale getirmektedir. Su rnleri řu grup proteinleri içermektedir (Dönmez 2017);

-Sarkoplazmik proteinler: Biyokimyasal olayları yürüten bu proteinler, toplam proteinlerin %25-30'unu oluşturur ve düşük iyonik şiddete sahip tuz çözeltilerinde çözünmektedir. Balık kas dokusunda 100'e yakın sarkoplazmik protein bulunur. Bu proteinler özellikle hemoglobin, myoglobin, stokrom -C, myoalbumin, globulin ve çeşitli enzimlerin yapısında yoğun olarak yer almaktadır. Yine balık kas rengi de bu proteinlerin varlığı açısından önemli bir belirleyici olup kırmızı kaslarda beyaz kaslara göre daha yoğun bulunmaktadır (Şekil 1.1).

-Myofibriler proteinler: Balık kas dokusunda toplam proteinin %70-80'ini oluşturan bu proteinler kontraktif sistemi düzenlemektedir. Bu proteinler 0,3–1,0 iyonik şiddetli tuzlu su çözeltilerinde çözüneme özelliğine sahiptir. Balık kas dokusunda hakim proteinler; aktin, myosin, tropomyosin, aktomyosin ve titin (connectin) bu grupta incelenmektedir.

-Stroma proteinleri: Kompleks bir yapının kollajen ve elastin karması olan, sarkoplazmik ve myofibriler proteinlerin ekstraksiyon işleminden geriye kalan proteinler olarak tanımlanmaktadır. Balık kasındaki kollajen miktarı bazı faktörlere bağlı olarak (balığın cinsine, beslenme şekline ve erginlik durumuna) değişim gösterir ve kasın bütünlüğünden sorumlu olan proteinlerdir.



Şekil 1.1. Somon balığı kas yapısı (Kong 2007)

Protein olmayan azotlu bileşikler (PONB): Genel olarak koyu renkli kas içeren balıkların daha fazla miktarlarda protein olmayan azotlu bileşik içerdiği bilinmekle birlikte bu durumda tür, tazelik durumu ve balığın yaşadığı ortam koşullarının da etkili olduğu bilinmektedir. Deniz balıkları ve kabukluların kas dokularındaki PONB' in %85' ini aminler, aminoksitler, guazidinler, nükleotidler, serbest aminoasitler ve nükleotid yıkım ürünleri, amonyum ve üre türleri oluşturmaktadır (Gökoğlu 2002; Çaklı 2010; Çiftçi ve Cicik 2011; Dönmez 2017).

Gastrointestinal sistemde parçalanan proteinler, aminoasitler şeklinde emilirler ve bu amino asitler proteinlerin yapımında ve doku onarımında görev almaktadır (Gökoğlu 2002; Çaklı 2010; Çiftçi ve Cicik 2011; Dönmez 2017). Yirmi çeşit amino asitten triptofan, tireonin, fenilalanin, valin, izolösin, metionin, lizin, lösin gibi amino asitler esansiyel aminoasitler olup, insanlar tarafından gıdalarla alınırlar. Vücuttaki onarım ve gelişim süreçlerinde esansiyel aminoasitler çok büyük önem arz etmekte ve bir tane bile esansiyel amino asitin eksik olması hayati fonksiyonlarda ciddi olumsuzluklara neden olmaktadır (Gökoğlu 2002; Çaklı 2010; Çiftçi ve Cicik 2011; Dönmez 2017).

Vitaminler, insanların ve hayvanların gelişmeleri ve yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için gerekli olan, düşük miktarlarda dahi etkilerini gösterebilen organik yapıda maddeler olup enerji vermeyen ancak enerji değişimleri ve besin elementlerinin metabolizmasının düzenlenmesinde görev alan maddelerdir (Gökoğlu 2002). Vitaminler, yağda ve suda çözünen vitaminler olmak üzere iki grup altında incelenmektedir (Lall and Parazo 1995) ve fizyolojik fonksiyonların devam ettirebilmesi için gıdalarla birlikte alınmaları gerekmektedir (Lall and Parazo 1995; Çaklı 2008). Balıkların vitamin içerikleri farklı türlerin yanısıra aynı tür içerisinde de yaşa, boyuta, cinsiyete, mevsimlere, beslenme şekillerine, sağlık durumlarına ve yaşadıkları bölgelere göre değişiklik göstermektedir (Çaklı 2008; Oehlenschläger and Rehbein 2009).

Balıklar ve deniz ürünleri diğer yaşayan organizmalarda olduğu gibi 90 tane doğal element içermektedir. Vücut bileşimlerindeki en büyük oranı, karbon, hidrojen, nitrojen,

oksijen ve sülfür oluşturmaktadır. Buna ilaveten 6 tane önemli makro elementi (kalsiyum, magnezyum, fosfor, sodyum, potasyum ve klor) yapılarında barındırmaktadır (Lall 1995).

Balıklar ve deniz ürünleri mineral maddelerce zengin olup bu maddeleri besinlerden, yaşadıkları su ortamından doğal olarak almakta ve iskelet, kas ve diğer organlarında depolamaktadır (Küçükgülmez 2005).

1.2. Balık Eti Kalitesi Üzerine Rigor-mortisin Etkisi

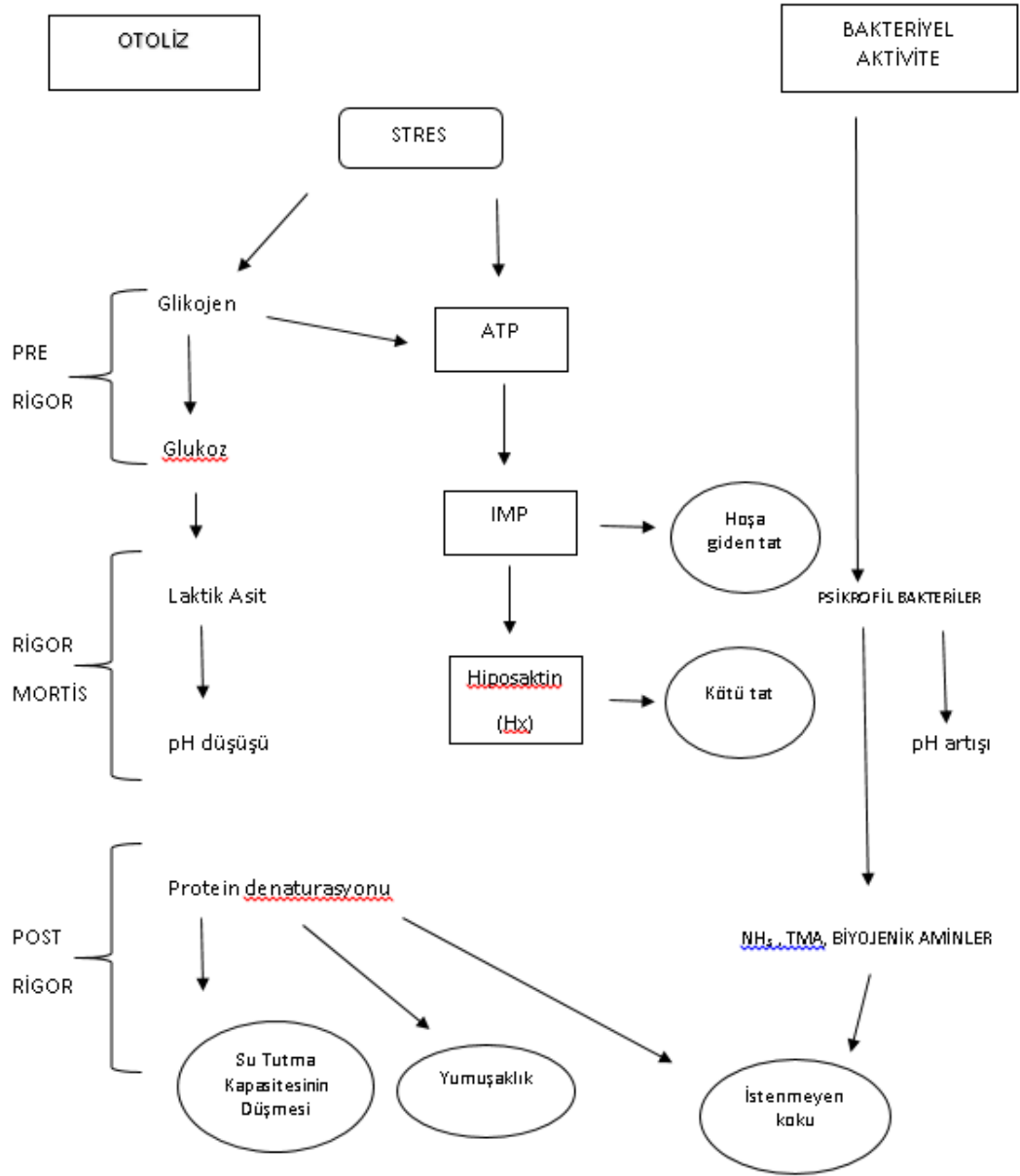
Avlanmayı takiben balıkta ölüm sonrası değişimler; balığın doğal ortamından alınması sonucu kan dolaşımının durması ve yaşamsal faaliyetlerinin sona ermesi ile oluşan metabolik artıkların uzaklaştırılamaması, enerji dönüşümünün kesilmesi ve doku gelişiminin sona ermesi gibi bir takım olayları kapsamaktadır. Her ne kadar balık avlanma sonrası yaşamsal fonksiyonlarını yitirmiş olsada kas dokusunda bulunan mevcut ATP ve glikojen gibi enerji kaynakları ve diğer kimyasal bileşikler ile post-mortem biyokimyasal reaksiyonlara maruz kalmaktadır. Balık kasındaki post-mortem değişimler; balığın türüne, büyüklüğüne ve ortam sıcaklığına göre hızlı veya yavaş gelişebilmektedir. Düşük sıcaklıklarda biyokimyasal reaksiyonların hızı yavaşlarken, yüksek sıcaklıklarda artmakta ve meydana gelen ürünler balıkta kalite kaybına ve ileri düzeyde bozulmaya neden olmaktadır (Soyer 1999).

Canlı balıkta kasın kasılması için gerekli enerji glikoliz sırasında oluşan ATP'den sağlanmaktadır. Bu durumda dokuda ATP tüketimi ve tekrar oluşumu, kasılma ve gevşeme olayları sürekli olurken, post-mortem sonrasında ise dokuda kan dolaşımı ve oksijen kaynağının kesilmesiyle birlikte ATP miktarı hızlı bir şekilde azalmakta, kasılma ve gevşeme olayları da bu azalma sırasında sınırlı olarak devam etmektedir (Foegeding *et al.* 1996). Bu mekanizma kısaca şöyle izah edilmektedir: Canlıının yaşamı sırasında kaslarda bulunan glikojen aerobik koşullarda, glikoza ($C_6H_{12}O_6$) dönüşerek oksijenle yanma reaksiyonu sonucu karbondioksit (CO_2) ve su (H_2O) açığa çıkar. Ortaya çıkan enerji ile canlı organizmanın enerji ihtiyacı karşılanır. Ölüm sonrası ise oksijen alımı durur ve yanma olayı gerçekleşmediği için kaslarda bulunan glikojen anaerobik şartlarda

parçalanarak laktik aside dönüşür (Thomas *et al.* 1999; Robb *et al.* 2000; Pottinger 2001; Robb 2001; Skjervold *et al.* 2001; Stien *et al.* 2005).

Balıklar avlandıktan sonra kas hücreleri canlılıklarını bir süre korumaktadır. Ancak balığın ölüm sürecinde kreatin fosfat konsantrasyonunun düşmesi ile birlikte myosine bağlı olan ATP konsantrasyonu da paralel olarak düşmektedir (Iwamoto *et al.* 1988; Watabe *et al.* 1991; Wang *et al.* 1998). Kasların kasılması sırasında ATP myosinden ayrılır ve serbest kalan myosin, kaslardaki konsantrasyonu düşmüş olan ATP'ye bağlanamayıp ortamda bulunan aktin ile birleşmesinden dolayı bir aktomyosin kompleksinin oluşumu gerçekleşir ve kaslarda sertleşme meydana gelir (Pate and Brokaw 1980; Wang *et al.* 1998). Canlının ölümünden kısa bir süre sonra kaslarda meydana gelen bu olaya rigor-mortis (ölüm sertliği) denir (Iwamoto *et al.* 1987; Wang *et al.* 1998). Sıcakkanlı hayvanlarda rigor-mortis süresi farklı türlerde 6-18 saat arasında değişirken, balıklarda normal koşullarda bu süre 1-3 saat arasındadır (Geri *et al.* 1996; Mecatti 1999; Boneli 1999).

Balıkların avlanmasını müteakip kas dokusunda meydana gelen biyokimyasal olaylar üç aşamada gerçekleşir; pre-rigor aşama (et yumuşak), rigor aşama (et sert) ve post-rigor aşama (ette sertlik kaybının meydana gelmesi) (Caggiano 2000).



Şekil 1.2. Kas dokusunda meydana gelen post-mortem değişimler (Caggiano 2000).

Pre-rigor: Balıkların ölümünden sonra hücrelere oksijen geçişi olmamasından dolayı vücuttaki reaksiyonlar anaerobik koşullarda gerçekleşmeye başlar, bu aşamada glikojen parçalanarak laktik asite dönüşür ve kaslardaki pH değeri düşer. Bu evrede balık eti yumuşak haldedir.

Rigor-mortis: Bu süreçte adenosin trifosfat (ATP), adenosin difosfat (ADP) ve adenosin monofosfat (AMP) miktarlarında düşme, balık etine lezzet veren IMP (inosin mono

fosfat) konsantrasyonunda ise belirli bir süre yükselme görülmektedir. Aynı zamanda ATP konsantrasyonunun düşmesine paralel olarak dokularda sertleşmelerde gözlenmektedir. Bu aşamada önemli olan bir diğer süreçte IMP'nin inosine ve devamı olarak da hipoksantine parçalanmasıdır ki balık etinde istenmeyen kötü kokular bu aşamada oluşmaktadır. Otolitik enzimlerin aktif hale gelerek protein yapısını parçalamaya başlaması ile birlikte rigor-mortis süreci tamamlanmış olur.

Post rigor: Bu aşamada kas proteinleri denatüre olmaya başlamakta ve etin su tutma kapasitesi düşmektedir (Caggiano 2000). Bu aşama, her bir balık türü için karakteristiktir ve sıcaklıkla değişkenlik göstermektedir.

1.3. Protein ve Lipid Oksidasyonu

Gıda sanayiinde en önemli bozulma sebeplerinden biri oksidasyondur. Bu konuda yapılan çalışmalar lipid oksidasyonu üzerine yoğunlaşmış, protein oksidasyonu ise önemsenmemiştir (Lund *et al.* 2011). Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar, su ürünlerinin bozulma sürecinde lipid oksidasyonu ve mikrobiyolojik bozulmalar kadar protein oksidasyonunun da rol oynadığını göstermektedir (Alak 2011; Zhang *et al.* 2017).

Oksidatif stres ürünleri veya proteinlerin reaktif oksijen türevleri ile kovalent modifikasyonu, protein oksidasyonunun oluşmasını sağlamaktadır (Shacter 2000). Proteinin birincil, ikincil ve üçüncül yapısında reaktif oksijen tarafından bir takım değişimlerin meydana gelebileceği bilinmektedir. Bu durum ürünün protein çözünürlüğü, rehidrasyon özelliği gibi fiziksel ve fonksiyonel özelliklerini de kapsayabilmektedir (Nakyinsige *et al.* 2015).

Gıdalarda (et, balık, tavuk) protein oksidasyonu bazı oksitleyiciler (reaktif oksijen türleri, reaktif azot türleri ve oksidasyonun ikincil ürünleri) tarafından teşvik edilebilir (Lund *et al.* 2011; Hailili 2017). Bunlar arasında hidroksil, süperoksit, peroksil ve nitrik oksit gibi serbest radikaller protein oksidasyonunda önemli rol oynamaktadır (Nakyinsige *et al.* 2015; Hailili 2017). Tüm ROS'lar arasında, hidroksil radikalleri (OH), en iyi bilinen ana

oksitleyici serbest radikaldır. Bu radikaller miyofibriler proteinin *in vitro* biyokimyasal özelliklerini etkileyerek genellikle Fenton tepkimesi ile hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında meydana gelen, demir ve hücrel indirgeyicilerle oluşur (Harel and Kanner 1985; Park *et al.* 2007a; Park *et al.* 2007b).

Oksidatif reaksiyon açısından miyosin ve troponin oldukça hassasken, bazı amino asitler (sistein, tirosin, fenilalanin, triptofan, histidin, prolin, arginin, lizin ve metiyonin) reaktif oksijen türlerine karşı kısmen hassasiyet gösterir. Özellikle kükürt içeren aminoasitlerin (sistein ve metiyonin gibi) daha kolay okside olabileceği belirtilerek genellikle güçlü reaktif radikallerin oksidasyonun başlatılmasında daha az seçici olduğu da ifade edilmiştir (Nakyinsige *et al.* 2015; Hailili 2017). ROS' lar ya amino asitlerin yan zincirlerini modifiye ederek ya da proteinin polipeptit bağına hücum ederek bu oksidasyonu başlatırlar. Devamında sırasıyla amino asitlerinin yan zincirlerinin değişime uğraması, proteinin parçalanması, agregasyonu, polimerizasyonu gibi süreçler meydana gelerek biyokimyasal ve fiziksel bozulma tetiklenir. Bu durum, gıdaların duyusal ve besleyici özelliklerini de olumsuz olarak etkileyebilmektedir (Lund *et al.* 2011; Nakyinsige *et al.* 2015; Hailili 2017; Zhang *et al.* 2017).

Protein yapısından hidrojenin ayrılması ile protein radikali oluşur ve oksijen varlığında peroksit radikale (POO^*) dönüşür. Başka molekülden hidrojen ayrılmasıyla alkil peroksit oluşumu, alkoksil radikal ve onun hidroksil türevlerinin hidroperoksit radikaliyle reaksiyonu sağlanmış olur (Nakyinsige *et al.* 2015).

Kas proteinlerinin, özellikle miyofibriller proteinlerin (MP), işleme ve saklama esnasında reaktif oksijen türlerine (ROS) duyarlı olduğunun ve serbest radikaller yoluyla proteinlerin oksidasyonuna neden olduğunun anlaşılmasıyla protein oksidasyon üzerindeki araştırmalar artmaya başlamıştır (Nakyinsige *et al.* 2015). Uygun ve özel metotların eksik olmasından dolayı bu alandaki araştırmalar yavaş ilerlemektedir (Lund *et al.* 2011). Saklama ve işleme esnasında meydana gelen oksidatif reaksiyonlar, işlenmiş ürünlerde reaktif oksijen türlerinin reaksiyon olasılığını artırarak oksidasyona müsait bir ortam hazırlamaktadır. Bu durumun, etin duyusal ve tekstürel birçok özelliğini olumsuz

olarak etkilediği bilinmektedir. Protein oksidasyonunda bazı faktörler (sıcaklık, pH, su aktivitesi ve ortamda bulunan katalist ve inhibitör maddeler) önemli rol oynamaktadır (Nakyinsige *et al.* 2015; Hailili 2017).

