T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEZBAHA ATIKLARININ AKCİĞER DOKULARINDAN KİMYASAL VE ENZİMATİK YÖNTEMLERLE PROTEİN HİDROLİZAT ÜRETİMİ

MEHMET AKINCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. İLKER DIBIRDIK

EDİRNE-2022

MEHMET AKINCI'NIN hazırladığı "**MEZBAHA ATIKLARININ AKCİĞER DOKULARINDAN KİMYASAL VE ENZİMATİK YÖNTEMLERLE PROTEİN HİDROLİZAT ÜRETİMİ**" başlıklı bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir **Yüksek lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Prof. Dr. İlker DIBIRDIK	……
Prof. Dr. Üçler KISA	……
Dr. Öğr. Üyesi Sergun DAYAN	……

Tez Savunma Tarihi:
28/07/2022

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

İmza

Prof. Dr. İlker DIBIRDIK
Tez Danışmanı ……

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

…….

Prof. Dr. Hüseyin Rıza Ferhat KARABULUT
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tüm verilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini, kullanılan verilerde tahrifat yapılmadığını, tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını, kullanılan tüm literatür bilgilerinin bilimsel normlara uygun bir şekilde kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını ve bu tezin tamamı ya da herhangi bir bölümünün daha önceden Trakya Üniversitesi ya da farklı bir üniversitede tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

28/ 07 /2022

MEHMET AKINCI

Yüksek Lisans Tezi

Mezbaha Atıklarının Akciğer Dokularından Kimyasal ve Enzimatik Yöntemlerle Protein Hidrolizat Üretimi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, çevre kirliliğine neden olan mezbaha artıkları arasında yer alan akciğer dokusundan maksimum hidroliz derecesine sahip, çevre kirliliği sorununa ekolojik çözüm oluşturacak ve ekonomik değere sahip protein hidrolizatları elde etmek amaçlanmaktadır. Protein hidroliz prosesinde genellikle asidik, alkali ve enzimatik hidroliz yöntemleri kullanılmaktadır. Enzimatik hidroliz yöntemleri biyolojik olarak en aktif hidrolizatların üretildiği ve endüstride sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Fakat bu yöntemin dezavantajın düşük hidroliz derecesine sahip hidrolizatların üretimidir. Biyolojik olarak aktif ve yüksek hidroliz derecesine sahip hidrolizat üretimi için kimyasal ve enzimatik yöntemlerin kombine edilmesi planlanmıştır.

Bu plan doğrultusunda ön hidroliz için asidik ve alkali hidroliz yöntemleri araştırılmıştır. Ön hidroliz için kullanılan asidik ve alkali hidroliz Merkezi Kompozit Deney Tasarım ve Box-Benhken Deney Tasarım modelleri ile optimizasyonu çalışılmış ve Merkezi Kompozit Deney Tasarım modeli ile oluşturulan asidik hidroliz prosesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hidroliz derecesinin maksumum olduğu koşullar, sıcaklık faktörü için 90°C, ajan konsantrasyon faktörü için 1 M H_2SO_4, süre faktörü için ise 8 saat olarak belirlenmiştir. Ön hidroliz koşulları optimizasyonundan sonra ön hidrolizli enzimatik hidroliz ve karşılaştırmak için enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiş ve bu işlemlerden elde edilen hidrolizatlar, hidroliz dereceleri, kuru madde, organik madde, kül ve protein miktarları ve protein verimi açısından karşılaştırılmıştır.

Enzimatik hidroliz sonucu %15.98 hidroliz derecesi, 57.14 g/L protein, %6.37 kuru madde, %6.02 organik madde, %0.33 kül ve %48.01 proetin verimi elde edilmiştir. Ön hidroliz optimizasyondan elde edilen 90°C'de 1 M H_2SO_4 ile 8 saat koşulların da

akciğer dokusu kimyasal olarak hidroliz edilmiştir. Kimyasal hidroliz sonucunda %94 hidroliz derecesi, 102.26 g/L protein, %16.87 kuru madde, % 16.50 organik madde, %0.37 kül ve %85.93 protein verimi elde edilmiştir. Ön hidroliz için optimizasyondan elde edilen 90°C'de 1 M H_2SO_4 ile 8 saat koşulların da akciğer dokusu kimyasal olarak hidroliz edilmiş ve enzimatik hidroliz için akciğer dokusu pH 6.5'te, 65 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ön hidrolizli enzimatik hidroliz sonucunda %94.73 hidroliz derecesi, 103.34 g/L protein %16.74 kuru madde, %16.46 organik madde. %0.27 kül ve %86.83 protein verimi elde edilmiştir. Sonuç olarak, bu tez kapsamında 90°C sıcaklıkta, 8 saat süre ile 1 M H_2SO_4 konsantrasyonunda optimize edilen asidik hidroliz prosesi, enzimatik hidroliz yönteminin dezavantajı olan düşük hidroliz derecesini iyileştirerek, yüksek hidroliz derecesine sahip akciğer protein hidrolizatı eldesini sağlamıştır.

Yıl : 2022

Sayfa Sayısı : 109

Anahtar Kelimeler : Akciğer, protein hidrolizatı, yanıt yüzey metodu, optimizasyon, kimyasal hidroliz, enzimatik hidroliz.

Master Thesis

Protein Hydrolyzate Production From Lung Tissues Of Slaughterhouse Waste By Chemical and Enzymatic Methods

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biotechnology and Genetic Department

ABSTRACT

In this study, it is aimed to obtain protein hydrolysates from the lung tissue, which is among the slaughterhouse wastes that cause environmental pollution, with the maximum hydrolysis degree, which will create an ecological solution to the environmental pollution problem and have economic value. Acidic, alkaline and enzymatic hydrolysis methods are generally used in the protein hydrolysis process. Enzymatic hydrolysis methods are a method that produces the most biologically active hydrolysates and is frequently used in industry. However, the disadvantage of this method is the production of hydrolysates with a low degree of hydrolysis. It is planned to combine chemical and enzymatic methods for the production of biologically active hydrolyzate with a high degree of hydrolysis.

In line with this plan, acidic and alkaline hydrolysis methods were investigated for preliminary hydrolysis. Optimization of the acidic and alkaline hydrolysis Central Composite Experiment Design and Box-Benhken Experiment Design models used for preliminary hydrolysis was studied and the acidic hydrolysis process created with the Central Composite Experiment Design model was found to be statistically significant. The conditions where the degree of hydrolysis is maximum were determined as 90°C for the temperature factor, 1 M H_2SO_4 for the agent concentration factor, and 8 hours for the time factor. After the pre-hydrolysis conditions were optimized, pre-hydrolysis enzymatic hydrolysis was performed and the hydrolysates obtained from these processes were compared in terms of hydrolysis degrees, dry matter, organic matter, ash and protein amounts and protein yield.