Kas proteinlerindeki reaktif oksijen türleri karbonil türevlerinin oluşumuna, sülfidril gruplarının kaybına ve oksidasyonun neden olduğu proteinlerin polimerizasyonu ile protein yapısı ve işlevsellikleri üzerinde daha fazla hasara yol açarak, protein agregalarının oluşumunu ve temel amino asitlerin yıkımı ile filetoların besin değerlerinin azalmasına neden olmaktadır (Lund *et al.* 2011). Karbonil gruplarındaki artış ve sülfidril gruplarındaki azalışla protein oksidasyonu izlenebilmektedir (Turan 2011; Bastioğlu vd 2016).

Et ürünlerinde lipid ve protein oksidasyonu arasındaki ilişki tam olarak aydınlatılmamış olsa da lipid peroksit ürünlerinin protein oksidasyonunu başlattığı yönünde görüşler bulunmaktadır (Soladoye *et al.* 2015).

Gıdaların besleyicilik özellikleri ve kaliteleri açısından en az proteinler kadar önemli olan bir diğer grupta lipidlerdir. Bu grup oksidatif reaksiyonların esas hedefi olup, işlenmiş ve işlenmemiş gıda ürünlerinde ciddi problemlere (tat, koku, renk ve beslenme değerlerinde istenmeyen değişim, zararlı bileşenlerin oluşumu ve raf ömrünün kısalması) neden olmaktadır (Elias *et al.* 2008; Gallo *et al.* 2012). Farklı enzimatik ve kimyasal süreçler (fotooksidasyon, lipoksigenaz enziminin aktivitesi ve otooksidasyon (serbest radikal zincir reaksiyonları)) sonucunda lipid oksidasyonu gerçekleşebilmektedir. Bu mekanizmaların içerisinde en önemlisi otooksidasyondur (Fernandez *et al.* 1997).

Başlıca üç basamakta gerçekleşen lipid oksidasyonunda öncelikle hidrojen, doymamış yağ asidinden ayrılır ve geriye serbest lipid radikali kalır. Daha sonra serbest lipid radikali oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksi radikalini, bu da doymamış yağ asidi zincirinden hidrojeni ayırarak hidroperoksidleri ve yeni bir serbest lipid radikalini oluşturur. Son aşamada ise hidroksiperoksitler bakır, demir gibi metal iyonları varlığında

çok hızlı bir şekilde bazı bileşenlere (keton, aldehit ve benzer) parçalanır (Warthesen *et al.* 1997).

1.4. Antioksidan Enzimler

Reaktif oksijen türlerinin düzeylerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için canlılarda antioksidan savunma sistemleri (ASS) gelişmiştir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler (Kılbaş 2006). Biyolojik ve biyokimyasal sistemlerde katalaz (CAT), peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GSSG-Rx) ve süperoksit dismutaz (SOD) antioksidant etkiye sahip oldukça önemli enzimlerdir (Gülçin 2002). Antioksidan enzimler oksidatif stres tarafından indüklenen anahtar bileşenlerdir (Oruç *et al.* 2004; Alak *et al.* 2017a, 2017b). Bu enzimler, endojen [Süperoksitdismutaz (SOD), Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), Glutatyon-S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT), Mitokondriyal sitokromoksidaz sistemi, Hidroperoksidaz] ve eksojen [Vitamin E ve C, bazı ilaçlar] olmak üzere iki grup altında incelenmektedir. Antioksidan enzimler hücre dengesinin düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahiptir (Doyotte *et al.* 1997; Alak *et al.* 2013). Oksijen yönünden zengin bir atmosferin varlığı reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS)'ne karşı çıkan endojen bir antioksidant sistemin gelişmesini sağlamıştır (Sen and Packer 2000; Uçar *et al.* 2012). Bu O₂ metabolizması ürünlerinin azaltılması enzimatik SOD, CAT ve GSH-Px hücresel savunma mekanizmalarıyla kontrol edilmektedir.

Süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1, EC-SOD): Süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit (H₂O₂) ve moleküler oksijene (O₂) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir. SOD'un fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının (O₂⁻) lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerine karşı korumaktır. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır (Atabeyoğlu 2011).

Glutatyon peroksidaz (Glutatyon: H₂O₂ oksidoredüktaz, EC 1.11.1.9): Hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

sitozolde bulunur. Diğer antioksidan enzimlerle birlikte GSH-Px, oksijen tüketiminin hızla arttığı sırada serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. GSH-Px, eritrositlerde oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (Ahmad *et al.* 1995).

Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6): Protein yapısında bol miktarda bulunan karakteristik bir enzimdir. Bu enzim yaygın bir şekilde hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda mevcuttur. Ayrıca toksik hidrojen peroksidi, hücrelerden uzaklaştırmada da önemli bir rol oynamaktadır (DeDuve 1983). Katalaz genellikle H_2O_2 üreten enzimlerin lokalize olduğu peroksizomlarda bulunmaktadır. Balıklarda, amfibilerde ve memelilerde karaciğer, böbrek, kalp ve beyinde yüksekten düşüğe doğru aktivite dağılımı göstermektedir (Ahmad *et al.* 1995). Katalaz, hidrojen peroksitin suya dönüştürülmesini tek yönlü olarak gerçekleştirir (Kunce and Trelease 1986; Havir and Mchale 1987; Keha ve Küfrevioğlu 2012) ve prostetik grup olarak “hem” grubunu içerir (Kar and Mishra 1976; Yamaguchi and Nishimura 1984). Omurgalı, omurgasız, bitki ve mantarlarda mevcut olup yüksek bir turnover sayısına ($5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) sahiptir (Odabaşoğlu 1988).

Oksidatif stres durumunda serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur ve dokularda hasarlar oluşmaya başlar. Bu durumda en fazla hücre membranlarında bulunan poliansatüre yağ asitleri (PUFA) olumsuz etkilenecek lipid peroksidasyonunu başlatır. Lipid peroksidasyonu sonucunda, lipid peroksitleri (lipid peroksit, siklik peroksit ve siklik endoperoksit) oluşmakta ve bu reaksiyon zincirleme olarak devam etmektedir. Lipid peroksidasyonunda açığa çıkan zararlı ürünler sonraki basamakta membran proteinlerinin yapısını bozarak hücrede kalıcı hasarlara sebep olmaktadır (İspirli 2016; Parlak 2016).

Yapılan literatür taramalarında, balık yemlerinde antioksidan kullanımı ile ilgili çok çalışmaya rastlanılmıştır (Sönmez *et al.* 2015; Castro *et al.* 2015; Guardiola *et al.* 2017; Alak *et al.* 2018, 2019a, 2019b; Yılmaz 2018; Wang *et al.* 2019). Fakat bu enzimlerin, balıklarda öldürülme stresi ve protein oksidasyonu ile ilgili korelasyonları hakkında sınırlı çalışma bulunmaktadır (Zhang *et al.* 2017).

Stres cevabı, omurgalılarda fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak algılanan tehditlere karşı başlatılan değişken bir işlevdir (Ashley 2007). Balıklarda öldürme öncesi stresörler (kesim, yakalama, muhafaza, taşıma, öldürme) güçlü bir şekilde metabolik, hücresel, osmoregülatif, hematolojik ve bağışıklık değişikliklerini içeren ve balık filetolarının kalitesini bozan faktörler olduğu doğrulanmıştır (Barton 2002; Poli *et al.* 2005). Kalite özelliklerinin yanı sıra, kesim öncesi stresin proteinlerin ve miyofibriller proteolizin oksidatif stabilitesini de etkilediği bildirilmiştir (Silva *et al.* 2012).

1.5. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Elektroforetik metotlar genellikle büyüklük, yük ve 3 boyutlu yapı (konformasyon) bakımından yüklü durumda olan makromoleküllerin yüksüz bir ortamda birbirinden ayrılması için kullanılmaktadır. Moleküller sahip oldukları elektron yüküne göre elektroforez esnasında jel üzerinde zıt elektrota doğru hareket ederler. Benzer şekilde protein ya da DNA/RNA elektriksel bir ortamda yükü ile doğru orantılı ancak şekli ve büyüklüğü ile ters orantılı bir hızda hareket eder (Parlak 2016; Ölmez 2017).

SDS-PAGE metodu en yaygın olarak uygulanan protein elektroforez yöntemidir. Bu yöntem daha çok proteinlerin molekül ağırlıklarının saptanmasında, protein saflığının kontrolünde, proteinleri fraksiyonlamada ve saf proteinin alt yapısının incelenmesinde kullanılmaktadır. Bu teknik yüksek çözünürlük sağlaması, kolay tekrarlanabilirliği ve proteinlerin elektroferogramlarda molekül ağırlıklarına göre hareket etmesinden dolayı oldukça avantajlıdır (Ateş vd 2008; Ünlüsayın *et al.* 2009; Söbeli ve Kayaardı 2014; Ölmez 2017).

Amino asit içeriği yönünden zengin olan hidrolizatların fonksiyonel materyal olarak kullanımında hidrolize proteinin molekül ağırlığı en önemli faktördür. İstenen moleküler büyüklük ve fonksiyonel özellikteki bir hidrolizatı veya peptid fraksiyonunun elde edilmesi için kullanılacak yöntemlerle bu proteinlerin tespitinde kullanılan yöntemler farklıdır (Ekici ve Akyüz 2003; Aylangan ve Öztan 2008; Ayana ve Turhan 2010; Ölmez

2017). SDS-PAGE tekniği, et proteinlerinin ayırımında kullanılabilecek uygun bir yöntem olduğu kanaatine varılmıştır (Ekici ve Akyüz 2003; Ölmez 2017).

Yukarda irdelenen tüm durumlar göz önüne alındığında, ölüm sonrası balıkların et kalitesi üzerine etkili olan en önemli sürecin rigor-mortis olduğu anlaşılmıştır (Sikorski *et al.*1990; Ruff *et al.* 2002). Rigor-mortis hızı geniş şekilde pre-mortem (ölüm öncesi) safhadaki stresin (Nakayama *et al.*1992; Loewe *et al.*1993) ve et kalitesinin (Stroud 1969; Loewe *et al.*1993) belirteci olarak kullanılabilmektedir (Skjervold *et al.* 1999). Özellikle avlanmadan sonraki ölüm şekli oldukça önemli olup balıkların strese girmesi sonucu ROS bileşiminin arttığı bilinmektedir. Kas proteinleri, özellikle miyofibriler proteinler (MP), reaktif oksijene duyarlıdır ve serbest radikallerle protein oksidasyonunun devam edeceğine inanılmaktadır. Bu doğrultuda hidroksil radikal oksitleme sistemi gıdalarda protein oksidasyonu üzerine yaygın olarak çalışılan bir konudur (Cui *et al.* 2012; Bastıoğlu vd 2016; Chen *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2017). Fakat öldürölme şeklinin protein oksidasyonunu nasıl etkilediği hakkında sınırlı bilgi mevcuttur. Konu ile ilgili çalışmaların az olması ve çeşitlendirilmemesi, gıda sistemlerinde özellikle de su ürünlerinde görölün protein oksidasyon mekanizmasını henüz tam olarak aydınlatamamıştır (Utrera and Estevez 2012).

Bu çalışmanın amacı, özellikle balık çiftliklerinde sık kullanılan öldürme tekniklerinin nasıl bir strese (antioksidan enzim ve malondialdehit seviyesi) sebep olduğunu, *in vivo* protein oksidasyonu ve postmortem oksidasyonlarla alabalık filetosu üzerine etkisini kas glikojen seviyesi, pH, laktik asit seviyesi, S-S bağları, SH ve karbonil konsantrasyonlarının yanı sıra protein profili ile inceleyerek en uygun öldürme tekniğini belirlemektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Zhang *et al.* (2007), yaptıkları çalışmada, *Sparus macrocephalus* 'u, 8 hafta boyunca farklı seviyelerde alfa-tokoferil asetat içeren diyetlerle besleyerek fileto kalitesi ve enzim aktivitelerini araştırmışlardır. Deneme sonunda toplam serum süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin alfa-tokoferil asetat ilavesi ile yükseldiğini ortaya koymuşlardır. Elde edilen filetoların soğukta depolanması sırasında, yüksek oranda alfa-tokoferil asetatla beslenen balık filetolarının oksidasyon seviyelerinin oldukça düşük olduğunu ve lipid peroksidasyonunun önlendiğini rapor etmişlerdir.

Elektrik alan şiddeti ve akım süresinin, sinüzoidal 50 Hz AC ile sersemletilerek avlanan yabani Atlantik ringa balığı (*Clupea harengus*) üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, değişen elektrik alan kuvvetleri ve akım sürelerinin fileto kalitesini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır (Nordgreen *et al.* 2008).

Roth *et al.* (2009), Atlantik somonlarda (*Salmo salar*) öldürme öncesi balık pompası ile toplama ve canlı dondurma streslerinin taze ve füme ürünlerindeki et kalitesini araştırmışlar. Bu işlemlerin ardından balıklar kafeslerde, elektrik şoku (16 saniyelik) ile sersemletilerek, 4 gün boyunca kasta pH ve rigor indeks ölçümleri yapılmıştır. Yine filetoların bir kısmı (taze) pre ya da post-rigor aşamalarda buzdolabında 7 gün depolamanın ardından renk, damlama kaybı ve doku sertliği açısından analiz edilirken, diğer filetolar ise kuru tuzlanıp tütsülenerek 14 gün sonunda aynı analizlere tabi tutulmuştur. Kas pH'sı ve sertliğin rigorun başlangıcına göre, stres faktörü sayısı ile (pompa ile toplama, canlı soğutma ve elektrik çarpması) azaldığını, taze filetolar için filetolama yöntemi ve kesim öncesi koşullarla öldürme tekniğinin son ürün kalitesinde oldukça etkili olduğunu, işlenmiş ürünlerde (tuzlama ve tütsüleme) ise kesim veya filetolama yöntemlerinden kaynaklanan farklılıkların ortadan kalktığını bildirmişlerdir.

Kesim öncesi işlemlerin stres yanıtları ve et kalitesine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, denizde yetiştirilen gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) sırasıyla

nakliye, 4 gün kafeste tutma, 30–50 dk yoğun stoklama, pompa ile toplama, elektrik şoku ve yeniden 4 saat yoğun stoklama gibi işlemlere tabi tutulmuştur. Rigor-mortisin zaman seyri ölüm sonrası 72 saat olarak değerlendirilmiş ve fileto kesimleri yapılan örneklerin esneme ve ağırlık kaybı gibi parametreleri incelenmiştir. Hem stoklama hem de pompa ile toplamanın rigor-mortisi başlatmada hızlandırıcı etkisi olduğu, taşıma ve elektrik şokunun ise etkili olmadığı bildirilmiştir. Esneme ve ağırlık kaybında ise pompa ile toplama ve elektrik şokunun önemli olduğunu ve yapılan ön işlemlerin strese neden olarak gökkuşağı alabalığında rigor-mortisi ve et kalitesini etkilediği sonucuna varılmıştır (Merkin *et al.* 2010).

Sun and Holley (2010), yüksek hidrostatik basınç (YHB) uygulamasının et protein konformasyonu ve protein denatürasyonunda etkili olduğunu ve protein jelleşmesini indükleyebileceğini bildirmiştir. Et protein sistemine, basınç, sıcaklık ve basınç işleminin süresine bağlı olarak, et tekstürel değişimlerinin (yumuşama-sertleşme) olabileceğini ve söz konusu uygulamanın pre-rigor evrede eti yumuşattığını kaydetmiştir.

Atlantik morinalarda stresin ürün kalitesi üzerindeki potansiyel etkilerinin araştırıldığı çalışmada, balıklar çeşitli (metomidat veya isoeugenol uygulanarak bayılma ve 30 dk. yakalama stresi) stres ortamlarına maruz bırakılmıştır. Stresle ilişkili parametreler için temel değerler (kan biyokimyası, kas yüksek enerjili fosfatlar ve inosin monofosfat, başlangıç pH, kas seğirmeleri ve rigor-mortis) belirlenerek analizler yapılmış ve oluşturulan stresin üstesinden gelinmesinin et kalitesinde olumsuz bir etkiye neden olmadığı bildirilmiştir (Erikson *et al.* 2011).

Rahmanifarah *et al.* (2011), sazanlarda (*Cyprinus carpio*) kesim öncesi farklı şoklama yöntemlerinin balık davranışları ve ürünün kalitesi üzerine etkisini incelemiştir. Karanfil yağı, CO₂, soğutarak hipotermi (HY) ve asfeksi (AS) yöntemleri kullandıkları çalışmalarında rigor motris, pH ve et kalite ölçümleri ile kalite üzerindeki değişimler araştırılmıştır. Et kalitesi ölçümlerinde CO₂ ve asfeksi grubunda pH'nın hızlı düştüğü, rigor- mortisin erken başladığı ve çözüldüğü ortaya koyulmuştur.

Yapılan bir çalışmada, geleneksel buz depolaması yerine, bulamaçla soğutma yoluyla morina balıklarının hasadı araştırılmıştır. Bulamaçla deneme prosedüründe, $-2.0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 'de deniz suyu çamuru kullanılmış ve anestezi edilmiş (AQUI-S TM) balıklar ile perküsyonda sersemletilen ve bulamaç içinde soğutulan morina balıkları karşılaştırılmıştır. Buzda saklanan morinalar ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Balıklarda öldürme sonrasında 7 ve 14. günlerinde taşıma stresi (başlangıç kas pH' sı, kas seğirmeleri, rigor-mortis), çekirdek sıcaklıkları, kalite indeks metodu, mikrobiyolojik sayımlar, ağırlık değişimleri, fileto renkleri gibi parametreler incelenmiştir. Belirlenen depolama günleri sonrası (7 ve 14. günler) su içeriği, pH, adenosin trifosfat-degradasyon ürünleri, K değeri, su tutma kapasitesi, fileto rengi ve dokusal analizler yapılmıştır. Bulamaçta bekletilen morinaların buzda soğutmadan daha hızlı soğuduğu ve daha yüksek kalite değerleri gösterdiğini bildirmişlerdir. Aşırı soğutmanın potansiyel avantajlarının (daha düşük mikrobiyolojik aktivite, buzda depolanan balıklara kıyasla tazeliğin daha iyi korunması) yanı sıra daha düşük toplam kalite indeksi skorları ve daha düşük K değerleri gibi parametrelerde de 14 gün sonunda daha belirgin farkların oluştuğu, kesim öncesi strese maruz bırakılan filetolarda daha yüksek inosin monofosfat (IMP) değerleri elde edildiği rapor edilmiştir (Digre *et al.* 2011).

Addis *et al.* (2012), Avrupa levreklerinde (*Dicentrarchus labrax*) kas doku proteinlerinin postmortem bütünlüğü üzerine öldürme tekniğinin etkisini araştırdıkları çalışmalarında, iki boyutlu jel elektroforezi (2D DIGE) kullanılarak üç farklı kesim tekniğini [havadaki asfeksi (AA), buzda asfeksi (AI) ve omurilikte kırılma (SCS)] incelemişlerdir. Tek proteinler açısından, en önemli etkiyi nükleosit difosfat kinaz B üzerinde gördüklerini ve bu durumdan SCS uygulanan balıkların daha az etkilendiğini bildirmişlerdir. Sarkomerik proteinlerden ise miyosin ağır zinciri ve miyosin bağlayıcı protein C ve sitosolik proteinler fruktoz bifosfat aldolaz, gliseraldehid 3-fosfat dehidrojenaz ve enolaz 1'in bütünlüğü de yine bu teknikle daha iyi korunmuştur. Bu tekniğin erken post-mortem fazdan beri kas proteini bütünlüğü üzerindeki etkisi tespit edilebilir olması ve protein bütünlüğünü buzda ya da havada asfeksi ile ölümden daha iyi koruduğu dolayısıyla tercih edilebilir olacağını ifade etmişlerdir.

Sazanlarda (*Cyprinus carpio*) hasat, nakil ve öldürme yönteminin, et kalitesine etkisinin araştırıldığı çalışmada balıklar başlarına vurma, CO₂ ve canlı dondurma teknikleri uygulanarak öldürülmüştür. Yapılan işlemlerde kafasına vurmanın et kalitesini olumsuz etkilemediği, CO₂ uygulamasının rigor-mortis gelişiminde etkili olduğu, en büyük stresin ise canlı dondurma tekniğinde gözlemlendiği bildirilmiştir. CO₂ ve canlı soğutma uygulanan gruplarda pH düzeylerinde düşüş olduğu kaydedilmiştir. Buna ilaveten hayvan refahı standartlarına göre en uygun bulunan başına vurarak öldürme yönteminin aynı zamanda en iyi fileto kalitesini sağladığı bildirilmiştir (Varga *et al.* 2014).

Faizan *et al.* (2013) Atlantik somonlarında, diyetel alfa tokoferolün vitamin E doku konsantrasyonları, lipid peroksidasyonu (malondialdehid), antioksidan enzimler ve yağ asidi bileşimi üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, 14 hafta boyunca farklı seviyelerde (150 ve 400 mg / kg) E vitamini ile besleme yapmışlardır. Deneme süresi sonunda, alfa-tokoferolün filetolarda malondialdehid konsantrasyonlarında azalışa neden olduğunu, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz dahil olmak üzere karaciğer antioksidan enzimlerinde ise değişim gözlenmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca alfa-tokoferol takviyelerinin, Atlantik somon filetolarının et kalitesini ve besin değerini olumlu yönde arttırabileceğini de ifade etmişlerdir.

Atlantik salmonlarda (*Salmo salar*) öldürme şeklinin et kalitesi üzerine etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, balıklar (1) perküsyon ve ardından hemen kesim, (2) karbondioksit (CO₂) maruz bırakıldıktan sonra canlı dondurma ve (3) CO₂'ye maruz bırakıp darbeli vurma-ve hemen kesim yöntemleri kullanılarak öldürülmüştür. Uygulanan işlemlerde en yüksek kas sertliğinin, perküsyon ve ardından hemen kesim yapılan grupta belirlendiği, CO₂ kombinasyonlarında ise düşük sertlik değerlerinin olduğu bildirilmiştir (Merkin *et al.* 2014).

Rotabakk *et al.* (2014), Atlantik morina (*Gadus morhua*) ile yaptıkları çalışmada, balıkları öldürdükten sonra 2 grup halinde (kesim sonrası hemen fileto haline getirilen ve 30 dk. işlem sürecinden sonra fileto haline getirilen) oluşturulan örnekleri süper soğutulmuş veya geleneksel olarak buz üzerinde saklamıştır. Ardından 7 gün sonra post-

Daskalova and Pavlov (2015), iki farklı öldürme tekniğinin (ani ölüm ve elektrik şoku), postmortem kas değişimleri ve et kalitesi üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Post-mortem metabolik değişiklikleri değerlendirmek için farklı zaman aralıklarında kas pH değeri; kalite parametrelerinden et rengi, damlama kaybı ve su aktivitesi ölçümlemleri yapmışlardır. Ani öldürülen grupta balıkların hafif hızlandırılmış kas metabolizması, daha yüksek kızarıklık (a *) ve sarılık (b *) renk değerleri ile daha düşük su aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

Elektrik uygulaması ile sersemletilmiş Avrupa levreği (*Dicentrarchus labrax*) üzerine su-buz bulamaçlarında iki farklı kesim işlemi uygulanmış, aktin yıkımı ve fileto kalite özellikleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Rigor-mortis indeksi iki kesim tekniği için benzer iken, kesme kuvveti ölçümü, su- buz uygulanan balıklarda daha hızlı ve yoğun bir şekilde meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca su-buz daldırma prosedürünün, daha fazla miktarda aktin fragmanının korunumunda da etkili olduğu ifade edilmiştir. Su-buz ile muamele edilen deniz levreklerinde kas dokusunun belirgin viskozitesi ve su tutma kapasitesi daha düşük bulunarak aktin bütünlüğünü korumak için su-buzun daha iyi olduğu, daha yüksek viskozite ve su tutma kapasitesi değerleri ile de daha az kas hasarı sağladığı bildirilmiştir (Tulli *et al.* 2015).

Secci *et al.* (2016), karbonmonoksit (CO) uygulanarak öldürülen Atlantik somonlarda (*Salmo salar*) balık filetoalarının lipid ve kolesterol oksidasyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu amaçla, buzdolabında (2.5°C) depolanan filetolarda, T0 (ölümden 64 saat sonra) ve T14 (T0'dan 14 gün) zaman aralıklarında yaptıkları analizlerde, yağ asidi profili, birincil (konjuge dienes) ve ikincil (TBARS) oksidasyon ürünleri, kolesterol oksidasyonu ve karotenoidlerin öldürme yöntemiyle etkilenmediğini rapor etmişlerdir. Depolamanın oksidasyon ürünlerini artırarak balık kasının oksidatif stabilitesini etkilediğini ve öldürme yöntemine bakılmaksızın kesimden hemen sonra somon filetoalarının kalitesinin 14 günlük buzdolabında depolama sonucunda kabul edilebilir sınırdaki değişim gösterdiğini bildirmişlerdir.

Seriolella punctata'dan üretilen biyoaktif peptitlerin balık filetolarının depolanması sırasında bu peptitlerin salımı üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada, filetolar belirli günlerde (7 ve 28 gün) farklı (4°C, 6°C ve dondurucu -18°C) sıcaklıklarda depolanmıştır. Sonuçlarda, post-mortem depolama sırasında, filetolardan salgılanan endojen enzimlerin bir dizi polipeptitten oluştuğu, biyoaktivitelerin 7 günde 4°C'de, 6 ve -18°C'ye kıyasla daha iyi olduğu, bu balıktan elde edilen filetoların fizyolojik gücünün saklama koşulları ile manipüle edilebileceği rapor edilmiştir (Manikkam *et al.* 2016).

Concollato *et al.* (2016) karbon monoksit (CO) uygulayarak öldürdükleri salmonları hiçbir müdahale yapmadan veya etanolde kurutarak preparatlar hazırlamıştır. Ardından çözünen örneklerde farklı teknikleri [yakın kızıl ötesi yansıtma spektroskopisi (NIRS), elektronik burun (EN), elektronik dil (ET)] kıyasladıkları çalışmalarında, NIRS cihazları için en etkili kombinasyonlar olduğunu, CO' in çözülmüş ve dondurularak kurutulmuş filetoların spektrumlarında radyasyon absorbandsını düşürdüğünü, fakat etanol içinde depolanmış olan ancak miyogloblin ve miyozin ile etkileşime girmiş olan fileto örneklerinde etkili olmadığını bildirmişlerdir.

Öldürme yöntemlerinin [vurma (T1), -22°C'de dondurma (T2) ve buzlu suya daldırma (T3) daldırma] sazan balıklarının et kalitesi üzerindeki etkileri K değeri cinsinden değerlendirilmiştir. Filetolarda depolama sırasında toplam uçucu baz nitrojen (TVB-N), elektriksel iletkenlik (EC), toplam bakteri sayımları (TVC), biyogenik aminler ve duyu skorlarının yanı sıra pH, sertlik, asit fosfataz aktivitesi, glikojen, adenosin trifosfat (ATP) ve laktat içeriği için de periyodik olarak analizler yapılmıştır. T3'te T1 ve T2'ye göre anlamlı derecede daha yavaş ATP azalması, pH'da daha yavaş azalma, daha yavaş laktat oluşumu ve daha yüksek başlangıç glikojen düzeyleri belirlenmiştir. Vurarak sersemletilen balıklarda daha yüksek TVB-N, EC, TVC, toplam biyogenik aminler ve daha düşük duyu skorları elde edilmiştir. Tüm öldürme tekniklerinde buzlu suya daldırmanın kaliteyi artırabileceği ve sazanların raf ömrünü uzatabileceği de ifade edilmiştir (Qin *et al.* 2016).

Choi *et al.* (2016) antioksidan içeriği ve tirozinaz önleme gibi sağlık açısından faydalı biyolojik aktivitelerin araştırıldığı çalışmada, kritik su hidrolizi ile hazırlanan kolyoz (*Scomber japonicus*) balığı kas protein hidrolizatları araştırılmıştır. Bu amaçla 140 °C’de 5 dk. boyunca kritik olmayan hidrolizden sonra, *S. japonicus* kas proteininin %59.76’sı hidrolize edilerek, tepki yüzeyi metodolojisinin sonuçlarına göre, reaksiyon sıcaklığı ve tepki süresi düştükçe verimin yüksek olduğu bildirilmiştir. En yüksek 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal temizleme aktivitesi (%90.63), 140°C’de 5 dk. süreyle işlem gören hidrolizatlarda ve en yüksek tirozinaz önleme aktivitesi (65.54) ise 15 dk. boyunca 200°C işlem gören gruplarda belirlenmiştir. Ayrıca sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi ile kas proteinlerinin moleküler ağırlık dağılımlarında da değişimlerin olduğu, yararlı biyolojik aktiviteler açısından kısa süreli (5-15 dk.) uygulamaların daha iyi sonuçlar verdiği kaydedilmiştir.

Malabar orfoz (*Epinephelus malabaricus*) derisinden balık kolajen peptidlerinin üretilmesi için tepki yüzeyi yöntemi kullanarak hidroliz koşullarının optimize edilmeye çalışıldığı bir araştırmada, pepsin, papain ve sığır pankreastan proteaz hidroliz enzimleri kullanılmıştır. pH, sıcaklık, enzim substrat oranı ve hidroliz derecesi gibi parametrelerle üç farklı enzimin hidroliz süresine olan etkileri araştırılmıştır. Hidroliz dereceleri, pepsin, papain ve proteaz için sırasıyla %10, %20 ve %28 olarak belirlenmiştir. Hidrolizatın moleküler ağırlık dağılımının saptanması için MALDI TOF yöntemi ile kombine edilmiş SDS-PAGE uygulanmış ve hidrolizatın 2 kDa’ nın altında molekül ağırlığına sahip peptitleri içerdiği bildirilmiştir (Hema *et al.* 2017).

Refaey *et al.* (2017), taşıma stresinin kedi balıkları (*Ictalurus punctatus*) fingerliklerinin kas kimyasal bileşimi ve et kalitesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, balıklar 3.5 saat süren nakil işlemine tabi tutulmuş ve kontrol (normal su ürünleri yetiştirme koşullarında taşıma) grubuna oranla 0,24, 72 ve 168. saatlerdeki değişimleri incelemiştir. Taşıma stresinin, 24. saat sonrasında diğer zaman aralıklarına ve strese maruz kalmamış balıklara kıyasla kas, su, yağ ve enerji içeriğinde önemli azalmaya neden olduğunu, 0. saat sonunda kas pH’sı ve kesme kuvvetinde ciddi azalmalar meydana getirdiğini bu durumun 24. saat sonunda artıp 72. saat sonunda ise tekrar indirgenerek 168. saatte

düzeldiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, taşıma işleminin, *I. punctatus* kas kimyasal bileşimi ve et kalitesi üzerine etki ettiği ifade edilerek bu stresin ortaya çıkardığı sonuçları azaltmak için 168 saatlik bir bekleme süresi tavsiye edilmiştir.

Soğuk havalarda balık filetosunun raf ömrünü uzatmak için kullanılan Melanin içermeyen *Sepus esculenta* mürekkebi ekstraktı (MFESI) tilapia filetolarına farklı dozlarda (0, 15, 25 ve 35 mg/ml MFESI) uygulanarak 4°C'de depolanmış ve protein oksidasyonunun değerlendirilmesi adına toplam uçucu bazik nitrojen ve sülfidril-karbonil gruplarının içerikleri, lipid peroksidasyonu için ise malondialdehid içeriği ölçülmüş ve filetoların su tutma kapasiteleri belirlenmiştir. MFESI'nin *in vitro* olarak sadece belli bir antioksidan kapasitesine sahip olmadığı, aynı zamanda tilapia filetosunun raf ömrünü de soğuk depolama koşullarında uzattığı belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonlarda, 25 ve 35 mg / ml'lik MFESI' nin lipid ve proteinin oksidasyonunu engellemede ve fileto kalitesini korumada daha etkili olduğu ifade edilmiştir (Duan *et al.* 2018).

Zhang *et al.* (2017) farklı öldürme tekniklerinin (vurma, buz-su bulamacına daldırma, solungaç kesimi) gümüş sazanlarda (*Hypophthalmichthys molitrix*) antioksidan durumu, *in vivo* miyofibriler protein (MP) oksidasyonu ve postmortem oksidasyona duyarlılık üzerine etkileri araştırılmıştır. Solungaç kesiminin en kuvvetli stres koşullarını oluşturduğunu ve daha yüksek karbonil konsantrasyonlara yol açtığını, dolayısıyla *in vivo* MP oksidasyonuna neden olduğunu bildirmiştir.

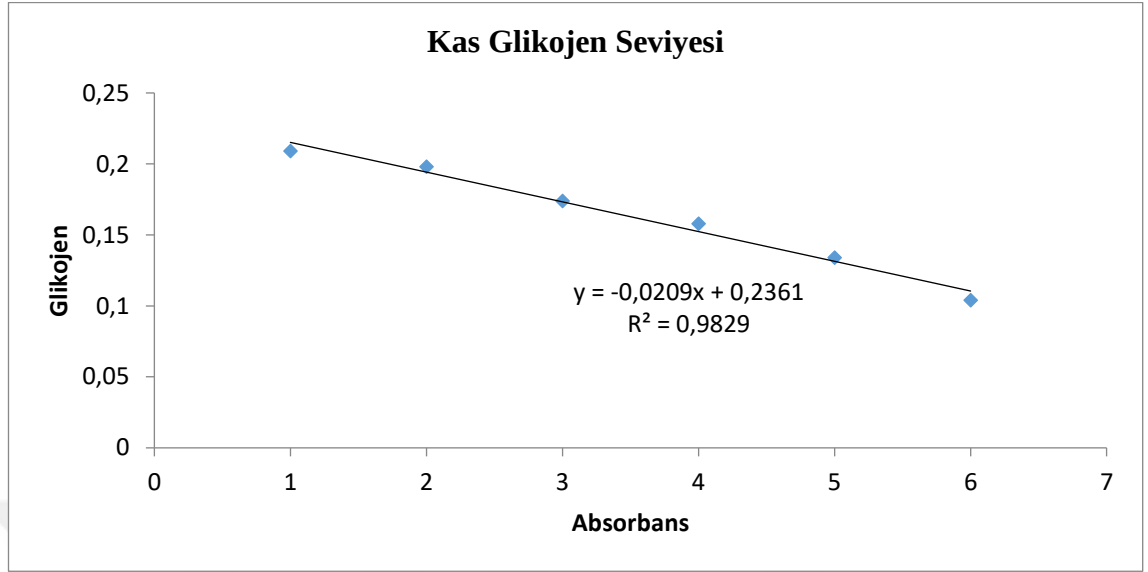
3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Fileto Hazırlama ve Deneme Prosedürü

Gökkuşuğu alabalıkları (108 adet 250 ± 10 g ağırlığında) Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi İçsu Balıkları Uygulama ve Araştırma Biriminden temin edilerek farklı şekillerde ölüm prosedürlerine tabi tutulmuştur. Bu amaçla özellikle yaygın olarak kullanılan öldürme teknikleri (T1-başına vurma, T2- boyunlarını kırarak, T3- çırpınma ile ölme) uygulanan balıklar rigor başlamadan, ivedilikle fakültemiz işleme ünitesine (4°C 'de) getirilerek balıklardan filetolar hazırlanmıştır. Aynı zamanda belirlenen zamansal analizler için örnekleme yapılmıştır.

3.2. Kas Glikojen Seviyesinin Belirlenmesi

Rigorun şekillenmeye başladığı andan itibaren 12 saat süresince (0, 2, 4, 6 ve 12. saatlerde) KOH/antron metoduna göre ticari bir kit (Abcam, Glycogen Assay Kit) kullanılarak belirlenmiştir. 620 nm' de okunan absorbans değerleri ile sonuçlar mg glikojen/g kas olarak verilmiştir.



Şekil 3.1. Kas glikojen seviyesi standart eğrisi

3.3. Laktik Asit Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Laktik asit konsantrasyonu, kas dokusunda rigorun şekillenmeye başladığı andan 72 saat süresince (0, 12, 24, 36, 48 ve 72. saatlerde) ticari kit (ChemBio, CB55560) yardımı ile belirlenmiştir.

3.4. pH Ölçümü

Rigorun şekillenmeye başladığı andan 72 saat süresince (0, 12, 24, 36, 48 ve 72. saatlerde) pH ölçümü yapılmıştır. pH değerlerinin ölçümlerinde küçük parçalar haline getirilmiş örneklerden 10'ar g alınmış üzerine 100 ml saf su eklenerek homojenize edilen karışımda pH metre (Metler Toledo) ile pH değerleri ölçülmüştür (Alak 2011).