As a result of enzymatic hydrolysis, 15.98% hydrolysis degree, 57.14 g/L protein, 6.37% dry matter, 6.02% organic matter, 0.33% ash and 48.01% protein yield were obtained. The lung tissue was chemically hydrolyzed with 1 M H_2SO_4 at 90°C, obtained from the pre-hydrolysis optimization, in 8 hours. As a result of chemical hydrolysis, 94% hydrolysis degree, 102.26 g/L protein, 16.87% dry matter, 16.50% organic matter, 0.37% ash and 85.93% protein yield were obtained. The lung tissue was chemically hydrolyzed at 90°C with 1 M H_2SO_4 obtained from optimization for pre-hydrolysis for 8 hours, and for enzymatic hydrolysis, the lung tissue was incubated at pH 6.5 at 65 °C for 24 hours. As a result of pre-hydrolysis enzymatic hydrolysis, hydrolysis degree of 94.73%, 103.34 g/L protein 16.74% dry matter, 16.46% organic matter. 0.27% ash and 86.83% protein yield were obtained. As a result, within the scope of this thesis, the acidic hydrolysis process, which was optimized at 90°C and 1 M H_2SO_4 concentration for 8 hours, improved the low hydrolysis degree, which is the disadvantage of the enzymatic hydrolysis method, and provided lung protein hydrolyzate with a high hydrolysis degree.

Year : 2022

Number of Pages : 109

Keywords : Lung, protein hydrolyzate, response surface method, optimization, chemical hydrolysis, enzymatic hydrolysis.

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanma, çalışmalarımın yönlendirilmesi ve sonuçlandırılmasında, büyük emeği geçen, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, bilimsel fikirleri ve görüşleri ile şahsıma vizyon kazandıran çok değerli bilim insanı ve tez danışmanım Prof. Dr. İlker DIBIRDIK'a, çalışmaların boyunca desteğini benden esirgemeyen çok değerli hocam Dr. Sergun DAYAN'a, destekleri ve yardımları ile sürekli yanımda olan, bu zorlu süreçte anlayış, ilgi, saygı ve sevgisini esirgemeyen sevgili eşim Hülya, sevgili kardeşlerim Merve, Hüda, Burak, Alperen ve Melih Erdem'e annem Hatice ve babam Rıdvan'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2 4
GENEL BİLGİLER 4
2.1. Protein Hidrolizatlarının Sınıflandırılması ve Karekterizasyonu 4
2.2. Protein Hidrolizatlarının Bitkiler Üzerindeki Etkisi 9
2.2.1 Protein Hidrolizatlarının Bitki Primer Metabolizmasına Etkisi 11
2.2.2 Protein Hidrolizatlarının Bitki Sekonder Metabolizmasına Etkisi 12
2.2.3 Protein Hidrolizatlarının Bitki Büyüme, Çiçeklenme ve Verim Üzerine Etkisi 14
2.2.4 Protein Hidrolizatları ve Abiyotik Stres Toleransı 17
2.3 Protein Hidrolizatlarının Farmasötik Etkisi 20
2.3.1 Protein Hidrolizatlarının Antioksidan Etkileri 20
2.3.2 Protein Hidrolizatların Antimikrobiyal Etkileri 21
2.3.3 Protein Hidrolizatlarının Antihipertansif Etkileri 22
2.3.4 Protein Hidrolizatlarının Antikanser Etkileri 23
2.3.5 Protein Hidrolizatlarının Antidiyabetik Etkileri 23
2.3.6 Protein Hidrolizatlarının Antilipidemik Etkileri 24
2.4 Protein Hidroliz Prosesi 25
2.4.1 Substrat Seçimi 25
2.4.2 Hidroliz Yöntemleri 28
2.4.3 Optimizasyon 32
BÖLÜM 3 45
MATERYAL VE YÖNTEM 45

3.1 Materyal 45
3.1.1 Materyalin Temini 45
3.1.2 Kimyasal Maddeler 45
3.1.3 Kullanılan Malzemeler 45
3.1.4 Araç ve Gereçler 46
3.2 Yöntem 46
3.2.1 Enzimatik Hidroliz 46
3.2.2 Ön Hidroliz Deney Tasarımı 47
3.2.3 Asidik ve Alkali Bazlı Ön Hidroliz ve Optimizasyonu 49
3.2.4 Ön Hidrolizden Sonra Enzimatik Hidroliz 50
3.2.5 Kuru Madde 51
3.2.9 Akciğer Dokusu Protein Miktarının Belirlenmesi 52
3.2.12 Protein Verimi 53
BÖLÜM 4 54
BULGULAR VE TARTIŞMA 54
4.1. Protein Standart Grafiği 54
4.2. Enzimatik Hidroliz 54
4.3. Ön Hidroliz Optimizasyonu 55
4.4. Ön hidrolizli Enzimatik Hidroliz 67
4.5. Protein Verimi 67
4.6. Enzimatik ve Ön hidrolizli Enzimatik Hidroliz ve Ön Hidroliz ile elde Edilen Hidrolizatların Karşılaştırılması 68
BÖLÜM 5 72
SONUÇ VE ÖNERİLER 72
KAYNAKLAR 76
ÖZGEÇMİŞ 95