3.5. Antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü

Bu aşamada uygulamanın rigor ve post-mortem süreçlerini kapsayan saatlerde (0, 12, 24, 36, 48, 60 ve 72. saat) CAT, GPx ve SOD antioksidan enzimleri için aktiviteler hesaplanmıştır.

3.5.1. Homejenat hazırlama

Belirlenen zaman aralıkları için filetolardan alınan 1 g kas dokusu 3 katı oranda fosfat tamponu ile homojenize edilerek santrifüjlenmiş (1300 rpm'de 45 dk.) elde edilen süpernatant, enzim aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Alak *et al.* 2017a, 2017b).

3.5.2. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin ölçülmesi

Enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin, ortamda bulunan nitro blue tetrazolium (NBT)'u indirgemesi esnasında, numunedeki süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) enziminin serbest radikalleri engellenmesi prensibine dayanan bu yöntemde, ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile süperoksit radikalleri meydana gelir. Üretilen süperoksit radikalleri NBT ile reaksiyona girerek formazan (mor) boya üretir ve reaksiyon sonucu görülen bu renk değişimi spektrofotometrik olarak (560 nm) ölçülür. Reaksiyon sırasında SOD açığa çıkan radikalleri dismütasyona uğratar, NBT redüksiyon reaksiyonu yavaşlar ve spektrofotometrede okunan absorbans değerleri düşer (Sun *et al.* 1988). Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak spesifik aktivite (EU/mg protein) hesaplamaları yapılmıştır.

3.5.3. Katalaz (CAT) enzim aktivitesinin ölçülmesi

Katalaz aktivitesinin tespit edilmesinde hidrojen peroksit (H_2O_2) radikalının yıkımına dayalı olan Aebi (1974) metodu kullanılmıştır. Enzimatik reaksiyon, spektrofotometrede

240 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak absorbans miktarında meydana gelen azalma hızı katalaz aktivitesi ile ilişkilendirmektedir.

3.5.4. Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesinin ölçülmesi

Hidrojen peroksit tarafından indirgenmiş glutasyon (GSH), GPx aracılığı ile okside olmuş glutatyon (GSSG) yükseltgenir. Sonrasında ters yönde GSSG' nin glutasyon redüktaz enzimi ile tekrar GSH'a indirgenmesi esnasında ortamda bulunan NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) kullanılır. GPx aktivitesi, NADPH'in NADP^{+} ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalış farkının 340 nm' de ölçülmesiyle hesaplanır (Beutler1975). Numuneler hazırlanarak 37°C'de 10 dk bekletildikten sonra üzerine 10µl t-bütıl eklenerek spektrofotometrede 340 nm'de 2 dk (0; 60; 90; 120 sn) boyunca okuma yapılmıştır.

3.5.5. Lipid peroksidasyonun (MDA) ölçülmesi

Lipid peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonu ile sekonder bir ürünü olarak MDA oluşmaktadır. MDA lipid peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. MDA, aerobik şartlarda pH 3,4'te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C'de inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür (Ohkawa *et al.* 1979; Gutteridge 1995).

200µl hemolizat üzerine 800 µl fosfat tamponu, 25 µl BHT çözeltisi ve 500 µl % 30'luk TCA eklenerek, tüpler vortekslenmiş ardından 20°C'de 2 saat süresince bekletilmiştir. Çözündürülen örnekler 2000 rpm' de 15 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen supernatanttan 1 ml alınarak üzerine 75 µl EDTA ve 250 µl TBA eklenmiştir. Oluşturulan bu son mix vortekslenerek 15 dk sıcak su banyosunda (90°C'de) inkübe edilmiştir. İnkübe olan örnekler soğutulularak 532 nm' de okumalar yapılmıştır (Luo *et al.* 2006).

3.5.6. Protein miktarı ölçümü

Spesifik enzim aktivitelerinin hesaplamasında Bradford (1976) protein tayin yöntemi kullanılmıştır. Bovine serum albumin standart kabul edilerek 595 nm’ de okumalar yapılmıştır.

3.6. Miyofibriler Proteinlerin Hazırlanması

Uygulamanın rigor ve post-rigor süreçlerini kapsayan 0, 24, 48 ve 72. saatlerinde miyofibriler proteinlerin hazırlanmasında Park *et al.* (2007a, 2007b) referans alınarak minor modifikasyonlar uygulanmıştır. Bir miktar kıyılmış kas 10 mM sodyum içeren 4 izolasyon tamponuyla (fosfat, 0,1M NaCl, 2mM MgCl₂ve 1mM EGTA (pH=7.0)) homojenize edilmiştir. Homojenat 10,000 g’ de 15 dk. boyunca santrifüj edilerek pelet kısım 0,1M NaCl ile tekrar muamele edilerek homojenat oluşturulmuştur. Süzme işleminin ardından elde edilen süzüntü farklı tamponlarda bekletilerek uygun olan analizlerde kullanılmıştır. (1) 0,6M NaCl, 15mM piperazin-N, N-bis (2-etansülfonik asit) (PİPES) (pH 7,0) ilavesi ile protein oksidasyonunu incelenmesi ve post-mortem oksidasyon duyarlılığı, (2) 0,6M NaCl ve 15mM sodyum fosfat tamponu (pH 7,0) ilavesi ile de *in vivo* protein yükseltgenmesinin ilerlemesi (sülfidril grupları ve karbonil konsantrasyonları) belirlenmiştir. Miyofibriler proteinlerin protein konsantrasyonu Biuret yöntemi esas alınarak (Torten and Whitaker 1964) tespit edilmiştir.

3.7. Protein Oksidasyonu

Uygulamanın rigor ve post-mortem süreçlerini kapsayan 0, 24, 48 ve 72. saatlerinde MP oksidasyonu için Lu *et al.* (2017) dikkate alınmış bu amaçla protein numuneleri bir hidroksil radikal oksitleme sistemi (10 mM FeCl₃, 0,1 mM askorbik asit ve H₂O₂) ile 4 farklı konsantrasyonda (0,1, 5 ve 10 mM) muamele edilerek 4⁰C’ de 36 saat inkübasyonla oksitlenmiştir. Protein oksidasyon ürünleri 15 mM PİPES (pH 7,0) ile iki kez santrifüjlenmiş ardından pelet 0,6 M NaCl ihtiva eden 15 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde çözündürülerek protein oksidasyonu tamamlanmıştır.

3.8. Protein miktarının biüret yöntemi ile belirlenmesi

Uygulamanın rigor ve post-mortem süreçlerini kapsayan 0, 24, 48 ve 72. saatlerde protein miktarı Biüret yöntemi esas alınarak (Torten and Whitaker, 1964) belirlenmiştir. Bu amaçla 2 ml MP ve okside örnek alınarak üzerine 3 ml Biüret ayracı* ilave edilmiş ve 37 °C’ de 15 dk. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben 3500 rpm’de 5 dk. santrifüj işleminin ardından elde edilen supernatant 540 nm’de okunarak grafikten elde edilen $y = 0,0626x + 0,0239$ formülü ile protein miktarları her örnek için ayrı ayrı hesaplanmıştır.

*Reaktif ayraç için 3 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 9 g $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (sodyum potasyum tartarate) tartıldı. 500 ml 0,2 N NaOH içinde çözündürüldü. Ardından 5 g KI ilave edilerek toplam hacim 0,2 N NaOH ile 1 l’ ye tamamlanır.

3.9. Sülfidril grupları ve disülfid bağlarının tayini

Uygulamanın rigor ve post-mortem süreçlerini kapsayan 0, 24, 48 ve 72. saatlerde okside MP ve oksitlenmemiş MP’ nin disülfid konsantrasyonu belirlenmesinde 5, 5-ditiyobis (2 –nitrobenzoik asit) (DTNB) reaksiyonu dikkate alınmıştır (Ellman 1959). MP solüsyonu 8 mL üre içeren 4,5 mL 0,2 M Tris- HCl tamponu, 3 mM EDTA ve %1 SDS ile karıştırılarak ardından bu miksten 4 mL alınmış, 0,5 mL tampon B (10 mM Tris-HCl, 10 mM DTNB, pH 8,0) eklenerek 40°C’de 25 dk. süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda numunelerin 412 nm’de okunan absorbans değeri ile disülfid konsantrasyonu belirlenmiştir.

3.10. Karbonil Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Disülfid gruplarında olduğu gibi belirli zaman aralıklarını (0, 24, 48 ve 72. saat) kapsayan saatlerde oksitlenmiş ve oksitlenmemiş MP örneklerinde karbonil konsantrasyonu 2,4 – dinitrofenilhidrazin (DNPH) yönteminde bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir (Oliver *et al.* 1987). Bu doğrultuda, 1 mL MP çözeltisi alınarak 1 mL 10 mM DNPH çözeltisine eklenmiş ve 1 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra, karışım

%20 trikloroasetik asit (TCA) ile yıkanarak 5 dk. santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası elde edilen pelet 3 mL 6 M guanidin içine eklenerek 37°C’de 15 dk. inkübasyonun ardından santrifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant 370 nm’de okunarak, okunan değer karbonil konsantrasyonu olarak nmol karbonil/mg protein şeklinde ifade edilmiştir.

3.11. Protein Profilinin Belirlenmesi

Uygulamanın rigor ve post-mortem süreçlerini kapsayan 0, 24, 48 ve 72. saatlerde yapılmış ve homojenatların protein profil analizi sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) metodu kullanılarak tespit edilmiştir (Laemmli 1970). Eppendorf tüpe alınan 100 µl hidrolizat üzerine 900 µl elektroforez örnek buffer tamponu eklenerek iyice karıştırılmış 100°C’de 1 dk. süreyle bekledikten sonra Laemmli metodu TetraCell BioRad sistemine uyarlanarak SDS-PAGE işlemleri gerçekleştirilmiştir. Jeldeki proteinlerin boyanması için örnekler 2 saat Oriole solüsyonunda bekletilmiş, protein bantlarının dansitometrik analizleri gerçekleştirilmiştir (BioRad Oriole user manual).

3.11.1. SDS-PAGE analizi

Düz cam plaka (10x8.5 cm) ile 1,5 mm kalınlığındaki plastik şeritli (spacer) plaka sandviç şeklinde bir araya getirilmiş, ilk önce rezolving jel 10 ml’lik bir enjektörle plakaların arasında hava kabarcığı oluşturmada üst kenara ~2.5 cm kalıncaya kadar doldurulmuştur. Jelin dökülmesini takiben 1 ml’lik bir enjektörle jel yüzeyi üzerinde bütanol ile ince bir tabaka oluşturularak düz bir polimerizasyon hattı meydana getirilmiştir. En az 2 saat süreyle polimerizasyon için beklendikten sonra su süzgeç kağıdıyla uzaklaştırılmış ve kimyasal kompozisyonu stocking jel hazırlanıp, hava kabarcığı oluşturmada bir enjektör yardımı ile dökülmüştür. Hemen ardından 1,5 mm kalınlığındaki taraklar yerleştirilmiş ve polimerizasyon için en az 3 saat süreyle bekletilmiştir. Sürenin sonunda taraklar çıkarılarak, polimerizasyon artıkları tris-glisin elektrod tamponuyla (pH 8,3) yıkanmış ve yıkama sonrası aynı tampon ile doldurulan kuyucuklara 15 µl numune yüklemesi yapılmıştır (Laemmli 1970). 20 mA/jel sabit akım

modunda yaklaşık 90 dk. süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirilmiş, süre sonunda jeller oriole solüsyonunda 2 saat süreyle bekletilerek jel görüntüleme sistemi ile (Bio Rad Gel Doc XR) fotoğrafları çekilmiştir.

3.11.2. Protein standardı

Ticari olarak elde edilen 500 µl'lik hazır marker karışımı kullanılmıştır (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standart, kat. No: 1610373).

Uygulanışı: Örnek kuyucuklarına 15 µl numune ilave edilerek 20 mA/jel sabit akımda yaklaşık 90 dk. süreyle elektroforez işlemine devam edilmiştir. Elektroforez sonrası homojenat örneklerine ait jeller coomassie brilliant blue R250 ile boyanmış ve Biorad Gel Doc XR jel görüntüleme sisteminde fotoğrafı çekilerek, ImageLab 4.1 programı ile analiz edilmiştir.

3.11.3. Proteinlerin molekül ağırlıklarının hesaplanması

Molekül ağırlıkları bilinen standart proteinlerin molekül ağırlıkları ve jeldeki göç mesafeleriyle ilişkili olarak semi-logaritmik bir grafik yardımıyla örnek proteinin molekül ağırlığı tespit edilmiştir. Her standart protein için Rf değeri hesaplanmıştır.

3.12. İstatiksel Analizler

Tüm ölçümler üçer defa tekrarlanmış ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Generalized Linear models kullanılarak homojenite testleri yapılmış ve farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuş, $p < 0,05$ seviyesinde yordanmıştır (SPSS yazılımı sürüm 22.0).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Farklı öldürme teknikleri uygulanan gökkuşuğu alabalığı filetolarına ait antioksidan durum, *in vivo* miyofibriler protein oksidasyonu ve oksidasyon duyarlılıklarının araştırıldığı çalışmamızda oksidasyon mekanizmasında etkili olan aşamaların belirlenmesine çalışılmıştır.

4.1. Kas glikojen seviyesi, laktik asit ve pH

Farklı öldürme tekniklerinin gökkuşuğu alabalığı filetolarına ait kas glikojen seviyesi, laktik asit miktarı ve pH üzerine etkisi Çizelge 4.1’de verilmiştir. Glikojen seviyesi, laktik asit miktarı ve pH üzerinde uygulanan öldürme tekniklerinin önemli etki gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,05$). Uygulamalar arasında en düşük glikojen seviyesi T3 (çarpınma) grubunda 1.54 mg / g, en yüksek ise T1 (kafasına vurma) grubunda 1.86 mg / g olarak belirlenmiştir. Öldürme tekniğinin balıklarda, endokrin tepkilerde ve postmortem biyokimyasal süreçlerde (ATP yıkımı ve anaerobik glikolizde) önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Poli *et al.* 2005; Zhang *et al.* 2017). Özellikle T3 grubunda gözlemlenen dramatik düşüşlerde atak davranışların ve çarpınmanın daha hızlı glikojen tüketiminde etkili olduğu düşünülmektedir. Tüm gruptaki kas glikojen konsantrasyonlarındaki depolama süresiyle birlikte meydana gelen azalışlar laktik asit birikiminden kaynaklanmaktadır (Zhang *et al.* 2017). Çalışmamızda gözlemlenen kas glikojen düzeyindeki değişiklikler önceki çalışmalarla uyumludur (Qin *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2017). Glikojen seviyesindeki artışlara ise düşük metabolik hızın yol açtığı düşünülmektedir (Qin *et al.* 2016).

Çizelge 4.1. Farklı öldürme teknikleri ile öldürülen gökkuşağı alabalığı filetolarının soğuk depolama ($4\pm 0.5^{\circ}\text{C}$) boyunca kas glikojen seviyesi, laktik asit miktarı ve pH değişimleri

Stres şartları	Öldürme tekniği	Zaman								
		0	2	4	6	12	24	36	48	72
Glikojen (mg/g kas)	T1 ^A	$1,86 \pm 0,00^a$	$1,32 \pm 0,00^b$	$1,56 \pm 0,00^a$	$1,43 \pm 0,00^c$	$-0,43 \pm 0,00^a$				
	T2 ^B	$1,66 \pm 0,00^b$	$1,08 \pm 0,00^c$	$1,53 \pm 0,00^b$	$1,60 \pm 0,00^a$	$-0,71 \pm 0,00^c$				
	T3 ^B	$1,54 \pm 0,00^c$	$1,60 \pm 0,00^a$	$1,18 \pm 0,00^c$	$1,48 \pm 0,00^b$	$-0,66 \pm 0,00^b$				
Laktik Asit (mmol/g protein)	T1 ^A	$0,04 \pm 0,01^a$				$0,04 \pm 0,01^b$	$0,15 \pm 0,01^b$	$0,16 \pm 0,01^b$	$0,10 \pm 0,01^a$	$0,18 \pm 0,01^a$
	T2 ^B	$0,03 \pm 0,01^b$				$0,07 \pm 0,01^a$	$0,12 \pm 0,01^c$	$0,14 \pm 0,01^c$	$0,10 \pm 0,01^a$	$0,18 \pm 0,01^a$
	T3 ^A	$0,07 \pm 0,02^b$				$0,01 \pm 0,01^c$	$0,17 \pm 0,01^a$	$0,18 \pm 0,01^a$	$0,11 \pm 0,01^a$	$0,19 \pm 0,01^a$
pH	T1 ^A	$6,21 \pm 0,10^a$				$6,01 \pm 0,02^a$	$6,01 \pm 0,02^a$	$5,83 \pm 0,01^a$	$5,83 \pm 0,09^a$	$6,23 \pm 0,19^a$
	T2 ^A	$6,24 \pm 0,15^a$				$5,87 \pm 0,03^b$	$6,04 \pm 0,04^a$	$5,89 \pm 0,08^a$	$5,85 \pm 0,03^a$	$6,00 \pm 0,02^b$
	T3 ^B	$5,89 \pm 0,07^b$				$5,86 \pm 0,02^b$	$6,02 \pm 0,04^a$	$5,86 \pm 0,05^a$	$5,86 \pm 0,01^a$	$5,96 \pm 0,01^b$

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Küçük harfler (a,b,c) aynı parametrenin aynı zamansal değişimlerindeki öldürme tekniğinin farkını, büyük harfler ise (A, B) her parametredeki öldürme tekniğinin etkisini göstermektedir ($p < 0,05$). T1: Başına vurma; T2: Boynunu kırma; T3: Çırpınma.

Balıklarda stres koşullarının erken tahmin edilmesi için bir doku göstergesi olarak anaerobik glikoliz sonucunda oluşan laktik asit yaygın olarak kullanılır (Barton 2002). Farklı öldürme teknikleri uygulanan gruplara ait filetoların laktik asit seviyesi zamanla artış göstermiştir. Bu bulgularımız Zampacavallo *et al.* (2015), Qin *et al.* (2016) ve Zhang *et al.* (2016)'ın farklı balık türü ve farklı öldürme teknikleri uyguladıkları çalışma sonuçları ile örtüşmektedir. Bununla birlikte çalışma verilerimizden olan kas glikojeni ve pH değerinin sonuçlarıyla da uyumludur. Bu parametrede gözlemlenen artış, anaerobik glikoliz sonucu tüm gruptaki kas glikojen konsantrasyonlarının depolama süresi boyunca azalmasına, böylece laktik asit seviyesinde artışa atfedilebilir (Zhang *et al.* 2016). T3 grubunda belirlenen artışta yüksek stres koşullarının etkili olması ve çarpınma esnasında anaerobik glikojen tüketiminden önemli miktarda enerji takviyesi gerekliliği ile açıklanmaktadır (Zhang *et al.* 2016). Yine bilinen bir durum olarak kesim öncesi stres ve kas aktivitesi beyaz kasta büyük miktarlarda laktik asit üretimini teşvik eder (Digre *et al.* 2011). Ölümden sonra kas laktik asit miktarında gözlemlenen belirgin artışın ölümden önceki anaerobik glikoliz ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Poli *et al.* 2005).