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 protein hidrolizatlarının sınıflandırılması 5
Şekil 2.2 Papain enziminin amino asit sekansı 32
Şekil 2.3 Bir kerede bir faktöriyel deney tasarımı 34
Şekil 2.4 CCD üç boyutlu gösterimi 36
Şekil 2.5 BBD üç boyutlu gösterimi 38
Şekil 2.6 Yanıt yüzey yönteminide kullanılan modellerin gösterimi 42
Şekil 3.1 Yöntem akış şeması 47
Şekil 3.2 Akciğerlerin parçalanması 50
Şekil 3.3 Akciğerlerin hidroliz ajanları ile karıştırılması 50
Şekil 3.4 Hidroliz sonrası ipek elekten süzülme 51
Şekil 4.1 Protein standart grafiği 54
Şekil 4.2 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile konstrasyon ve sıcaklık değişimini gösteren kontür grafiği 60
Şekil 4.3 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile konstrasyon ve sıcaklık değişimini gösteren üç boyutlu grafik 61
Şekil 4.4 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile süre ve sıcaklık değişimini gösteren kontür grafiği 61
Şekil 4.5 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile süre ve sıcaklık değişimini gösteren üç boyutlu grafik 62
Şekil 4.6 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile süre ve konsantrasyon değişimini gösteren kontür grafiği 62
Şekil 4.7 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile süre ve konsantrasyon değişimini gösteren üç boyutlu grafik 63
Şekil 4.8 Yanıt yöntemi ile elde edilen ön hidroliz optimizasyon kombinasyonları 66
Şekil 4.9 Hidroliz derecesi sonuçlarına ait boxplot gösterimi 69
Şekil 4.10 Protein miktarlarına sonuçlarına ait boxplot gösterimi 69
Şekil 4.11 Kuru madde miktarları sonuçlarına ait boxplot gösterimi 70
Şekil 4.12 Organik madde miktarı sonuçlarına ait boxplot gösterimi 70
Şekil 4.13 Kül miktarı sonuçlarına ait boxplot gösterimi 71
Şekil 4.14 Hidrolizatların protein verimlerine ait boxplot gösterimi 71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Protein hidrolizi için kullanılan enzimler 8
Çizelge 2.2 Büyükbaş ve küçükbaş karkas ve artık miktarları 26
Çizelge 2.3 2010 yılında Edirne mezbahanelerinde hayvan kesim adetleri..... 28
Çizelge 2.4 Merkezi kompozit deney tasarımı..... 37
Çizelge 2.5 Box-Benhken deney yasarımı 39
Çizelge 2.6 Yanıt yüzey yöntemi için örnek bir ANOVA çizelgesi 40
Çizelge 2.7 Örnek model özeti çizelgesi..... 43
Çizelge 3.1 CCD ve BBD dizaynı için bağımsız değişken ve kodlanmış düzeyler..... 48
Çizelge 3.2 Bağımsız değişkenler X_1 (sıcaklık (°C)), X_2 (konsantrasyon (M)), X_3 (süre (saat)) ve kodlu değişkenler (X_1,X_2,X_3) için, CCD dizaynı 48
Çizelge 3.3 Bağımsız X_1 (sıcaklık (°C)), X_2 (konsantrasyon (M)), X_3 (süre (saat)) ve kodlu değişkenler (X_1,X_2,X_3) için BBD dizaynı 49
Çizelge 4.1 CCD ile modellenmiş akciğer artıklarında alkali ve asidik hidroliz ile bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler yanıt değişkeni; CCD-Y_{Al} Alkali ön hidroliz derecesi (% HD), CCD-Y_{As}: Asidik ön hidroliz derecesi 56
Çizelge 4.2 KOH kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, ajan konstrasyonu, süreden etkilenen HD'nin CCD ile hesaplanan ANOVA çizelgesi 57
Çizelge 4.3 KOH kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, konstrasyon, süreden etkilenen HD'nin CCD ile hesaplanan R^2 ve düzeltilmiş R^2 çizelgesi 57
Çizelge 4.4 H_2SO_4 kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, konstrasyon, süreden etkilenen HD'nin CCD ile hesaplanan ANOVA çizelgesi 58
Çizelge 4.5 H_2SO_4 kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, konstrasyon, süreden etkilenen HD'nin CCD ile hesaplanan R^2 ve düzeltilmiş R^2 çizelgesi 59
Çizelge 4.6 Akciğer artıklarından H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidrolizasyonda HD için karşılık gelen tahmini değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen hidroliz dereceleri 59
Çizelge 4.7 BBD ile modellenmiş akciğer artıklarında alkali ve asidik hidroliz ile bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler yanıt değişkeni; BBD-Y_{Al} Alkali hidroliz derecesi, BBD-YAs: Asidik hidroliz derecesi 63
Çizelge 4.8 KOH kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, ajan konstrasyonu, süreden etkilenen HD'nin ANOVA çizelgesi (BBD) 64
Çizelge 4.9 KOH kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, ajan konstrasyonu, süreden etkilenen HD'nin CCD ile hesaplanan R^2 ve düzeltilmiş R^2 çizelgesi (BBD)..... 64

Çizelge 4.10 H_2SO_4 kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, konstrasyon, süreden etkilenen HD'nin ANOVA çizelgesi (BBD)... 65
Çizelge 4.11 H_2SO_4 kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, konstrasyon, süreden etkilenen HD'nin BBD ile hesaplanan R^2 ve düzeltilmiş R^2 çizelgesi (BBD) 65
Çizelge 4.12 CCD ve BBD ile tasarımı yapılmış optimizasyon deneylerinin karar çizelgesi 66
Çizelge 4.13 Akciğer artıklarında H_2SO_4 ile yapılan ön hidrolizasyon için optimumu koşullar, HD için tahmini değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlenen HD (%)... 66
Çizelge 4.14 Hidrolizatlara ait HD, protein miktarı, % kuru madde, % organik madde, % kül ve % verim sonuçları 68

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Amino asit ve peptitlerden oluşan protein hidrolizatları, organizmaların metabolizmalarına ve sağlığına pozitif etki eden biyopeptit fragmentleri olarak tanımlanmaktadır (Shahidi & Zhong, 2008; Sharma, Singh, & Rana, 2011). Bu biyopeptit fragmentleri, yapısında bulunduğu proteinlerin içerisinde inaktif durumdadır (Meisel & Bockelmann, 1999). Proteinlerin çeşitli hidroliz yöntemleri kullanılarak içerisinde bulunan biyoaktif amino asitler ve peptitler ortaya çıkarılmaktadır. Proteinlerin hidrolizi için tercih edilen yöntemler, protein kaynakların fiziksel ve kimyasal yapısına bağlıdır. Örneğin keratin yapısına sahip tüyler, kıllar, boynuzlar, gagalar veya yünler gibi protein kaynaklarının hidrolizi oldukça zordur. Bu nedenle genellikle asidik veya alkali hidroliz ile veya bakteriyel keratinazlar kullanılarak hidrolize edilebilir (Pasupuleti & Braun, 2008). Proteinlerin hidrolizinde genellikle asit, alkali ve enzim ajanları kullanılmaktadır. Asidik hidroliz üretim prosesinde, protein kaynakların hidroliz ortamına belirli oranlar da kuvvetli asitlerin (hidroklorik asit ve sülfürik asit gibi) eklenmesi, yüksek sıcaklık ve basınç altında peptit bağlarının kırılması prensibine dayanmaktadır (Bouhamed & Kechaou, 2017; Gezgin, Karakus, & Bulbul, 2020; Hou, Wu, Dai, Wang, & Wu, 2017). Alkali hidroliz üretim prosesinde ise kalsiyum hidroksit ($CaOH_2$), potasyum hidroksit (KOH) ve sodyum hidroksit (NaOH) gibi ajanlar kullanılarak alkali ortamda protein kaynaklarında bulunan peptit bağlarının yüksek sıcaklıkta (70-80 ^{o}C) parçalanması esasına dayanır. Alkali ajanlar peptit bağlarına su molekülü ekleyerek parçalar (Hou vd., 2017)

Enzimatik hidroliz üretim prosesinde proteinlerin kontrollü şartlar altında proteazlar tarafından parçalanması prensibine dayanmaktadır. Protein hidrolizatlarının üretiminde kullanılan enzimler pankreatin, tripsin, pepsin, karboksilpeptidazlar ve aminopeptidazlar gibi hayvansal, papain ve bromelain gibi bitkisel ve alkalaz ve flavourzyme gibi mikrobiyal kaynaklı olabilmektedir (Colla vd., 2015).