Tüm öldürme tekniklerinde pH'da azalışlar belirlenmiş olsa da T3 grubu filetolar hariç diğer grup filetolarda, post-mortemin ilk 12 saatlik süresinde bu değerinde oldukça hızlı bir düşüş belirlenmiştir. Rigor-mortis gelişimi, kas pH'ında eşzamanlı bir düşüşle birlikte glikojenin anaerobik yıkımından kaynaklanan laktik asit üretimiyle yakından ilişkilidir (Varga *et al.* 2014). Çalışma verilerimizdeki pH değişimleri Roth *et al.* (2009), Lerfall *et al.* (2015) ve Qin *et al.* (2016) ile uyumludur.

Başlangıç pH değerlerinde T3 grubundaki düşük başlangıç pH değeri, diğer öldürme tekniklerine göre daha yüksek pre-mortal stresi düşündürmektedir. Ayrıca bu durumda stres kaynaklı artan laktat seviyesinin ve ATP degregasyonunun etkili olabileceği bilinmektedir (Loewe *et al.* 1993; Erikson *et al.* 1999; Wilkinson *et al.* 2008; Mørkøre *et al.* 2008; Digre *et al.* 2011). Filetolarda 72 saat sonunda T3 grubu T1 ve T2 ye göre daha düşük pH değeri vermiştir. Bu duruma strese bağlı glikolitik aktivitenin artmasının neden olduğu düşünülmektedir (Varga *et al.* 2014). Daha hızlı olan T1 ve T2 öldürme tekniklerinde ise hareketin daha çabuk durması önemlidir. Çünkü çarpınma ve hipoksia

gibi durumlarda, balık aktivitesi artmakta, artan kas oksijen ihtiyacı sağlanamadığı için göreceli ve mutlak anoksiya (artmış fiziksel aktivite tarafından indüklenenin dışında) gelişerek, laktattan türetilmiş düşük pH' ya sebep olmaktadır (Varga *et al.* 2014).

Çalışmamızda laktik asit seviyesi post-mortem süre sonunda anaerobik metabolizma ile artmıştır. Özellikle T3 grubunda diğerlerine oranla yüksek olan bu değer için, aşırı aktiviteye yanıt olarak balık kasında laktik asit birikimi düşünülebilir (Wendelaar Bonga 1997). Deneme materyali balığın beyaz kaslı olması enerji ihtiyacının karşılanmasında anaerobik glikolizden yararlandığını göstermektedir (Oliveira Filho *et al.* 2015). Bilinen bir durum olarak, bir stres etkeni tarafından etkilenen somon beyaz kasları aerobik ATP üretiminden anaerobik glikolitik yola döner. Bu yol, ATP üretimi ve bozulması arasındaki bir dengesizlik nedeniyle H^+ 'yı üretir, son ürün olarak üretilen laktat pH'ı düşürür. Buna ilaveten akut stres de pH düşmesi ve rigor-mortisin erken başlamasına neden olmaktadır (Lerfall *et al.* 2015).

4.2. Post-mortem Döneme Ait Antioksidan Enzim Aktivite ve MDA Seviyesi Değişimi

Farklı öldürme teknikleri uygulanan gökkuşağı alabalığı filetolarında postmortem süreçte (72. saat) $+4^{\circ}C$ 'de depolamanın bazı antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA seviyesi üzerine olan etkileri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Uygulanan öldürme teknikleri, söz konusu parametrelerde önemli etki göstermiş ($p<0,05$) ve en çok stres veren tekniğin T3 grubu olduğu belirlenmiştir. Gruplar arasındaki CAT aktivitesindeki düşüşler H_2O_2 'nin ve stresin yüksek olmasından dolayı, adaptasyonun sağlanamadığını göstermektedir. Ayrıca CAT aktivitesinde meydana gelen azalışların diğer sebebinin, serbest radikallerin protein sentezini baskılamasından dolayı olduğu da düşünülebilir (Palaniappan and Vijayasundaram 2008). Peixoto *et al.* (2006), katalaz enzim aktivitesinin bazı durumlarda hem inhibisyona hem de indüksiyona uğramasından dolayı geçerli biyomarkırlar olmadıklarını bildirmektedir. Süperoksit dismutaz ve katalaz strese karşı savunmanın ilk ve en önemli basamağıdır (Pandey *et al.* 2003). Halliwell and Gutteridge (2007)'e göre, CAT aktivitesindeki azalışlar, hücrel redoks durumunun iyi olmasına ve stresin

daha az etkilediğine de atfedilir. Fakat bu durum daha çok kas rengi ile ilintili olup bu enzim için kırmızı kaslarda daha yüksek değerler gözlenir. Çünkü bu kaslarda aerobik metabolizmanın baskılanması ile, beyaz kaslarda ise anaerobik metabolizma yoluyla enerji oluşumu gerçekleşmektedir. SOD serbest radikallere ilk tepki mekanizması olup, meydana gelen azalmaların strese karşı oluşan adaptasyonun bir sonucu ya da enzimin bazal aktivitesiyle serbest radikal oluşumunu inhibe etmesinin etkili olduğu düşünülmektedir (Song *et al.* 2009; Alak *et al.* 2017a, 2017b; 2018). GPx enziminin substratı, glutatyon (GSH)'dır. GSH seviyesinde meydana gelen azalmalar, serbest radikal üretiminin artmasına ve hücresel boyutta bozukluklara sebep olur. GSH oksidatif stresin seviyesinin değerlendirilmesinde önemli olup hidrojen peroksiti inhibe etmektedir (Jurma *et al.* 1997). GSH düzeyinde meydana gelen değişimler, GSH sentezinde görev alan enzimlerin, gerçekleştirebilecekleri düzenlenmeler ve aktivasyonlar ile açıklanmaktadır (Zhang *et al.* 2005). Bu çalışmada muamele grupları arasında gözlemlenen GPx aktivitelerinde meydana gelen azalmaların O₂'nin artışına bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (Alak *et al.* 2017a; 2017b). Çalışılan tüm gruplardaki enzim aktivitelerinde gözlenen azalmanın, oksidatif stres ve oksidatif strese karşı verilen adaptif yanıtın yetersizliğine atfedilebilir (Song *et al.* 2006). T3 grubundaki GPx aktivitesi kaybı filetodaki antioksidan savunma sistemini zayıflatır ve böylece *in vivo* protein oksidasyonunu etkiler, ölüm sonrası oksidasyona duyarlılık sağlar.

Çizelge 4.2. Farklı öldürme tekniklerinin antioksidan enzim aktivitesi; Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Malondialdehit (MDA) seviyesi üzerine etkisi (Ortalama $\pm$ Standart Sapma)

Öldürme Tekniği	Zaman (Saat)	CAT(EU/mgprotein)*	SOD(EU/mgprotein)*	GPx(EU/mgprotein)*	MDA(ml/mgprotein)*
Başına Vurma (T1)	0	1,82 $\pm$ 0,02 ^a	0,36 $\pm$ 0,01 ^a	0,98 $\pm$ 0,00 ^a	2,15 $\pm$ 0,00 ^c
	12	1,86 $\pm$ 0,00 ^a	0,39 $\pm$ 0,00 ^a	0,90 $\pm$ 0,01 ^a	0,75 $\pm$ 0,05 ^c
	24	1,37 $\pm$ 0,00 ^a	0,34 $\pm$ 0,01 ^a	0,82 $\pm$ 0,05 ^a	0,57 $\pm$ 0,00 ^b
	36	0,93 $\pm$ 0,00 ^a	0,33 $\pm$ 0,02 ^a	0,82 $\pm$ 0,00 ^a	0,39 $\pm$ 0,01 ^c
	48	0,63 $\pm$ 0,05 ^a	0,30 $\pm$ 0,00 ^a	0,82 $\pm$ 0,01 ^a	0,12 $\pm$ 0,02 ^c
	60	0,59 $\pm$ 0,01 ^b	0,30 $\pm$ 0,00 ^a	0,29 $\pm$ 0,00 ^a	0,60 $\pm$ 0,00 ^c
	72	0,57 $\pm$ 0,01 ^a	0,25 $\pm$ 0,05 ^a	0,28 $\pm$ 0,02 ^a	0,38 $\pm$ 0,01 ^c
Boynunu kırma (T2)	0	1,55 $\pm$ 0,02 ^b	0,32 $\pm$ 0,01 ^b	0,44 $\pm$ 0,00 ^b	3,30 $\pm$ 0,00 ^b
	12	1,51 $\pm$ 0,00 ^b	0,32 $\pm$ 0,00 ^b	0,41 $\pm$ 0,01 ^b	2,28 $\pm$ 0,05 ^b
	24	0,96 $\pm$ 0,00 ^b	0,33 $\pm$ 0,01 ^b	0,57 $\pm$ 0,05 ^b	0,65 $\pm$ 0,00 ^b
	36	0,74 $\pm$ 0,00 ^b	0,32 $\pm$ 0,02 ^b	0,75 $\pm$ 0,00 ^b	0,94 $\pm$ 0,01 ^b
	48	0,60 $\pm$ 0,05 ^b	0,30 $\pm$ 0,00 ^b	0,58 $\pm$ 0,01 ^b	0,46 $\pm$ 0,02 ^b
	60	0,75 $\pm$ 0,01 ^a	0,29 $\pm$ 0,00 ^b	0,16 $\pm$ 0,00 ^b	0,62 $\pm$ 0,00 ^b
	72	0,49 $\pm$ 0,01 ^b	0,25 $\pm$ 0,05 ^a	0,16 $\pm$ 0,02 ^b	0,53 $\pm$ 0,01 ^b
Çırpınma (T3)	0	1,48 $\pm$ 0,02 ^c	0,19 $\pm$ 0,01 ^c	0,15 $\pm$ 0,00 ^c	4,23 $\pm$ 0,00 ^a
	12	1,23 $\pm$ 0,00 ^c	0,27 $\pm$ 0,00 ^c	0,16 $\pm$ 0,01 ^c	3,31 $\pm$ 0,05 ^a
	24	0,50 $\pm$ 0,00 ^c	0,32 $\pm$ 0,01 ^c	0,48 $\pm$ 0,05 ^c	1,97 $\pm$ 0,00 ^a
	36	0,49 $\pm$ 0,00 ^c	0,30 $\pm$ 0,02 ^c	0,62 $\pm$ 0,00 ^c	1,94 $\pm$ 0,01 ^a
	48	0,53 $\pm$ 0,05 ^b	0,28 $\pm$ 0,00 ^c	0,31 $\pm$ 0,01 ^c	1,69 $\pm$ 0,02 ^a
	60	0,45 $\pm$ 0,01 ^c	0,27 $\pm$ 0,00 ^c	0,10 $\pm$ 0,00 ^c	0,86 $\pm$ 0,00 ^a
	72	0,46 $\pm$ 0,01 ^c	0,10 $\pm$ 0,05 ^b	0,11 $\pm$ 0,02 ^c	1,38 $\pm$ 0,01 ^a

Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Küçük harfler (a,b,c) aynı parametrenin aynı zamansal değişimlerdeki öldürme tekniğinin farkını göstermektedir (p<0,05). T1: Başına vurma; T2: Boynunu kırma; T3: Çırpınma.

Post mortem süresince (72. saat) artan antioksidan enzim aktiviteleri Venturini *et al.* (2018) ile uyumlu olup, serbest radikal üretiminde artışla ilgilidir (Venturini *et al.* 2018) Bu artışlarda aerobik metabolizmanın aktifleşerek, üretilen ROS' a karşı hücrenin kendine özgü antioksidan mekanizmalarını yükselttiği düşünülmektedir. Öldürme tekniğinden kaynaklanan streste antioksidan enzimlerin artan etkinliği, bu işlem sırasında balıklarda artan aerobik metabolizmayı yansıtır. Öte yandan, öldürme stresi, anaerobik metabolizmayı da indükleyebilir ve artan laktat seviyesi de bu durumu tetikleyebilir (Oliveira Filho *et al.* 2015).

Stresörlerin etkisinde ROS'un yükseldiği ve bunun oksidatif strese yol açarak antioksidan enzimleri azalttığı bilinmektedir (Alak *et al.* 2019). Bu durum LPO oluşumunu artırarak membran yapısını bozar ve artan MDA miktarı söz konusu sürecin muhtemel açıklayıcısı olarak düşünülür (Akhgrari *et al.* 2003; Fetoui *et al.* 2010).

Çalışmada artan MDA seviyesinde enzim aktivitelerinin değişiminin yanısıra, öldürme stresi sonucunda meydana gelen karbonil artışı, S-S bağ yıkımları ve SH konsantrasyonlarının artışı etkili olmuştur. Bilinen bir durum olarak -SH metabolit kaynakları da bu artışlarda etkilidir (You *et al.* 2009; Alak *et al.* 2019a, 2019b). Reaktif oksijen türleri ve serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit (MDA) ölçümü, oksidatif stresin değerlendirilmesinde önemli bir belirteç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Ercan and Fidancı 2012; Alak *et al.* 2017a; 2017b; 2018). SOD inhibisyonunda, oluşturulan stres sonucunda reaktif oksijen türlerindeki (ROS) artışın etkili olduğu düşünülmektedir. Yine GSH redoks kapasitesinin azalması ile O_2^- üretiminin inhibe olmasından da kaynaklanmış olma ihtimali bulunmaktadır.

4.3. Post-mortem ve Oksidasyon Durumunda Sülfidril Grupları (SH), Disülfür Bağları (S-S) ve Karbonil Konsantrasyonları

Postmortem süreçte miyofibriler protein (MP), -SH, S-S ve karbonil konsantrasyonlarındaki değişiklikler, Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Uygulanan öldürme

tekniklerinden SH konsantrasyonları önemli ölçüde ($p<0,05$) etkilenecek azalışlar göstermiştir. Benzer şekilde S-S bağlarında da düşüşler kaydedilmiş ve öldürme tekniklerinin etkili olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

Postmortem süreçte gruplarda SH konsantrasyonlarında azalışlar kaydedilmiştir. Belirlenen bu azalışlar Shi *et al.* (2014) ve Zhang *et al.* (2017) ile uyumlu olmakla birlikte tüm gruplardaki SH konsantrasyonundaki düşüşlerin, disülfid bağlarının okside olması ve sistein kalıntılarının sülfidril gruplarını okside etmesi ile açıklanabilir. Yine bu durum bozulmuş antioksidan enzim aktivitelerinin disülfid bağlarının oksitlenme olasılığını artırmasına ve böylece düşük SH konsantrasyonuna bağlanmaktadır (Zhang *et al.* 2017).

Postmortem 72 saatte, T3 (çarpınma) grubunda S-S konsantrasyonu T1(başına vurma) ve T2 (boyun kırma) ile karşılaştırıldığında sırasıyla %100 ve %67 oranlarında azalmalar göstermiştir. Öldürme tekniklerinin tamamında postmortemin 24. saatinde belirlenen yüksek S-S konsantrasyonları, gruplarda disülfid bağlarının okside olması ile açıklanabilir.

Protein bozulmasının en önemli göstergeleri arasında sülfidril grubunun kaybı ve karbonil grupların üretimi gösterilmektedir. Karbonil tayini, protein oksidasyonunu değerlendirmek için rutin bir prosedür olarak kabul edilse de çeşitli orjinli (üretim ajanı ve lipid türevli karboniller gibi) karbonillerin varlığına bağlı olarak protein oksidasyonunun tahmininde bazen etkili olamamaktadır (Botsoglou *et al.* 2014). Reaktif oksijen gibi hidroksil radikalleri karbonil oluşturmak için peptid bağı kırabilir (Li and Fang 1994).

Çalışmamızda karboksil gruplarında (K) belirlenen artışların (Çizelge 4.3), hidroksil radikallerinin proteinlerden karbonil üretimini teşvik etmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Duan *et al.* 2018). Lipid oksidatif ürünleri, protein oksidasyon bozunmasını yönlendirir fakat lipid oksidasyonu ve protein oksidasyonu bağımsız veya paralel olarak ortaya çıkabilir (Grimsrud *et al.* 2008; Teets and Were 2008). Karbonil bileşikleri protein oksidasyonu süresince oluşur ve bazı amino asitlerin (lisin, histidin,

prolin ve arginin gibi), bazı yan zincirleri karbonilasyon işleminde önemli rol oynar (Lund *et al.* 2011). Çalışmamızda karbonil konsantrasyonu hem miyofibriler proteinlerde hem de oksidasyon altındaki süreçte zamana ve oksidasyon konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstermiştir. Bu durum Duan *et al.* (2018) ve Zhang *et al.* (2017) ile uyumludur. Özellikle çarpınarak ölen gruptaki yüksek karbonil konsantrasyonu aşırı stres, antioksidan enzim aktivitelerindeki azalma ve alfa iskelet aktin, glikojen fosforilaz, piruvat kinaz veya diğer proteinlerden de kaynaklanmış olabilir (Zhang *et al.* 2017).



Çizelge 4.3. Farklı öldürme tekniklerinin miyofibriler proteinlerin disülfid (SS), sülfidril (SH) ve karbonil grupları (C=O) seviyesi üzerine etkisi (Ortalama± Standart Sapma)

Parametre	Zaman (Saat)	Başına vurma (T1)	Boyun kırma (T2)	Çırpınma (T3)
SH	0	0,015±0,00 ^a	0,012±0,00 ^b	0,007±0,00 ^c
	24	0,010±0,00 ^a	0,007±0,00 ^b	0,005±0,00 ^c
	48	0,013±0,00 ^a	0,012±0,00 ^b	0,006±0,00 ^c
	72	0,004±0,01 ^c	0,009±0,01 ^b	0,0012±0,01 ^a
S-S	0	0,010±0,00 ^a	0,008±0,00 ^b	0,006±0,00 ^c
	24	0,007±0,00 ^a	0,006±0,00 ^b	0,005±0,00 ^c
	48	0,009±0,00 ^a	0,005±0,00 ^b	0,003±0,00 ^c
	72	0,0007±0,01 ^a	0,0006±0,00 ^b	0,0005±0,01 ^c
K	0	0,006±0,00 ^a	0,008±0,00 ^b	0,001±0,00 ^a
	24	0,002±0,00 ^b	0,003±0,00 ^a	0,002±0,00 ^b
	48	0,005±0,00 ^c	0,006±0,00 ^b	0,007±0,00 ^a
	72	0,014±0,01 ^c	0,017±0,01 ^b	0,026±0,01 ^a

Küçük harfler (a,b,c) uygulamaların zamana göre farklılığını belirtip, aynı harfler aynı saatte aynı parametre sonuçları için uygulamalar arasında fark olmadığını gösterir.