Protein hidrolizatları bitkiler ve insanların metabolik faaliyetlerine olumlu yönde katkı sağlamaktadır. Protein hidrolizalarının bitkilerde azot metabolizmasını ve asimilasyonunu uyararak (Baglieri vd., 2014; Calvo, Nelson, & Kloepper, 2014; Ertani vd., 2009; Ertani, Schiavon, Muscolo, & Nardi, 2013), karbon metabolizmasında görev alan malat dehidrojenaz, izositrat dehidrojenaz, sitrat sentaz (Schiavon, Ertani, & Nardi, 2008) ve azot redüksiyonunda ve asimilasyonunda görev alan nitrat redüktaz, nitrit redüktaz, glutamin sentetaz, glutamat sentaz, aspartat aminotransferaz enzimlerinin aktivitesi (Maini, 2006; Schiavon vd., 2008) artırmaktadır. Ayrıca protein hidrolizatlarının bitkiye yapraktan ve köklerden uygulanması, makro ve mikro besin elementlerinin alınmasını, su ve besinlerin daha iyi kullanılmasını sağlamaktadır (Cerdán, Sánchez, Oliver, Juárez, & Andreu, 2008; Ertani vd., 2009; Halpern vd., 2015). Bitkilerin primer metabolizmasına bu etkilerinden dolayı protein hidrolizat uygulamaları, çeşitli bahçe bitkilerinde vejetatif büyümeyi teşvik ederek mahsul verimliliğinin arttırmaktadır (Halpern vd., 2015).Ayrıca bitkilere uygulanan protein hidrolizatlarının bitkilerde sekonder metabolizmayı indükleyerek, bitkinin savunma mekanizmasını arttırmasına, tuzluluk, kuraklık, sıcaklık ve oksidatif koşullar gibi stres koşullarına karşı dayanıklılık teşvikini sağlamaktadır (Apone vd., 2010; Ertani vd., 2013; Kauffman, Kneivel, & Watschke, 2007). Protein hidrolizatlarının bitkiler üzerindeki bu etkileri yanında antioksidan (Je, Park, & Kim, 2005), antimikrobiyal (Przybylski, Firdaous, Châtaigné, Dhulster, & Nedjar, 2016), antihipertansif (Kim, Ngo, & Vo, 2012), antikanser (Cicero, Fogacci, & Colletti, 2017; Su vd., 2014), antidiyabetik (Hall, Johnson, & Liceaga, 2018) gibi farmasötik etkileri de bulunmaktadır.

Protein içerikli artıkların oluşturdukları çevre kirliliğine karşı ekolojik bir çözüm olması ve protein hidrolizatlarının organizmalar üzerinde pozitif etkilerinden dolayı araştırmacıların protein hidrolizatı üretim yöntemlerine ilgisini arttırmıştır (Suhag, 2016; Xu & Geelen, 2018). Protein hidroliz prosesi temel olarak, substrat seçimi, hidroliz yöntemi seçimi, hidrolizasyon şartlarının optimizasyonu, hidroliz, filtrasyon, yoğunlaştırma ve ürün paket aşamalarından oluşmaktadır (Pasupuleti, Holmes, & Demain, 2008).

Bu çalışmada, Trakya bölgemizde bulunan mezbaha faaliyetlerinden dolayı ortaya çıkan hayvansal artıkların oluşturduğu çevre sorunlarının önüne geçilmesi amacıyla, bu artıklar arasında yer alan akciğer dokusunun hem fiziksel hemde kimyasal özelliklerinden

dolayı katma değeri yüksek, antioksidan ve anti inflamatuar özellikleri olan ancak literatürde üretim proseslerinin bilgi eksikliği olması nedeniyle akciğer dokusu araştırma materyali olarak seçilmiştir. Papain enzimi yapısının iyi bilinmesi, yüksek sıcaklılarda stabil kalması, pH 3-9'da çalışabilmesi ve proteinlere, kısa zincirli peptidlere ve amid bağlantılarına karşı kapsamlı proteolitik aktivite göstermesi nedeniyle akciğerin enzimatik hidrolizi için kullanılması uygun görülmüştür. Akciğerin papain ile hidroliz edilmesi ile elde edilen hidrolizatları düşük hidroliz derecesine sahiptir (Lafarga & Hayes, 2017). Maksimum hidroliz derecesini elde etmek için asidik ve alkali ön hidroliz yapılması planlanmıştır. En ideal ön hidroliz koşulları yanıt yüzey yöntemleri kullanılarak oluşturulan deney tasarımlarına göre optimize edilmeye çalışılmıştır. Optimizasyonda kullanılan bu yöntem, belirlenen parametrelerle, yüksek hidroliz derecesine sahip ürün özelliği arasındaki ilişki regrasyon denklemiyle bir model oluşturmaktadır (Cho vd., 2004). Optimizasyonda kullanılan yanıt yüzey yöntemlerinin en büyük avantajı, birçok bağımsız değişken faktörü ve bu faktörler aralarındaki ilişkiyi değerlendirmek için gerekli olan deney sayısını en aza indirmesidir (Korkmaz, 2018). Optimum koşullar belirlendikten sonra elde edilen protein hidrolizatı enzimatik hidrolize tabii tutulmuştur. Enzimatik hidroliz, ön hidroliz ve ön hidrolizli enzimatik hidroliz prosesinden elde edilen protein hidrolizatları kuru madde, organik madde, kül, hidroliz derecesi ve protein miktarları bakımından karşılaştırılmıştır.

Bu çalışmanın nihai hedefi, protein hidroliz proseslerini inceleyerek, çevre kirliliğine neden olan mezbaha artıkları arasında yer alan akciğer dokusunundan maksimum hidroliz derecesine sahip, çevre kirliliği sorununa ekolojik çözüm oluşturacak ve ekonomik değere sahip protein hidrolizatları elde etmektir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

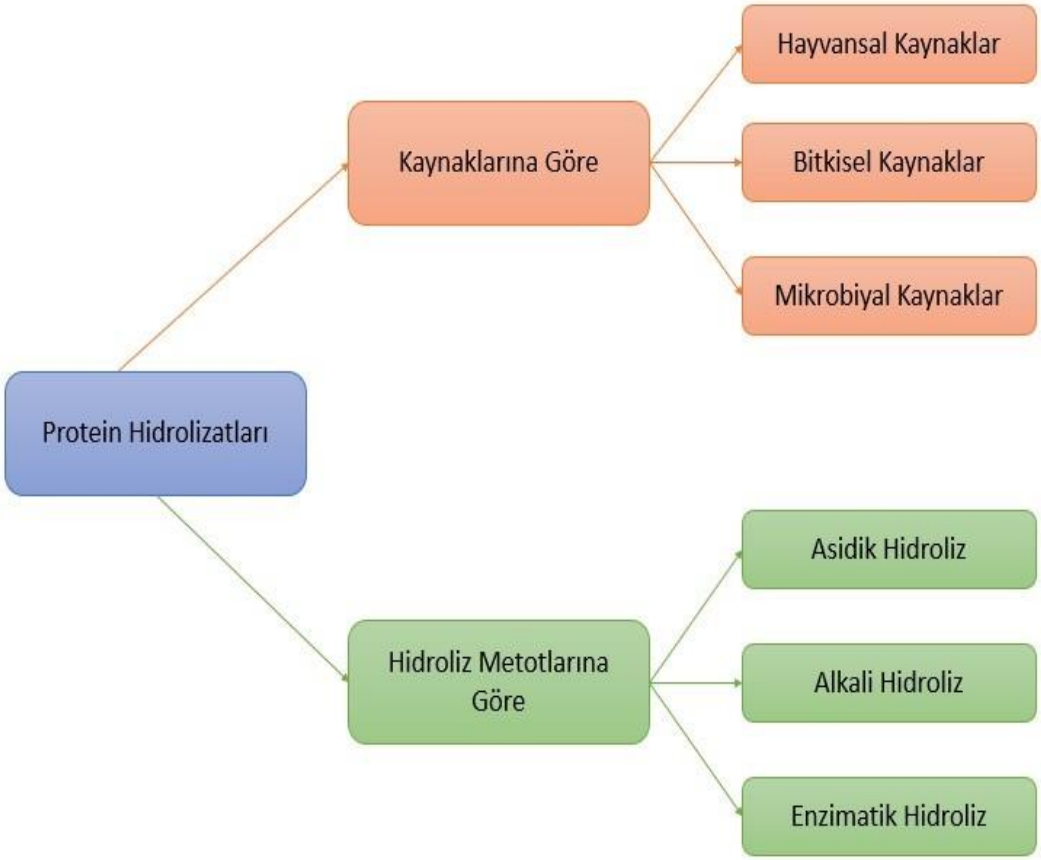
Organik maddelerde bulunan amino asitler, peptitler ve proteinler, protein biyosentezi için gerekli ham maddelerin karşılanmasında, enerji kaynağı olmasında ve organizmada birçok olayın düzenlenmesinde görev alması nedeniyle canlılar için çok önemlidir (Dziuba & Dziuba, 2014; Walther & Sieber, 2011). Amino asit ve peptitlerden oluşan protein hidrolizatları, organizmaların metabolizmalarına ve sağlığına pozitif etki eden spesifik biyopeptit fragmentleri olarak tanımlanmaktadır (Shahidi & Zhong, 2008; Sharma vd., 2011).