Oksidasyon sonucunda -SH ve S-S konsantrasyonlarında artan zamanla birlikte ciddi düşüşler kaydedilmiş, oksidasyon konsantrasyonları ve öldürme tekniklerinin etkisi önemli bulunmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.4).

Okside ürünlerde gözlemlenen değişimler SH ve S-S konsantrasyonlarındaki değişikliklere benzer olup depolama süresi ve H_2O_2 konsantrasyonunun artmasıyla hız kazanmıştır. En düşük değerler 72. saat sonunda ve 10 mM H_2O_2 uygulamalarında elde edilmiştir. Başlıca protein karbonilleri olarak α -aminoadipik ve p-glutamik semialdehidler (AAS ve GGS) bilinmektedir ve bu karbonil bileşikleri kısmen oksidatif peptid ayrımlarından oluşur (Akagawa *et al.* 2006; Lund *et al.* 2011).

Çalışmamızda okside örneklerde gözlemlenen H_2O_2 -doza bağlı -SH ve S-S konsantrasyonlarındaki azalmalar Li *et al.* (2013) ile paralellik göstermektedir ve özellikle -SH konsantrasyonlarındaki azalmaların öldürme tekniklerinin sebep olduğu stres sonucunda protein bütünlüğünün bozulması ve bu durumun sülfidril gruplarının kaybını hızlandırmasına bağlanabilir. -SH'deki postmortem değişikliklerle karşılaştırıldığında, hidroksil radikal okside sistem (HROS)' deki protein oksidasyonu MP'deki ilave demirin (Fe^{3+}) tüm gruplarda işlevselliğini artırarak SH konsantrasyonunun azalmasına yol açmıştır (Zhang *et al.* 2017). Aynı zamanda SH düşüşleri, bir hidroksil radikal üretim sisteminin etkisiyle de oluşmuş olabilir (Li *et al.* 2013).

Elde edilen tüm -SH, S-S ve karbonil konsantrasyonlarının öldürme stresinin etkisinin belirlenmesinde rol oynadığı, özellikle çırpınarak öldürmenin MP /oksitlenmiş MP'de, azalan -SH, S-S seviyeleri ve yüksek karbonil konsantrasyonları ile gökkuşağı alabalığı filetolarında postmortem oksidasyonun duyarlılığını artırdığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı öldürme tekniklerinin okside proteinlerin disülfid (SS), sülfidril (SH) ve karbonil grupları (C=O) seviyesi üzerine etkisi (Ortalama± Standart Sapma)

Grup	Zaman (Saat)	Başına vurma (T1)				Boynunu kırma (T2)				Çırpınma (T3)			
		0 mM	1 mM	5 mM	10 mM	0 mM	1 mM	5 mM	10 mM	0 mM	1 mM	5 mM	10 mM
-SH	0	8,553±0,07 ^a	8,319±0,07 ^b	5,283±0,07 ^f	4,198±0,07 ^h	2,677±0,07 ⁱ	5,355±0,07 ^j	4,635±0,07 ^k	4,125±0,07 ^l	7,353±0,07 ^c	5,909±0,07 ^d	5,430±0,07 ^e	4,748±0,07 ^g
	24	8,525±0,07 ^a	7,245±0,07 ^c	4,125±0,07 ^g	3,565±0,07 ^h	7,365±0,07 ^b	2,113±0,07 ^d	1,911±0,07 ^f	1,627±0,07 ^g	5,025±0,07 ^e	2,665±0,07 ⁱ	2,495±0,07 ^j	2,305±0,07 ^k
	48	0,878±0,07 ^a	0,696±0,07 ^b	0,614±0,07 ^e	0,336±0,07 ^l	0,620±0,07 ^d	0,548±0,07 ^f	0,545±0,07 ^g	0,509±0,07 ^h	0,654±0,07 ^c	0,473±0,07 ⁱ	0,438±0,07 ^j	0,338±0,07 ^k
	72	0,034±0,07 ^c	0,026±0,07 ^e	0,021±0,07 ^f	0,011±0,07 ^h	0,055±0,07 ^a	0,040±0,07 ^b	0,034±0,07 ^c	0,028±0,07 ^d	0,029±0,07 ^d	0,020±0,07 ^f	0,019±0,07 ^f	0,014±0,07 ^g
S-S	0	4,77±0,07 ^a	3,55±0,07 ^b	2,95±0,07 ^c	2,35±0,07 ^e	1,552±0,07 ^f	1,416±0,07 ⁱ	1,208±0,07 ^j	1,148±0,07 ^k	2,893±0,07 ^d	1,483±0,07 ^g	1,456±0,07 ^h	0,795±0,07 ^l
	24	3,51±0,07 ^a	3,05±0,07 ^b	2,75±0,07 ^c	2,34±0,07 ^d	0,995±0,07 ^h	1,435±0,07 ^f	1,160±0,07 ^g	1,710±0,07 ^e	0,560±0,07 ⁱ	0,547±0,07 ⁱ	0,514±0,07 ^j	0,414±0,07 ^k
	48	0,04±0,07 ^c	0,03±0,07 ^d	0,03±0,07 ^e	0,02±0,07 ⁱ	0,033±0,07 ^d	0,030±0,07 ^f	0,029±0,07 ^f	0,027±0,07 ^g	0,048±0,07 ^a	0,042±0,07 ^b	0,027±0,07 ^g	0,022±0,07 ^h
	72	0,02±0,07 ^d	0,01±0,07 ^e	0,00±0,07 ^f	0,00±0,07 ^g	0,030±0,07 ^a	0,027±0,07 ^b	0,020±0,07 ^c	0,017±0,07 ^d	0,014±0,07 ^e	0,013±0,07 ^e	0,010±0,07 ^f	0,010±0,07 ^f
K	0	0,156±0,07 ^b	0,147±0,07 ^d	0,144±0,07 ^e	0,087±0,07 ^k	0,160±0,07 ^a	0,155±0,07 ^c	0,133±0,07 ^f	0,128±0,07 ^g	0,123±0,07 ^h	0,092±0,07 ⁱ	0,091±0,07 ^j	0,056±0,07 ^l
	24	1,770±0,07 ^a	1,169±0,07 ^b	1,112±0,07 ^c	0,538±0,07 ^j	0,823±0,07 ^d	0,781±0,07 ^e	0,750±0,07 ^f	0,678±0,07 ^h	0,740±0,07 ^g	0,573±0,07 ⁱ	0,512±0,07 ^k	0,458±0,07 ^l
	48	2,405±0,07 ^c	1,705±0,07 ^f	1,145±0,07 ^l	1,235±0,07 ^j	2,505±0,07 ^b	1,535±0,07 ^h	1,425±0,07 ⁱ	1,175±0,07 ^k	3,585±0,07 ^a	2,155±0,07 ^d	1,935±0,07 ^e	1,685±0,07 ^g
	72	6,901±0,07 ^a	4,987±0,07 ^b	3,820±0,07 ^c	3,654±0,07 ^d	2,273±0,07 ^g	1,792±0,07 ⁱ	1,736±0,07 ^j	1,349±0,07 ^l	2,615±0,07 ^e	2,491±0,07 ^f	2,053±0,07 ^h	1,694±0,07 ^k

Küçük harfler (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l) uygulamaların zamana göre farklılığı belirtip, aynı harfler aynı saatte aynı parametre sonuçları için uygulamalar arasında fark olmadığını gösterir

4.4. Post-mortem ve Oksidasyon Aşamasına Ait Protein Profil Değişimi

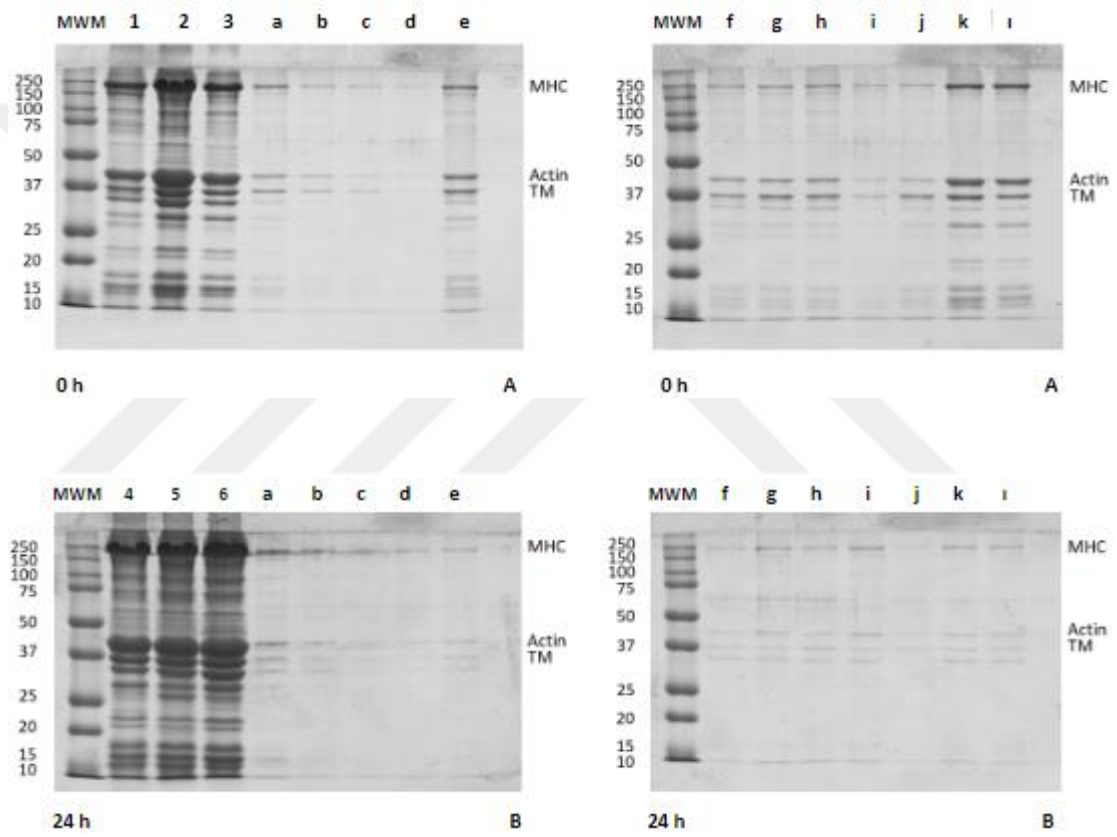
Postmortem ve oksidasyon süreçlerinde SDS-PAGE ile belirlenen proteinler ve ağırlıkları Şekil 4.1-4.4’de verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi miyosin ağır zinciri (MHC, 220 kDa), aktin (43 kDa) ve tropomyosin (TM, 38 kDa), HROS tarafından indüklenen protein oksidasyonuna oldukça fazla katılmıştır. Bu proteinlerden özellikle MHC, oksidatif hasarlara eğilimli olup yapılan SDS-PAGE modellemesi de artan H₂O₂ konsantrasyonu ile birlikte MHC’ de önemli kayıpları göstermiştir. Benzer şekilde öldürme tekniğinden kaynaklanan stress de bu proteinin azalmasında etkili olmuş özellikle de T3 grubunda etkin olarak kendini göstermiştir. Çalışma verilerimize paralel olarak Addis *et al.* (2012)’ de benzer sonuçlar kaydederek, MHC' nin bütünlüğünün düşük stresli kesim koşullarında (omurilik kopması) daha iyi korunduğunu, yüksek stresli kesim yönteminin (asfiksi) ise MHC yoğunluğunu güçlü bir şekilde etkilediğini bildirmiştir.

Enerji metabolizmasında yer alan enzimlerin aktivitesi, et kalitesi özellikleri için büyük önem taşır. Çünkü aktin-miyosin kompleksi ve pH düşüşü, kasın ete dönüşümünden sorumlu ana değişikliklerdir ve postmortem enerji metabolizmasından şiddetle etkilenir (Torres de Souza Rodrigues *et al.* 2017).

Çalışmamızda postmortem aşamada T3 grubunda belirlenen yoğun aktin bantları, aktinin kas kasılması ve aktivasyonu ile etkilenecek yukarı regüle olduğunu göstermektedir (Amid *et al.* 2012). Aktin ve miyosin filamentleri arasındaki bozulmanın sonucu olarak, sarkomerik I-bandında ince filamentler kırılır ve miyofibriller parçalanır. Buna ilaveten kasılma ve kas yapısı da bu duruma neden olabilmektedir (Torres de Souza Rodrigues *et al.* 2017). Yine aktinin ölüm süresi ve öldürme tekniğine bağlı olarak degregasyona uğradığı bildirilmiştir (Tulli *et al.* 2015)

Tropomyosin (TM), miyofibrillerin düzenleyici bir proteindir ve iki alt üniteli bir sargılı sarmalın standart yapısı olarak bildirilmiştir (Nishio *et al.* 2018). Çalışmamızda SDS-PAGE’ de tüm ayrılmış tepe bantları 34 kDa taşınmıştır (Şekil 1-8). Bu sonuç Roy *et al.* (1976) ve Nishio *et al.* (2018) ile uyumludur.

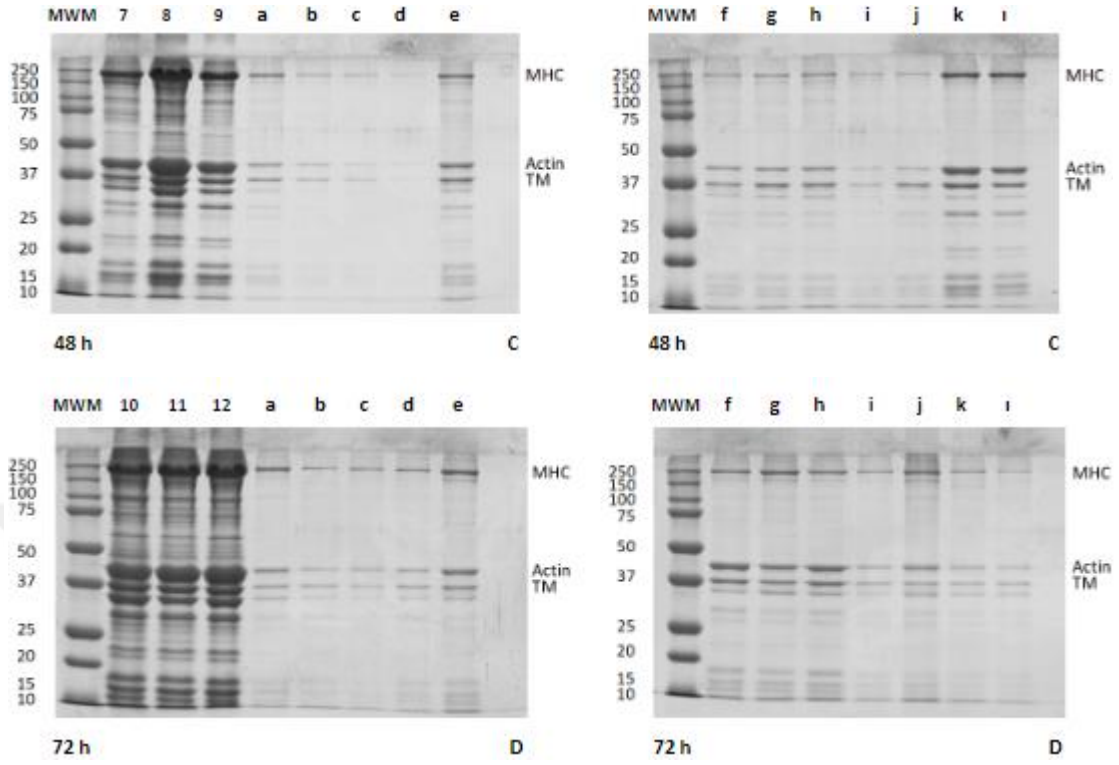
Okside örneklerin tamamında MHC, aktin ve TM bant yoğunlukları azalmıştır. Bu veriler Zhang *et al.* (2017) ile uyumlu olmakla birlikte bu durum söz konusu araştırmacılar tarafından S-S'nin protein oksidasyonuna büyük katkı sağladığı, MHC, aktin ve TM bant yoğunluklarında azalmaların olduğu belirtilmiştir. Çünkü sistein yan zincir grupları, oksitlenmiş proteinlerin çapraz bağlarının başlatılmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (Park *et al.* 2007a; Park *et al.* 2007b).



Şekil 4.1. 0 ve 24. saate ait MP ve okside protein jel görüntüsü

*A (0. Saat); 1:T1, 2:T2, 3:T3, a:0mM T1, b: 1mM T1, c: 5mM T1, d: 10mM T1, e: 0mM T2, f: 1mM T2, g: 5mM T2, h: 10mM T2, i: 0mM T3, j: 1mM T3, k: 5mM T3, l: 10mM T3

B (24. Saat); 4:T1, 5:T2, 6:T3, a:0mM T1, b: 1mM T1, c: 5mM T1, d: 10mM T1, e: 0mM T2, f: 1mM T2, g: 5mM T2, h: 10mM T2, i: 0mM T3, j: 1mM T3, k: 5mM T3, l: 10mM T3



Şekil 4.2. 48 ve 72. saate ait MP ve okside protein jel görüntüsü

C (48. Saat); 7:T1, 8:T2, 9:T3, a:0mM T1, b: 1mM T1, c: 5mM T1, d: 10mM T1, e: 0mM T2, f: 1mM T2, g: 5mM T2, h: 10mM T2, i: 0mM T3, j: 1mM T3, k: 5mM T3, l: 10mM T3
 D (72. Saat); 10:T1, 11:T2, 12:T3, a:0mM T1, b: 1mM T1, c: 5mM T1, d: 10mM T1, e: 0mM T2, f: 1mM T2, g: 5mM T2, h: 10mM T2, i: 0mM T3, j: 1mM T3, k: 5mM T3, l: 10mM T3

5. SONUÇ

Balıklar biyolojik kompozisyonlarından dolayı çok çabuk bozulabilen ürünlerdir. Bozulma, balık ve diğer su ürünlerinde raf ömrünün kısalmasına sebep olmaktadır. Daha çok proteinler ve protein tabiatında olmayan bileşiklerin sebep olduğu ve et kalitesi üzerinde önemli etkiye sahip olan değişimler dikkate alınmaktadır.