Bu spesifik biyopeptit fragmentleri proteinlerin içinde inaktif durumdadır (Meisel & Bockelmann, 1999) ve proteinlerin çeşitli yollar ile parçalanması sonucunda ortaya çıkmaktadır. 4442 farklı biyopeptit fragmenti Biopep-UWN adlı veri tabanında kayıt altına alınmıştır (Katedra, 2022).

Protein hidrolizatları amino asitlerin peptit bağları ile bağlanması sonucu oluşmaktadır. Peptit fragmentleri genellikle 2-20 amino asitlik reziduelerden oluşmaktadır (Möller, Scholz-Ahrens, Roos, & Schrezenmeir, 2008). Bu biyopeptit fragmentler peptidaz enzimleri ile parçalanmaya karşı direnç göstermektedir (Kitts & Weiler, 2003). Buna karşılık proteinler polipeptitlerden oluşmuş yüksek molekül ağırlığına sahip moleküllerdir (Sharma vd., 2011).

2.1.Protein Hidrolizatlarının Sınıflandırılması ve Karekterizasyonu

Protein hidrolizalatları protein kaynakları ve hidroliz metodları olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Protein hidrolizatlarının sınıflandırılması.

Protein kaynakları bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal olarak üçe ayrılmaktadır. Günümüzde inek sütü (Korhonen, 2009; Léonil, 2014; Cordoba & Cordova, 2005), peynir (Pritchard, Phillips, & Kailasapathy, 2010) ve süt ürünleri (Choi, Sabikhi, Hassan, & Anand, 2012) en büyük hayvansal menşeili protein ve peptit kaynaklarıdır. Ayrıca hayvansal menşeili protein ve peptitler et, yumurta, ton balığı, sardalya, ringa balığı ve somon gibi çeşitli balık türleri gibi diğer hayvan kaynaklarından da elde edilebilirler.

Buğday (Kumagai, 2010), mısır, soya fasulyesi (Singh, Vij, & Hati, 2014), pirinç (Selamassakul, Laohakunjit, Kerdchoechuen, & Ratanakhanokchai, 2016), mantarlar, kabak, sorgum (Möller vd., 2008) gibi mahsüller bitkisel menşeili protein ve peptit kaynakları olarak değerlendirilebilir.

Bununla birlikte, endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanan sığır kanı (Przybylski vd., 2016), jelatin (Lassoued vd., 2015) , mezbaha artıkları, boynuz, kıl, yün, deri artıkları ve tavuk tüyü gibi hayvansal menşeili artıklardan (Drobek, Frąc, & Cybulska, 2019) veya mısır, buğday, susam tohum artıkları ve algler gibi bitki menşeili (Calvo vd., 2014) veya

mikrobiyal kökenli proteinlerden (Suman, Nupur, Anuradha, & Pradeep, 2015) de protein hidrolizatları elde edilebilmektedir.

Proteinlerin hidrolizi için tercih edilen yöntemler, protein kaynakların fiziksel ve kimyasal yapısına bağlıdır. Örneğin keratin yapısına sahip tüyler, kıllar, boynuzlar, gagalar veya yünler gibi protein kaynaklarının hidrolizi oldukça zordur. Bu nedenle genellikle asidik veya alkali hidroliz ile veya bakteriyel keratinazlar kullanılarak hidrolize edilebilir (Pasupuleti & Braun, 2008). Bunun aksine, peynir altı suyu, bağırsak, et ve kemik unu, kan, gibi hayvansal ürünler veya soya, buğday, pirinç, bezelye ve pamuk tohumu gibi bitkisel bileşenler genellikle genel enzimatik olarak hidroliz edilebilir (Dieterich vd., 2014; Pasupuleti, Holmes, & Demain, 2008).

Üretim süreci ve protein kaynağı, elde edilen protein hidrolizatlarının kimyasal karekterizayonu belirlemektedir. Hayvansal menşeili proteinlerin hidrolizatlarının üretimi için genellikle asidik veya alkali hidroliz yöntemleri tercih edilmektedir.

Asidik üretim prosesinde, hidroliz ortamına belirli oranlar da kuvvetli asitlerin (hidroklorik asit ve sülfürik asit gibi) eklenmesi, yüksek sıcaklık ve basınç altında peptit bağlarının kırılması prensibine dayanmaktadır. (Bouhamed & Kechaou, 2017; Gezgin vd., 2020; Hou vd., 2017).

Proteinler, asit ile hidroliz edilmesi sonucunda aspartik asit, glutamik asit, prolin, glisin, alanin, lösin, fenilalanin, histidin ve arginin amino asitleri ortaya çıkmaktadır. Diğer amino asitler ise hidroliz sırasında dönüşümlerden geçerler. Asparjin ve glutamin, asidik hidroliz sırasında deaminasyona uğrayarak aspartik asit ve glutamik asit'e dönüşmektedir. Serin ve treonin amino asitleri %5-15 oranında kısmi olarak kaybolmaktadır. Sistein hidroliz sırasında kaybolabilir, metiyonin ise metiyonin sülfoksit ve metiyonin sülfona oksitlenebilir (Hou vd., 2017; Mustatea, Ungureanu, & Iorga, 2019).

Alkali hidroliz yönteminde ise $CaOH_2$, KOH ve NaOH gibi ajanlar kullanılarak alkali ortamda protein kaynaklarında bulunan peptit bağlarının yüksek sıcaklıkta (70-80 ^oC) parçalanması esasına dayanır. Alkali ajanlar peptit bağlarına su molekülü ekleyerek parçalar. Ancak alkali hidroliz sonucu üretilen hidrolazat içindeki amino asitlerden serin, arjinin, asparjin ve glutamin amino asitleri tamamen parçalanmış olur. (Hou vd., 2017).