Uygun tekniklerle öldürülen balıkların ön işlem ve işleme teknolojileri ile entegrasyonu sonucunda hem raf ömrü daha uzun olan ürünler geliştirilerek ekonomik bir kazanç, hem de insan tüketimi açısından son derece önemli gıdalar arasında bulunan su ürünlerinin besin kalitesi daha yüksek ürünler olarak pazarlanması sağlanacaktır. Haliyle hasatta meydana gelen bu kayıpların önüne geçilerek tüketicilerinde daha kaliteli gıdalara ulaşma şansı yükselecektir.

Su ürünleri çiftliklerinde yaygın olarak kullanılan öldürme tekniklerinin gökkuşağı alabalıklarında antioksidan duruma ve +4⁰C’de depolanan filetolarda postmortem *in vivo* myofibriller protein oksidasyonu-oksidasyona duyarlılığının araştırıldığı bu çalışmada yapılan analizler doğrultusunda aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

1. Uygulanan tekniklerin hepsinde pH ve glikojen seviyesinde azalışlar laktik asit seviyelerinde ise artışlar kaydedilmiş ve en belirgin değişimler ise T3 olarak kodlanan çırpınma grubunda elde edilmiştir.
2. Antioksidan enzim aktiviteleri ve MDA seviyeleri dikkate alındığında yine T3 grubu uygulamasının daha fazla strese sebep olduğu belirlenmiştir.
3. Tüm tekniklerde miyofibriller proteinlerde ve oksidasyon sürecinde S-S ve -SH konsantrasyonlarında azalma, karbonil miktarında artış belirlenmiştir.
4. Belirlenen protein profillerinde miyofibriller proteinlerden miyosin, aktin ve tropomyosine ait bantlar SDS-PAGE tekniği ile izlenmiş tüm proteinlerde süreçlerde kayıplar belirlenmiştir.

Sonuçlara birlikte bakıldığında, çoğunlukla bir evrensel gerçek ortaya çıkmakta ve ani ölüm tekniklerinin gökkuşağı alabalığı filetolarında daha yüksek başlangıç kas glikojen içeriğine, yüksek kas pH'sına, geç rigor-mortis başlangıcına ve daha az oksidasyona sebep olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca, bu yöntemler laktik asit oluşumunu azaltmış, et kalitesini ve daha uzun raf ömrünü sağlamıştır. Bu araştırma sonuçları, uygulamaya aktarılabilir olması açısından önemlidir. Yine uygun teknikler paydaşlarla paylaşarak süreklilik sağlanmaya çalışılacaktır. Bu nedenle, yaygın olarak kullanılan tekniklerde çırpınmadan ziyade diğer iki tekniğin hayvan refahı ve et kalitesi açısından doğru perküsyon yöntemleri olduğu görülmüştür.



KAYNAKLAR

- Achman, R.G., 1995. Composition and nutritive value of fish and shellfish lipids, fish and fishery products, Ed: A. Ruiter. CAB International Wallingford Oxon, OX10 8DE UK, 117-157.
- Addis, M. F., Pisanu, S., Preziosa, E., Bernardini, G., Pagnozzi, D., Roggio, T. and Teruva, G., 2012. 2D DİGE/MS to investigate the impact of slaughtering techniques on post-mortem integrity of fish filet proteins. Journal of Proteomics, 75(12), 3654-3664.
- Aebi, H., 1974. Catalase in vitro. Methods of enzymatic analysis. Ed:U. Bergmeyer. New York and London: Academic Press, 673-667.
- Ahmad, F., Ali, S.S. and Shakoori, A., 1995. Sublethal effects of danitol fenpropathrin'a synthetic pyrethroid, on preshwater chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Folia. Biol. (Krakow) , 43, 151-159.
- Akagawa, M., Sasaki, D., Ishü, Y., Kurota, Y., Yotsu-Yamashita, M., Uchida, K. and Suyama, K., 2006. New method for the quantitative determination of major protein carbonyls, alpha-aminoadipic and gamma-glutamic semialdehydes: Investigation of the formation mechanism and chemical nature in vitro and in vivo. Chemical Research in Toxicology, 19(8), 1059-1065.
- Akhgrari, M., Abdollahi, M., Kebryaezadeh, A., Hosseini, R. and Sabzevari, O., 2003. Biochemical evidence for free radicalinduced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. Human and Experimental Toxicology, 22: 205 -/211.
- Alak, G., 2011. Probiyotik ve Prebiyotiklerin Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Bağırsak Florası ile Filetolarının Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özelliklerine Etkileri. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Alak, G., Atamanalp, M., Topal, A., Arslan, H., Oruç, E. and Altun, S., 2013. Histopathological and biochemical effects of humic acid against cadmium toxicity in brown trout gills and muscles. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13, 315-320.
- Alak G., Uçar, A., Parlak, V., Yeltekin, A. Ç., Tas, D. Ö., Kocaman, E. M., Yılgin, M., Atamanalp, M. and Yanık T., 2017a. Assessment of 8- hydroxy-2-deoxyguanosine aktiviy, gene expression and atioxidant enzyme activity on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissuse exposed to biopesticide. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 203, 51-58.
- Alak G., Yeltekin, A. Ç., Tas, I. H., Uçar, A., Parlak, V., Topal A., Kocaman, E.M. and Atamanalp, M., 2017b. Investigation of 8-OHdG, CYP1A, HSP70 and transcriptional analyses of antioxidant defence system in liver tissues of rainbow trout exposed to eprinomectin. Fish and Shellfish Immunology, 65, 136-144.
- Alak, G., Uçar, A., Yeltekin, A. Ç., Çomaklı, S., Parlak, V., Taş, I. H., Özkaraca, M., Topal, A., Kirman, E. M., Bolat, İ., Atamanalp, M. and Türkez H., 2018. Neuroprotective effects of dietary borax in the brain tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper-induced toxicity, Fish Physiol Biochem, 44,1409–1420.

- Alak, G., Yeltekin, A. Ç., Özgeriş, F. B., Parlak, V., Uçar, A., Keleş, M.S. and Atamanalp, M., 2019a. Therapeutic effect of N- acetyl cysteine as an antioxidant on rainbow trout's brain in cypermethrin toxicity. *Chemosphere* 221, 30-36.
- Alak, G., Parlak, V., Aslan, M. E., Ucar, A., Atamanalp, M. and Turkez, H. 2019b. Borax supplementation alleviates hematotoxicity and DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to copper. *Biological trace element research*, 187(2), 536-542.
- Amid, A., Samah, N. A. and Yusof, F., 2012. Identification of troponin I and actin, alpha cardiac muscle 1 as potential biomarkers for hearts of electrically stimulated chickens. *Proteome Science*, 10(1), 1.
- Ashley, P. J., 2007. Fish welfare current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3-4), 199-235.
- Atabeyoğlu, K., 2011. Bazi Ağır Metallerin Subletal Dozlarının Gökkuşağı Alabalıklarında, Katalaz, Superoksit Dismutaz, Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktiviteleri ve mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkileri. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Ateş, M., Ögüt, S., Şen, İ. ve Gümüş, B.A.2008. *Oncorhynchus mykiss* ile *Salmo salar* balık türlerinin SDS-PAGE elektroforezi yöntemi ile protein bandlarının karşılaştırılması. 1. Ulusal Alabalık Sempozyumu, Isparta.
- Ayana, B. ve Turhan, K. N., 2010. Gıda ambalajlamasında antimikrobiyel madde içeren yenilebilir filmler/ kaplamalar ve uygulamaları. *Gıda*, 35 (2), 151-158.
- Aylangan, A. ve Öztan, A., 2008. Hayvansal gıda sanayisi yan ürünleri kullanılarak protein hidrolizatları üretimi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Erzurum.
- Barton, B. A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *integ. And Comp. Biol.*, 42, 517–525.
- Bastioğlu, A. Z , Serdaroğlu, M. ve Nacak.B., 2016. Et ve et ürünlerinde protein oksidasyonu. *Journal of Food and Health Science*, 2(3), 171-183.
- Beutler, E., 1975. The preparation of red cells for assay. *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Ed : E. Beutler, Grune and Stratton Company, New York, 8-18.
- Boneli, A., 1999. Post mortem fat alterations. *Acquacoltura: Qualita dell'ambiente e del prodotto*. Ed. Scientifiche Italiane, Napoli, 165-166.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Ambrosiadis, L., Fletouris, D. and Botsoglou, N., 2014. Effect of leaf (*Olea europen* L.) extracts on protein and lipid oxidation of long-term frozen n-3 fatty acids-enriched pork patties. *Meat science*, 98, 150-157.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Caggiano, M., 2000. Quality in harvesting and post-harvesting procedures-influence on quality. fish freshness and quality assessment for sea bass and sea bream. *Global quality assessment in Mediterranean aquaculture Zaragoza. CIHEAM-IAMZ*, 149.
- Castro, C., Perez-Jimenez, A., Coutinho, F., Diaz-Rosales, P., Alexandra dos reis Serra, C., Panserat, S., Corraze, G., Peres, H. and Oliva-Teles, A., 2015. Dietary carbohydrate and lipid sources affect differently the oxidative status of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *British jurnal of Nutrition*, 114, 1584-1593.

- Chen, L., Li, C., Ullah, N., Guo, Y., Sun, X., Wang, X. and Feng, X., 2016. Different physicochemical, structural and digestibility characteristics of myofibrillar protein from PSE and normal pork before and after oxidation. *Meat Science*, 121, 228–237.
- Choi, J.-S., Moon, H. E., Roh, M. K., Ha, Y. M., Le, B. B., Cho, K. K. and Choi, I. S., 2016. Physiological properties of *Scomber japonicus* meat hydrolysate prepared by subcritical water hydrolysis. *Journal of Environmental Biology*, 37, 57-63.
- Concollato, A., Parisi, G., Masoero, G., Romv ari, R., Olsen, R. E. and Dalle Zotte, A., 2016. Carbon monoxide stunning of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) modifies rigor mortis and sensory traits as revealed by NIRS and other instruments. *J Sci Food Agric.*, 96(10),3524-35.
- Cui, X., Xiong, Y. L., Kong, B., Zhao, X. and Liu, N., 2012. Hydroxyl radical-stressed whey protein isolate: Chemical and structural properties. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2454–2461.
- Çaklı,  . 2008. Su  r nleri  şleme Teknolojisi 2 (Alternatif Su  r nleri  şleme Teknolojileri), Ege Üniversitesi Yayınları, Su  r nleri Fakültesi, Yayın No: 77.513 s,  zmir.
- Çaklı,  ., 2010. Su  r nleri  şleme Teknolojisi. Ege Üniversitesi Yayınları Su  r nleri Fakültesi Yayın No: 76, 695 s,  zmir.
- Çiftçi, N. and Cicik, B., 2011. Krom (VI)'nın *Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio*, *Clarias gariepinus* ile *Callinectes sapidus*'un dokularında birikimi, protein ve glikojen düzeylerine etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi E irdir Su  r nleri Fakültesi Dergisi, 7 (2), 39.
- Daskalova, A. and Pavlov, A., 2015. Effect of two stunning methods on postmortem muscle pH and meat quality of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18(1), 83-90.
- De Duve, C., 1983. Lysosomes revisited. *European Journal of Biochemistry*, 137(3), 391-397.
- Digre, H., Erikson, U., Skaret, J., Lea, P., Gallart-Jornet, L. and Misimi, E. 2011. Biochemical, physical and sensory quality of ice-stored Atlantic cod (*Gadus morhua*) as affected by pre-slaughter stress, percussion stunning and AQUI-S™ anaesthesia. *European Food Research and Technology*, 233(3), 447.
- Dönmez,  ., 2017. Su  r nleri Tüketimi ve Sağlık  lişkisi, Bitirme Projesi, Su  r nleri Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum.
- Dönmez, M. ve Tatar, O., 2001. Fleto ve bütün olarak dondurulmuş gökkuşağı alabalı ının (*Oncorhynchus mykiss* W.) muhafazası süresince ya  asitleri bileşimlerindeki değişmelerin araştırılması. Ege Üniversitesi Su  r nleri Dergisi, 18 (1-2), 125-134.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babutb, M. and Vaseural, P., 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve unio tumidus. *Aquatic Toxicology*, 39, 93-110.
- Duan, Z. H., Liu, H. Z., Luo, P., Gu, Y. P. and Li Y. Q., 2018. The effect of melanin-free extract from *Sepia esculenta* ink on lipid peroxidation, protein oxidation and water-holding capacity of tilapia fillet during cold storage. *Chem Cent J.* 14;12(1),30.

- Ekici, K. ve Akyüz, N., 2003. Farklı hayvan türlerine ait çiğ etlerin sds-page yöntemiyle belirlenmesi üzerine bir araştırma. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 14 (2),78-82.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S. and Decker, E. A., 2008. Antioxidant activity of proteins and peptides. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48(5), 430-441.
- Ellman, G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics, 82, 70–77.
- Ercan, N. and Fidancı, U. R., 2012. Urine 8- hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels of dogs in pyoderma. Ankara Üniv. Vet. Fak. Dergisi, 59, 163-168.
- Erikson, U., Sigholt, T., Rustad, T., Einarsdottir, I. E. and Jorgensen L., 1999. Contribution of bleeding to total handling stress during slaughter of Atlantic salmon. Aquaculture International, 7, 101–115.
- Erikson, U., Digre, H. and Misimi, E., 2011. Effects of perimortem stress on farmed Atlantic cod product quality: a baseline study. J Food Sci., 76(4),S251-61.
- Faizan, M., Stubhaug, I., Menoyo, D., Esatbeyoglu, T., Wagner A.E., Struksnæs, G., Koppe, W. and Rimbach, G., 2013. Dietary alpha-tocopherol affects tissue vitamin e and malondialdehyde levels but does not change antioxidant enzymes and fatty acid composition in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Int J Vitam Nutr Res., 83(4):238-245.
- Fernandez, J., Perez-Alvarez, J.A., and Fernandez-Lopez, J.A.,1997. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation.Food Chem., 59, 345-353.
- Fetoui, H., Makni, M., Garouni, E. M. and Zeghal N., 2010. Toxic effects of lambda-cyhalothrin, a synthetic pyrethroid pesticide, on the rat kidney: Involvement of oxidative stress and protective role of ascorbic acid. Experimental and Toxicologic Pathology, 62, 593-599.
- Foegeding, E. A., Lanier, T. C. and Hultin, H. O., 1996. Characteristics of edible muscle tissues. Food Chemistry, 3, 879-942.
- Gallo, M. , Ferracane, R. and Naviglio, D. 2012. Antioxidant addition to prevent lipid and protein oxidation in chicken meat mixed with supercritical extracts of *Echinacea angustifolia*. Journal of Supercritical Fluids, 72, 198–204.
- Geri, G., Poli, B.M., Macsini, M., Lupi, P., Parisi, G., Meacetti, M.I., Guidotti, P. and Dell'Angello, M., 1996. Fish freshness and quality assessment in seabass and seabream stored at different temperatures. Seabass and seabream culture: Problems and prospects. Handbook of EAS, 280-283.
- Gökoğlu, N., 2002. Su Ürünleri İşleme Teknolojisi. Su vakfı yayınları.;ISBN:975–9703–48–3, 157 s, İstanbul.
- Grimsrud, P. A., Xie, H., Griffin, T.J. and Bernlohr, D. A., 2008. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. The Journal of Biological Chemistry, 283(32), 21837-21841.
- Guardiola, F. A., Bahi, A., Messina, C.M., Mahdhi, A., Santulli, A., Arena, R., Bakhrouf, A. and Esteban, M.A., 2017. Quality and antioxidant response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) to dietary supplements of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) alone or combined with probiotic strains. Fish & Shellfish Immunology, 63, 277-284.

- Gülçin, İ., 2002. Isırgan Otunun (*Urtica dioica*) Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi, Oksidatif Ezimlerin Karakterizasyonu ve Bazı In Vivo Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Gutteridge, J. M. C., 1995. Lipid peroxidation and as biomarkers of tissue damage. Clin. Chem., (41/12), 1819-1828.
- Hailili, P., 2017. İşlenmiş Et Ürünlerinde Oksidatif ve Mikrobiyolojik Bozulmanın Kontrolü için Kullanılan Doğal ve Sentetik Maddeler ile Bunların Etki Mekanizmaları. Tezsiz Yüksek Lisans Bitirme Projesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Oxford, New York.
- Harel, S., and Kanner, J., 1985. Hydrogen-peroxide generation in ground muscle tissues. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33(6), 1186–1188.
- Havir, E. A. and Mchale, N. A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. Plant Physiol., 84, 450-455.
- Hema, G. S., Joshy, C. G., Shyni, K., Chatterjee, N. S., Ninan, G. And Mathew, S., 2017. Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish skin (*Epinephelus malabaricus*) using response surface methodology and its characterization. J Food Sci Technol 54(2),488–496.
- Iwamoto, M., Yamanaka, H., Abe, H., Ushio, H., Watabe, S. and Hashimoto, K., 1988. ATP and creatine phosphate breakdown in spiked plaice muscle during storage, and activities of some enzymes involved. J. of Food Sci., 53,1662-1662.
- Iwamoto, M., Yamanaka, H., Watabe, S. and Hashimoto, K., 1987. Effect of storage temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice (*Paralichthys olivaceus*) muscle. J. of Food Sci., 52,1514-1517.
- İspirli, E., 2016. Effects of temephos on glutathione S transferases enzyme activity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Bitirme Ödevi, Su Ürünleri Fakültesi, Erzurum.
- Jurma, O. P., Hom, D. G. and Anderson, J. K., 1997. Decreased glutathione results in calcium – mediated cell death in PC12. Free Radical Biology and Medicine, 23(7), 1055-1066.
- Kar, M. and Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol., 57, 315-319.
- Kaya, Y., Duyar, H. A. ve Erdem, E., 2004. Balık yağ asitlerinin insan sağlığı için önemi. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, 21 (3-4), 365-370.
- Keha, E.E., Küfrevioğlu, Ö.İ., 2012. Biyokimya, Aktif Yayınevi, Bizim Büro Basımevi Yayın-Dağıtım, 645 s, Ankara.
- Kılbaş, S., 2006. L-Name Hipertansif Ratlarda Lisinoprilin Beyinde Lipid Peroksidasyonu Ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.
- Konar V. ve Köprücü K., 2002. Gökkuşaağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) etindeki yağ asidi miktarlarının araştırılması. Fırat Üniv Fen Müh Bil Derg, 14,73-78.
- Kong, F., 2007. Kinetics of salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) quality changes during thermal processing. Washington State University Department of Biological Systems Engineering, 186s, Washington.

- Küçükgülmez, A., 2005. Akyatan (Karataş/Adana) Lagünü'nden Avlanan Pastörize Edilmiş Mavi Yengeç (*Callinectes sapidus*, Rathbun, 1896) Etinin Ağır Metal ve Mineral Madde İçerikleri. Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Kunce, C. M. and Trelease, R. N., 1986. Heterogeneity of catalase in maturing and germinated cotton seeds. *Plant Physiol.*, 81, 1134-1139.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lall, S. P., 1995. Macro and trace elements in fish and shellfish. Ed: A. Ruiter. CAB international Wallingford Oxon, OX10 8DE, UK p. 187-213.
- Lall, S.P. and Parazo, M.P., 1995. Vitamins in Fish and shellfish. Edited: A. Ruiter. CAB international Wallingford Oxon, OX10 8DE, UK p. 157-186.
- Lerfall, J., Roth, B., Skare, E. F., Henriksen, A., Betten, T., Dziatkowiak-Stefaniak, M. A. and Rotabakk, B. T., 2015. Pre-mortem stress and the subsequent effect on flesh quality of pre-rigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during ice storage. *Food Chemistry* 175, 157–165.
- Li, P.F. and Fang, Y.Z., 1994. Effects of reactive oxygens on protein damage. *Life Chem.*, 14(6), 1–3
- Li, Y., Kong, B., Xia, X., Liu, Q. and Diao, X., 2013. Structural changes of the myofibrillar proteins in common carp (*Cyprinus carpio*) muscle exposed to a hydroxyl radical-generating system. *Process Biochemistry*, 48(5-6), 863-870.
- Loewe, T. E., Ryder, J. M., Carragher, J.F., and Wells, R. M. G., 1993. Flesh quality in snapper, (*Pagrus auratus*) affected by capture stress. *J. Food Sci.*, 58, 770-773.
- Lu, H., Zhang, L., Li, Q. and Luo, Y., 2017. Comparison of gel properties and biochemical characteristics of myofibrillar protein from bighead carp (*Aristichthys nobilis*) affected by frozen storage and a hydroxyl radical-generation oxidizing system. *Food Chemistry*, 223, 96–103.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P. and Estevez, M., 2011. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(1), 83–95.
- Luo, Y., Su, Y., Lin, R.Z., Shi, H.H. and Wang, X.R., 2006. 2-chlorophenol induced ROS generation in fish *Carassius auratus* based on the EPR method. *Chemosphere*, 65(6), 1064–1073.
- Manikkam, V., Mathai, M. L., Street, W. A., Donkor, O. N. and Vasiljevic, T., 2016. Sustainable use of silver warehou (*Serioloba punctata*): Effects of storage, processing conditions and simulated gastrointestinal digestion on selected *in-vitro* bioactivities. *Food Sci Technol.* 53(9), 3574-3582.
- Mecatti, M., 1999. Evolution of freshness parameters in various fish species. *Acquacoltura: Qualita dell'ambiente e del prodotto*. Ed. Scientifiche Italiane, 157-163.
- Merkin, G. V., Roth, B., Gjerstad, C., Dahl-Paulsen, E. and Nortvedt, R., 2010. Effect of pre-slaughter procedures on stress responses and some quality parameters in sea-farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 309(1-4), 231-235.
- Merkin, G. V., Stien, L. H., Pittman, K. and Nortvedt, R., 2014. The effect of stunning methods and season on muscle texture hardness in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J Food Sci.*, 79(6), 1137-41.

- Mørkøre, T., Mazo, T. P. I., Tahirovic, V. and Einen O., 2008. Impact of starvation and handling stress on rigor development and quality Atlantic salmon (*Salmon salar* L). *Aquaculture*, 277, 231-238.
- Nakayama, T., Da-jia, L. and Ooi, A., 1992. Tension change of stressed and unstressed carp muscles in isometric rigor contraction and resolution. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58, 1517-1522.
- Nakyinsige, K., Sazili, A. Q., Aghwan, Z. A., Zulkifli, I., Goh, Y. M., Abu Bakar, F. and Sarah, S. A., 2015. Development of microbial spoilage and lipid and protein oxidation in rabbit meat. *Meat Science*, 108, 125–131.
- Nishio, Y., Ushimura, Y., Udea, S., Maeda, N., Hattori, A. and Yamanoue, M., 2018. Structural differences between myofibrillar protein, paratropomyosin, and tropomyosin as revealed by highperformance liquid chromatography. *Anim Sci J*, 89:1161-1168.
- Nordgreen, A. H., Slinde, E., Møller, D. and Roth, B., 2008. Effect of various electric field strengths and current durations on stunning and spinal injuries of Atlantic herring. *J Aquat Anim Health*, 20(2), 110-5.
- Odabaşoğlu, F., 1988. Ispanak Bitkisinde Pestisitler ve Bitkisel Hormonlar ile Muamelenin Bazı Enzim Aktiviteleri Üzerine etkileri. S:5-9, Yüzüncü Yıl Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Van.
- Oehlenschläger, J. and Rehbein, H., 2009. Basic facts and figures. Ed: Oehlenschläger, J., Rehbein, H., fishery products, quality, safety and authenticity, Wiley-Blackwell Publishing Ltd. United kingdom, 1-17.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358.
- Oliveira Filho, P. R.C., Montes Girao, P. J., Lapa-Guimaraes, J., Miyoko Natori, M., Cristina Vargas, S. and Macedo Viegas, E. M., 2015. Impact of electrical stunning on fish behavior and meat quality of pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Acta Scientiarum. Technology*, 38, 81-88.
- Oliver, C. N., Ahn, B. W., Moerman, E. J., Goldstein, S. and Stadtman, E. R., 1987. Age-related changes in oxidized proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262(12), 5488–5491.
- Ölmez, D., 2017. Alabalık İşleme Atıklarından Elde Edilen Hidrolizatların Protein-Lipit Profillerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı, Erzurum.
- Oruç, E.Ö., Sevgiler, Y. and Üner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 137, 43–51.
- Palaniappan, P. R. and Vijayasundaram, V., 2008. FTIR study of arsenic induced biochemical changes on the liver tissues of fresh water fingerlings *Labeo rohita*. *Rom J Biophys*, 18, 135-144.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B. and Raisuddin S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago atto*. *The Science of the Total Environment*, 309, 105–115.
- Park, D., Xiong, Y. L. and Alderton, A. L., 2007a. Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 26-29.

- Park, D., and Xiong, Y. L. 2007b. Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. *Food Chemistry*, 103(2), 607–616.
- Parlak, V., 2016. Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Akut Ve Kronik, Alfa Sipermetrin Uygulamalarının Hematoksik, Hepatoksik ve Nefrotoksik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Pate E.F. and Brokaw C.J., 1980. Cross-bridge behaviour in rigor-muscle. *Biophys. Struct.*, 7, 51–54.
- Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D. and Fontainhas-Fernandes, A., 2006. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85, 91–96.
- Poli, B. M., Parisi, G., Scappini, F. and Zampacavallo, G., 2005. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, 13, 29–49.
- Pottinger T.G., 2001. Effects of husbandry stress on flesh quality indicators in fish. *Farmed Fish quality*. Ed: S.C. Kestin and P.D. Warris, Fishing News Books, Cornwall, UK., 145–160.
- Qin, N., Li, D., Hong, H., Zhang, Y., Zhu, B. and Luo, Y., 2016. Effects of different stunning methods on the flesh quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fillets stored at 4° C. *Food Chemistry*, 201, 131–138.
- Rahmanifarah, K., Sattari, A. and Shabanpour, B., 2011. Effects of clove oil on behavior and flesh quality of common carp (*Cyprinus carpio* L.) in comparison with pre-slaughter CO₂ stunning, chilling and asphyxia. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 11, 139–147.
- Refaey, M. M., Tian, X., Tang, R., and Li, D. 2017. Changes in physiological responses, muscular composition and flesh quality of channel catfish *Ictalurus punctatus* suffering from transport stress. *Aquaculture*, 478, 9–15.
- Robb D.H.F., 2001. The relationship between killing methods and quality. *Farmed Fish Quality*. Ed: S.C. Kestin and P.D. Warris, Fishing News Books, Cornwall, UK., 220–233.
- Robb D.H.F., Kestin S.C. and Warris P.D., 2000. Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. *Aquaculture*, 182, 261–269.
- Rotabakk, B.T., Bleie, H., Stien, L.H. and Roth, B., 2014. Effect of blood removal protocol and superchilling on quality parameters of prerigor filleted farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal Food Sci.*, 79(5), E881–6.
- Roth, B., Birkeland, S. and Oyarzun, F., 2009. Stunning, pre slaughter and filleting conditions of Atlantic salmon and subsequent effect on flesh quality on fresh and smoked fillets. *Aquaculture*, 289(3–4), 350–356.
- Roy, R. K., Potter, J. D. And Sarkar, S., 1976. Characterization of the Ca²⁺-regulatory complex of chick embryonic muscles: Polymorphism of tropomyosin in adult and embryonic fibers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 70, 28–36.
- Ruff, N., FitzGerald, R. D, Cross, T.F., Teurtie, G. and Kerry J.P., 2002. Slaughtering method and α -tocopheryl acetate supplementation affect rigor mortis and filet shelf-life of turbot *Scophthalmus maximus* L. *Aquaculture Res.*, 33, 703–714.
- Secci, G., Serra, A., Concollato, A., Conte, G., Mele, M., Olsen, R. E., and Parisi, G. 2016. Carbon monoxide as stunning/killing method on farmed Atlantic salmon

- (*Salmo salar*): Effects on lipid and cholesterol oxidation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2426-2432.
- Sen, C.K. and Packer, L., 2000. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 653-669.
- Shacter, E., 2000. Protein oxidative damage. *Methods Enzymol.* 319, 428-436.
- Shi, C., Cui, J., Yin, X., Luo, Y., and Zhou, Z. 2014. Grape seed and clove bud extracts as natural antioxidants in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets during chilled storage: Effect on lipid and protein oxidation. *Food Control*, 40, 134–139.
- Sikorski, Z.E., Kołakowska A. and Burt, J.R., 1990. Postharvest Biochemical and Microbial Changes. *Seafood resources, nutritional composition and preservation*. Ed: Z.E.Sikorski, CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida. 55-72.
- Silva, T. S., Cordeiro, O. D., Matos, E. D., Wulff, T., Dias, J. P., Jessen, F., and Rodrigues, P. M. 2012. Effects of preslaughter stress levels on the post-mortem sarcoplasmic proteomic profile of gilthead seabream muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(37), 9443–9453.
- Simitzis, P. E., Tsopelakos, A., Charismiadou, M. A., Batzina, A., Deligeorgis, S. G. And Miliou, H., 2014. Comparison of the effects of six stunning/killing procedures on flesh quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) and evaluation of clove oil anaesthesia followed by chilling on ice/water slurry for potential implementation in aquaculture. *Aquaculture research*, 45(11), 1759-1770.
- Skjervold P.O., Fjaera S.O., Ostby P.B. and Einen O., 2001. Live-chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 192, 265-280.
- Skjervold, P. O., Fjaera, S. O., and Ostby, P.B., 1999. Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. *Aquaculture*, 175, 93-101.
- Söbeli, C., ve Kayaardı, S., 2014. Et kalitesini belirlemede yeni teknikler. *Gıda*, 39 (4), 251-258.
- Soladoye, O.P., Juarez, M. L., Aalhus, J. L., Shand, P. and Est evez, M., 2015. Protein oxidation in processed meat: mechanisms and potential implications on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 106-122.
- Song, S. B., Xu, Y. and Zhou B. S., 2006. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 65, 699–706.
- Song, Y., Zhu, L. S., Wang, J., Wang, J. H., Liu, W. and Xie, H., 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 905-909.
- Sönmez, A. Y., Bilen, S., Alak, G., Hisar, O., Yanık, T., and Biswas, G. 2015. Growth performance and antioxidant enzyme activities in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles fed diets supplemented with sage, mint and thyme oils. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(1), 165-175.
- Soyer, A., 1999. Balıkta avlanma sonrası meydana gelen biyokimyasal değişimler. *Gıda*, 24 (1), 33-39.
- Stien L.H., Hirmas E., Bjornevik M., Karlsen O., Nortvedt R., Rora A.M.B., Sunde J. and Kiessling A., 2005. The effects of stress and storage temperature on the colour and texture of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua* L.), *Aquaculture Res.*, 36, 1197-1206.
- Stroud, G. D. 1969. Rigor in fish: The effect on quality. Torrey Research Station.

- Sun, X. D. and Holley, R. A., 2010. High hydrostatic pressure effects on the texture of meat and meat products. *Journal of Food Science*, 75(1), R17-R23.
- Sun, Y., Oberley, L.W. and Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 34 (3), 497–500.
- Teets, A.S., and Were, L.M., 2008. Inhibition of lipid oxidation in refrigerated and frozen salted raw minced chicken breasts with electron beam irradiated almond skin powder. *Meat Sci.*, 80,1326–1332.
- Thomas, P.M., Pankhurst, N.W., and Bremner, H.A., 1999. The effect of stress and exercise on post-mortem biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 54(6), 1177-1196.
- Torres de Souza Rodrigues, R., Luiz Chizzotti, M., Elber Vital, C., Baracat-Pereira, M. C., Barros, E., Costa Busato, K., Aparecido Gomes, R., Machado Ladeira, M. and Silva Martins, T., 2017. Differences in beef quality between angus (*Bos taurus taurus*) and nellore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. *PLoS ONE*, 12(1), e0170294.
- Torten, J. and Whitaker, J. R., 1964. Evaluation of Biuret + dye-binding methods for protein determination in meats. *Journal of Food Science*, 29(2), 168-174.
- Tulli, F., Fabbro, A., D'Agaro, E., Messina M., Bongiorno, T., Venir, E., Lippe, G., Tibaldi, E. and Stecchini M. L., 2015. The effect of slaughtering methods on actin degradation and on muscle quality attributes of farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Food Sci Technol*, 52(11),7182-7190.
- Turan, M., 2011. Dondurularak Depolanan Fileto Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) Kalitesine Kitosan ile Glazelemenin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Uçar, A., Ali Al-Hamdani, A.H., Alak, G., Atamanalp, M., Topal, A., Fakıoğlu, Ö., Arslan, H., Parlak, V. and Şensurat, T., 2012. Effects of carboxin on superoxide dismutase enzyme activite in rainbow trout (*Oncorhynus mykiss*). *BİBAD Research Journal of Biological Sciences*, 5 (2), 83-85.
- Ünlüsayın, M., Gümüş, B., Erdilal, R. and Gülyavuz, H., 2009. The influence of different salting processes on protein loss of *Sepia officinalis*. 3rd Trans-Atlantic Fisheries Technology Conference. Copenhagen.
- Utrera, M. and Estevez, M., 2012. Oxidation of myofibrillar proteins and impaired functionality: Underlying mechanisms of the carbonylation pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 8002–8011.
- Varga, D., Szabó, A., Hanc, C., Jeney, Z., Ardó, L., Molnár, M. and Molnár, T., 2014. Impact of handling and pre-mortal stress on the flesh quality of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*.1-6.
- Varlık, C., 2004. Su Ürünleri İşleme Teknolojisi. İstanbul Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, İşleme Teknolojisi Anabilim Dalı, 507s, İstanbul
- Venturini, F. P., Vargas Baldi, S. C., Paris, G., Costa, T. D., Rucin Que, D. S., Melo, M. P. and Macedo Viegas, E. M., 2018. Effects of different stunning methods on blood markers and enzymatic activity of stress responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Italian Journal of Animal Science*, 17(4), 1094-1098.
- Wang D., Tang J., Correia L.R. and Gill T.A., 1998. Postmortem changes of cultivated Atlantic salmon and their effects on salt uptake. *J. of Food Sci.*, 63(4), 634-637.
- Wang, L., Li, J., Wang, C, Zhao, Z., Luo, L., Du, X. and Xu, Q., 2019. Effect of N carbamoylglutamate supplementation on the growth performance, antioxidant

- status and immune response of mirror carp (*Cyprinus carpio*) fed an arginine-deficient diet. *Fish Shellfish Immunol.*, 3(84), 280-289.
- Warthesen, J.J. and Meuhlenkamp, M.R. 1997. Food chemistry for engineers, in *Handbook of Food Engineering Practice*. New York, USA: CRC Press, 668-669.
- Watabe S., Kamal M. and Hashimoto K., 1991. Postmortem changes in ATP, creatine phosphate and lactate in sardine muscle. *J. of Food Sci.*, 56,151-153.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.
- Wilkinson, R.J., Paton, N. and Porter, M.J.R., 2008. The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 282, 26–32.
- Yamaguchi, J. and Nishimura, M., 1984. Purification of glyoxysomal catalase and immunochemical comparison of glyoxysomal and leaf peroxisomal catalase in germinating pumpkin cotyledons. *Plant Physiol.*, 74, 261-267.
- Yilmaz S., 2018. Effects of dietary blackberry syrup supplement on growth performance, antioxidant, and immunological responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Plesiomonas shigelloides*. *Fish and Shellfish Immunol.*, 7(84),1125-1133.
- You, Y., Fu, J.J., Meng, J., Huang, G.D. and Liu, Y.H., 2009. Effect of N-acetylcysteine on the murine model of colitis induced by dextran sodium sulfate through upregulating PON1 activity. *Dig. Dis. Sci.*, 54, 1643-1650.
- Zampacavallo, G., Parisi, G., Mecatti, M., Lupi, P., Giorgi, G. and Poli, B. M., 2015. Evaluation of different methods of stunning/killing sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by tissue stress/quality indicators. *J Food Sci Technol*, 52(5),2585–2597.
- Zhang, J. f., Liu, H., Sun, Y. Y., Wang, X. R., Wu, J. C. and Xue, Y. Q., 2005. Responses of the antioxidant defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 185–190.
- Zhang, L., Li, Q., Lyu, J., Kong, C., Song, S. and Luo, Y., 2017. The impact of stunning methods on stress conditions and quality of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillets stored at 4 degrees C during 72 h postmortem. *Food Chemistry*, 216, 130–137.
- Zhang, X. D., Wu T. X., Cai, L.S. and Zhu, Y. F., 2007. Effects of alpha-tocopheryl acetate supplementation in preslaughter diet on antioxidant enzyme activities and fillet quality of commercial-size *Sparus macrocephalus*. *J Zhejiang Univ Sci B.*, 8(9),680-685.
- Zhang, Z., Lin, S., Xue, J., Shen, Q., Feng, J., Jin, R. and Dai, Z., 2016. The characterization of myoglobin and myoglobin-induced lipid oxidation in frigate mackerel. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(6), 1438-1447.

ÖZGEÇMİŞ

10.10.1986 Batman’da doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi Batman’da okudu. 2011 yılında girdiği Gümüşhane Üniversitesini Gıda Mühendisliği Fakültesinden 2012 yılında yatay geçiş yaparak Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümüne gelerek 2015 yılında mezun olup, aynı yıl Atatürk Üniversitesi Merkezi Yemekhanesinde (MEDİKO) çalışmaya başladı. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı’nda 2017 yılında yüksek lisans eğitimine başladı.