Kimyasal hidrolizde kullanılan ajanlar, tüm peptid bağlarına saldırarak protein hidrolizine yol açtığından dolayı yüksek miktarda serbest amino asit elde edilebilmektedir. Kimyasal hidroliz reaksiyonundan sonra L formu ve D formu amino asitler oluşmaktadır. Canlılar için kullanışlı amino asitler L formu amino asitlerdir. D formu amino asitler ise biyolojik aktiviteleri düşüktür ve canlılar için toksik etki gösterebilmektedir (Luciano Cavani, Ciavatta, & Gessa, 2003; Lisiecka vd., 2011). Ayrıca kimyasal hidroliz ile elde edilen protein hidrolizalarında tuzluluk oranı yükselmektedir (Colla vd., 2015)

Enzimatik hidroliz proteinlerin kontrollü şartlar altında proteazlar tarafından parçalanması prensibine dayanmaktadır. Enzimler reaksiyon tipine göre ekzopeptidazlar ve endopeptidazlar olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Wu, 2013). Protein hidrolizatlarının üretiminde kullanılan enzimler hayvansal, bitkisel ve mikrobiyal kaynaklardan elde edilmektedir. Hayvansal kaynaklı enzimler, pankreatin, tripsin, pepsin, karboksilpeptidazlar ve aminopeptidazlardır. Bitkisel kaynaklı en çok kullanılan enzimler papain ve bromelain'dir. Bakteri ve mantar kaynaklarının enzimleri, geniş bir optimal sıcaklık, pH ve iyon konsantrasyonları spektrumuna sahip birçok proteaz türüdür. Mikrobiyal kaynaklı en çok kullanılan enzimler ise alkalaz ve flavourzyme'dir (Colla vd., 2015)

Proteinlerin hidrolizi, tek bir enzim (örneğin, tripsin) veya çoklu enzimler (örneğin, pronaz, pepsin ve prolidaz) karışımı ile gerçekleştirilebilmektedir (Kunst & Whitaker, 2003). Enzim seçimi, protein kaynağına ve hidroliz derecesine göre tercih edilmektedir. Örneğin, protein yüksek bir hidrofobik amino asit içeriğine sahipse, tercih edilen enzim, bu amino asitlerde oluşan peptit bağlarını parçalayan enzim olacaktır (Kim, Kawamura, & Lee, 2003).

Proteinlerin asit ve alkali hidrolizi ile karşılaştırıldığında, enzimatik hidrolizinin başlıca avantajları şunlardır:

(a) Sıcaklık ve pH gibi hidroliz koşulları herhangi bir amino asit kaybına neden olmaz;

(b) Proteazlar, peptit-bağ hidrolizinin derecesini kontrol etmek için daha spesifiktir.

(c) Kullanılan enzim, hidrolizden sonra kısa sürede uygulanan yüksek sıcaklık ile kolayca etkisizleştirilmektedir.

Proteinlerin enzimatik hidrolizinin dezavantajları ise nispeten yüksek maliyeti ve ham protein materyallerinde enzim inhibitörlerinin potansiyel varlığını içerir. Enzimatik hidrolizde kullanılan enzimler çizelge 2.1'de verilmiştir (Hou vd., 2017).

Çizelge 2.1 Protein hidrolizi için kullanılan enzimler.

Enzimlerin Sınıfları		**Enzim İsimleri**	**EC Numaraları**
Endopeptidazlar	Aspartat proteaz	Chymosin	3.4.23.4
		Pepsin A	3.4.23.4
	Sistein proteaz	Bromelain	3.4.22.4
		Cathepsin B	3.4.22.1
		Ficain	3.4.22.3
		Papain	3.4.22.2
	Metallo proteaz	Bacillolysin	3.4.24.28
		Thermolysin	3.4.24.27
	Serin proteaz	Chymotrypsin	3.4.21.1
		Subtilisin	3.4.21.14
		Trypsin	3.4.21.4
Eksopeptidazlar	Aminopeptidaz	Aminopeptidaz	3.4.11.1
		Aminopeptidaz Y	3.4.11.15
	Karboksipeptidaz	Karboksipeptidaz	3.4.16.1
		Glisin karboksipeptidaz	3.4.17.4
		Alanin karboksipeptidaz	3.4.17.8
		Alanin karboksipeptidaz	3.4.17.9
	Dipeptidaz	Dipeptidase 1	3.4.13.11
		Prolin dipeptidaz	3.4.13.9
		Prolil dipeptidaz	3.3.13.8

Protein hidrolizatları, %1 ile %85 arasında peptit fragmenti, %2-18 oranında ise serbest amino içermektedir. Hayvansal menşeili protein hidrolizatları bitkisel menşeili protein hidrolizatlarına göre daha fazla amino asit içermektedir. Kolajen bazlı protein hidrolizatları yüksek oranında glisin ve prolin amino asiti içerirken baklagil bazlı protein hidrolizatlarında ise aspartik asit ve glutamik asit yüksek oranda bulunmaktadır (Ertani vd., 2009). Benzer şekilde balık bazlı protein hidrolizatlarında aspartik asit ve glutamik asit yüksek oranda bulunmaktadır. Kazein bazlı protein hidrolizatı glutamik asit ve prolin bakımından zengindir. Bunların yanında kolajenden üretilmiş protein hidrolizatlarında standart proteinlerin dışında hidroksiprolin ve hidroksilizin de içermektedir (Chalamaiah, Dinesh Kumar, Hemalatha, & Jyothirmayi, 2012; Ertani vd., 2009; Ertani vd., 2013). Protein hidrolizatlarının ihtiva ettiği peptitlerin konsantrasyonu ve moleküler ağırlıkları

üretim prosesine bağlı olarak oldukça değişken olabilmektedir. Peptitlerin moleküler ağırlık dağılımı, birkaç yüz ile birkaç bin Dalton arasında değişebilir ve düşük moleküler ağırlığa sahip peptitlerin en yüksek bitki biyostimulantı etkisi bulunmaktadır (Colla vd., 2015).

Amino asitlerin ve peptitlerin yanı sıra, protein hidrolizatları biyolojik aktivitelerine katkı sağlayacak diğer bileşikleri de içermektedir. Bu bileşikler arasında yağlar, karbonhidratlar, fenoller, mineral maddeler ve diğer organik bileşikler bulunur. Örnek olarak yoncadan elde edilmiş protein hidrolizatlarında fitohormon olarak tanımlanan indoleasetik asit ve isopenteniladenozin tespit edilmiştir (Ertani vd., 2014).

Yoncadan üretilmiş protein hidrolizatlarda, bitki büyümesini teşvik eden yağlı bir alkol olan triakontanol molekülü tespit edilmiştir (Ertani vd., 2013). Ayrıca bitkisel menşeili protein hidrolizatları, enerji metabolizmasında, oksidatif stres savunmasında önemli görevler üstlenen karbonhidratlar ve fenoller içermektedir. Buna karşılık hayvansal menşeili protein hidrolizatlarında karbonhidratlar, fenoller ve fitohormonlar bulunmamaktadır (Colla vd., 2015).

Protein hidrolizatlarını oluşturan biyoaktif peptitler fragmentleri, ana proteinlerin yapısında inaktif durumda bulunurlar ve kimyasal veya proteolitik enzimlerle hidroliz sonucu serbest kalırlar. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarda protein hidrolizatları bitkilerin, ve insanların metabolik aktivitelerinde önemli görevler almaktadır (Ünal, Şener, & Cemek, 2018)

2.2.Protein Hidrolizatlarının Bitkiler Üzerindeki Etkisi

Bitkiler için geliştirilmiş preperatların, bitki üzerinde etkilerini gösterebilmeleri için bitki bünyesine giriş yolları oldukça önemlidir. Amino asitler ve küçük peptitler hem kökler hem de yapraklar tarafından alınmaktadır (Matsumiya & Kubo, 2011; Soldal & Nissen, 1978; Watson & Fowden, 1975). Protein hidrolizatları içerisinde ihtiva ettikleri amino asitler ve peptit fragmentleri nedeniyle mikroorganizmalar içinde besin kaynağı oluşturmaktadır. Bu sebeple amino asitlerin ve peptit fragmentlerinin bitkiler tarafından kullanılabilirliği toprakta bulunan mikroorganizmalarının aktivitelerine de bağlıdır. Toprak mikroorganizmalarının amino asitlerin tüketimini ölçen çalışmalarda, topraklarda

bulunan amino asitler için yarılanma ömürlerinin 1-6 saat olduğu tespit edilmiştir (Moe, 2013).

^{13}C-^{15}N işaretli amino asitler kullanılarak yapılan domates, buğday ve çim deneylerinde köklere uygulanan amino asitlerin %6-25'ni bitkiler tarafından alındığı, geri kalan amino asitlerin ise mikroorganizmalar tarafından metabolize edildiği tespit edilmiştir. Ayrıca bitkilerin kökleri ile aldıkları amino asitler bitki türü ve çeşidine, toprak koşullarına ve uygulanan amino asitlerin dozuna bağlı olarak değişmektedir (Moe, 2013).

Protein hidrolizatları, bitkilere yapraktan uygulanarak toprak mikroorganizmaları ile rekabeti arttırılabilir. Prolin, glutamik asit ve glisin amino asitleri çim bitkilerine yapraktan uygulanduktan 8 saat sonra yapılan analizlerde sırası ile %52, 51 ve 48 oranında absorbe edilmektedir (Stiegler, Richardson, Karcher, Roberts, & Norman, 2013).

Şeftali yaprağına alanin, glutamik asit, glisin ve lizin püskürtülmüş ve sırası ile %14, 10, 25 ve 26 oranında bitki tarafından absorbe edilmiştir (Umemiya & Furuya, 2001). Düşük molekül ağırlıklarına sahip amino asitler ve peptitler yaprakdan daha hızlı şekilde absorbe edilmektedir. Ayrıca arjinin ve lizin amino asitler, aynı moleküler ağırlığa sahip diğer amino asitlere göre yapraktan daha yüksek oranda absorbe edilmektedir (Colla vd., 2015).

Kökten veya yapraktan alınan amino asitler ve peptitler, hücreden hücreye ve ksilem- floem aracılığı ile uzak mesafelere taşınmaktadır. Lisin-histidin taşıyıcı ailesi, prolin taşıyıcı ailesi ve amino asit permeaz ailesi gibi integral membran protein sistemleri amino asitlerin kökler tarafından doğrudan alınımında önemli rol almaktadır (Tegeder, 2012).

Amino asitler ve peptitler bitki bünyesinde doğrudan protein ve diğer esansiyel azotlu metabolitlerin üretimi için organik azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (Rentsch, Schmidt, & Tegeder, 2007). Bu rollerinin yanında amino asitler ve peptitler sinyal molekülü olarak da görev almaktadır. Bitki bünyesine alındıktan sonra hücre zarındaki spesifik reseptörler ile etkileşime girerek morfo-fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere yol açmaktadır (Ryan, Pearce, Scheer, & Moura, 2002). Ayrıca mikroorganizmalar, proteinleri sindirebilmek için ortama proteazlar salgılayarak küçük peptit fragmentlerine ayırmaktadır. Bu peptit fragmentleri bitkiler için gelişim düzenleyici olarak etki

göstermektedir (Trouvelot vd., 2014). Tuscia Üniversitesindeki son araştırmalarda marul üzerinde bitkisel menşeili protein uygulamasının, azot fikse eden, fosfor çözen ve indolasetik asit üreten bakteriler gibi arzu edilen, doğal olarak oluşan mikroorganizmaları uyardığını göstermiştir. Tüm bu bulgular, protein hidrolizatların mikroorganizmalar tarafından işlenerek bitki gelişmesini uyaran biyostimulant gibi hareket edebileceğini göstermektedir (Colla vd., 2015).

2.2.1 Protein Hidrolizatlarının Bitki Primer Metabolizmasına Etkisi

Protein hidrolizalarının bitkilerde azot metabolizmasını ve asimilasyonunu uyardığı birçok makelede bildirilmiştir (Baglieri vd., 2014; Calvo vd., 2014; Ertani vd., 2009; Ertani vd., 2013). Azot asimilasyonu, bitki büyümesini ve gelişimini kontrol eden anahtar bir süreçtir. Bitkilerde inorganik azot organik formlara metabolize edilmeden önce amonyağa dönüşmektedir (Crawford, Lynch, Whipps, & Ousley, 1993; Hoff, Truong, & Caboche, 1994). Amonyak azotu, bitkilerde önemli azot taşıyıcıları olarak görev yapan glutamin, glutamat, asparajin ve aspartat amino asitlerine asimile edilmektedir. Protein hidrolizatı mısır bitkisine uygulandıktan sonra NAD bağımlı glutamat dehidrojenaz, nitrat redüktaz ve malat dehidrojenaz aktivitelerini arttırmaktadır (Maini, 2006). Ayrıca mısır bitkilerine uygulanan protein hidrolizatları glikoliz ve krebs döngüsü gibi farklı metabolik yolları da etkilemektedir (Ertani vd., 2009; Ertani vd., 2013).

Karbon metabolizmasında görev alan malat dehidrojenaz, izositrat dehidrojenaz, sitrat sentaz enzimleri ile azot redüksiyon ve asimilasyonunda görev alan nitrat redüktaz, nitrit redüktaz, glutamin sentetaz, glutamat sentaz, aspartat aminotransferaz yer alan enzimlerin aktivitesinin protein hidrolizat uygulaması ile uyarılabilmektedir (Planques vd., 2012; Schiavon vd., 2008) Krebs döngüsünde yer alan enzimlerin ifadesinden sorumlu olan genlere ait mRNA transkriptleri de protein hidrolizatı uygulaması sonucu artmaktadır. Protein hidrolizatları, enzim aktivitelerini düzenlediği gibi enzimlerin gen ifadesini de regüle etmektedir (Ertani vd., 2013).

Yüksek konsantrasyonlarda serbest amino asitler içeren protein hidrolizat uygulamaları floemde amino asit yüklenmesine yol açtığından dolayı köklerde nitrat alınımını baskılayarak nitrat redüksiyon oranını da azaltmaktadır. Bu inhibisyonun etkisi, nitrat konsantrasyonuna ve protein hidrolizatlarındaki amino asit tipine ve

konsantrasyonuna bağlıdır. Örneğin eksojen olarak uygulanan glutamin, arpa köklerinde nitrat ve amonyum taşıyıcı transkript azaltmaktadır (Fan, Weeks, Shen, & Miller, 2006; Miller, Fan, Shen, & Smith, 2008). Mikrobesin maddelerini içeren hayvansal menşeili protein hidrolizatı biber bitkisine yapraklarına uyguladıktan sonra köklerde nitrat alınımını ve azot asimilasyonun azaldığını gözlemlenmiştir (Ruiz, Castilla, & Romero, 2000). Tüm bu veriler, amino asitlerin köklerde azot alınmasınında sinyal ve düzenleyici olduğunu belirtmektedir

Protein hidrolizatları bitkiye yapraktan ve köklerden uygulanması, makro ve mikro besin elementlerinin alınmasını, su ve besinlerin daha iyi kullanılmasını sağlamaktadır (Cerdán vd., 2008; Ertani vd., 2009; Halpern vd., 2015). Protein hidrolizatlarının bu etkileri aşağıdaki nedenler ile bağdaştırılmıştır (Cerdán vd., 2008; Colla, Rouphael, Canaguier, Svecova, & Cardarelli, 2014; Ertani vd., 2009; Martínez vd., 2010; Lucini vd., 2015):

a) Topraktaki mikrobiyal ve enzimatik aktivitenin artması
b) Özellikle Fe, Zn, Mn ve Cu gibi mikroelementlerin çözünürlüğünü ve hareketliliğinin sağlanması
c) Bitkinin özellikle kök uzunluğu, yoğunluğu ve lateral kök sayısının artması
d) Nitrat redüktaz, glutamin sentetaz ve demir (III) şelat redüktaz aktivitelerindeki artış

2.2.2 Protein Hidrolizatlarının Bitki Sekonder Metabolizmasına Etkisi

Bitkinin büyüme ve gelişmede doğrudan etkili olmayan organik bileşiklerin sentezlendiği proses sekonder metabolizma, sentezlenen bileşiklere ise sekonder metabolitler olarak tanımlanmaktadır. Sekonder metabolitler bitkilerin biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklılık oluşturulmasunda ve yabancı otlara karşı allelopatik etki göstermesinden sorumludur. Sekonder metobolitler bunun yanı sıra endüstriyel alanlarda tekstil, kozmetik ve ilaç sanayisinde de kullanılmaktadır (Tiring, Satar, & Özkaya, 2020).

Protein hidrolizatlarının bitkilerde sekonder metabolizmayı indüklediği ve bitkinin savunma mekanizmasını arttırarak, tuzluluk, kuraklık, sıcaklık ve oksidatif koşullar gibi stres etmenlerine karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Apone vd., 2010; Ertani vd., 2013; Kauffman vd., 2007). Serbest amino asit, peptit ve şekerlerin bulunduğu bir

karşımı *Arabidopsis thaliana* bitkisinde uyguladıklarının oksidatif streste görevli olan komponentlerin gen ekspresyonunu indüklediğini gözlemlenmiştir (Apone vd., 2010).

Hidroponik ortamda tuz stresine maruz bırakılan mısır fidelerine uygulanan bitkisel menşeili protein hidrolizatı, bitkilerde flavonoidlerin sentezini ve birikimini arttırmaktadır (Ertani vd., 2013). Flavonoidlerin artması, fenil propanoid biyosentezinde yer alan fenilalanin amonyak liyaz (PAL) enziminin aktivitesi ile bağlantılır. Bu proteini kodlayan genlerin birçok bitki türünde bir dizi abiyotik ve biyotik strese karşı duyarlıdır (Huang, Jander, & de Vos, 2011) ve birçok biyostimulantlar tarafından indüklenebilir (Ertani, Francioso, Tugnoli, Righi, & Nardi, 2011; Schiavon vd., 2008).

Amino asit yapısındaki prolin, stres altında ozmotik düzenlemede rol aldığı gibi (Bayat, Kuşvuran, Ellialtıoğlu, & Üstün, 2014), prolin bağlantılı pentoz fosfas yolağının aktivitesini sağlayarak şikimat ve fenil propanoid yolaklarını stimule ederek fenolik bileşiklerin sentezlenmesini de sağlamaktadır (Shetty & McCue, 2003). Metabolik bir çalışmada, tuzlu koşullar altında yetiştirilen marul bitkilerinde uygulanan bitkisel menşeili protein hidrolizatı bitki bünyesinde terpenler ve glukosinolatlar gibi sekonder metabolitleri arttırmaktadır. Bu sekonder metabolitler marul bitkisinde savunma yollarını aktive eden sinyali modüle ederek tuzluluk toleransını geliştirilmesinde rol oynamaktadır (Lucini vd., 2015).

Resveratrol üzüm bitkisinin yaprak ve tane kabuğunda yüksek miktarda sentezlenen fitoaleksin özellik gösteren sekonder metabolittir. Bu sekonder metabolit, üzüm bitkisini hastalıklara karşı direncini arttırmaktadır (Keskin, Noyan, & Kunter, 2009). Üzüm bitkisine yapraktan uygulanan kazein ve soya fasulyesinden üretilen protein hidrolizatları, resveratrol biyosentezinde görevli olan stilben sentaz enziminin ifadesini düzenleyerek, bu sekonder metabolitin yaprakta birikimini teşvik etmektedir. Yaprakta biriken resveratrol, üzümlerde külleme hastalığının etmeni olan *Plasmopara viticola'ya* karşı bitkinin savunma mekanizmasını uyarmaktadır. Kazein ve soya fasulyesinden üretilen protein hidrolizatlarının sürdürülebilir modern bağcılıkta fungusit kullanımını azaltabileceğini öngörülmektedir (Lachhab vd., 2014).

2.2.3 Protein Hidrolizatlarının Bitki Büyüme, Çiçeklenme ve Verim Üzerine Etkisi

Protein hidrolizatlarının bitkiler üzerindeki diğer etkisi ise, üretimi yapılan bahçe çeşitli bahçe bitkilerinde vejatatif büyümeyi, makro ve mikro besin alınımını teşvik ederek mahsül verimliliğini arttırmaktadır (Halpern vd., 2015). Papaya bitkisine uygulanan hayvansal menşeili protein hidrolizatı, uygulama yapılmamış bitkilere göre pazarlanabilir meyve sayısı verimini % 22 oranında arttırmaktadır. Bu durum protein hidrolizatlarının meyve tutumunu artırarak piyasaya arz edilen meyve sayılarının yükselmesine bağlanmaktadır (Payan & Stall, 2003).

Bununla birlikte, yukarıda bahsedilen protein hidrolizatlarının olumlu etkisi genel değildir. Ispanak ve hindibada yapılan denemelerde protein hidrolizatı uygulanmış bitkiler ile kontrol kıyaslandığında anlamlı bir verim artışı kaydedilmemiştir (Wolska, Kowalczyk, Nowecka, Mazur, & Metera, 2012; Kunicki, Grabowska, Sękara, & Wojciechowska, 2010).

Çiçekli bitkiler ile ilgili yapılan bir çalışmada hayvansal ve bitkisel menşeili protein hidrolizatlarının zambak çiçeklerinin kalitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, ürün döngüsü uzunluğunun azaldığı, yaprak alanının, çiçek tomurcuklarının çapının ve kök sisteminin kontrol bitkileri ile kıyaslandığında arttığı tespit edilmiştir (De Lucia & Vecchietti, 2012).

Erkencilik ile ilgili yapılan bilimsel çalışmada, tavuk tüyünden elde edilmiş protein hidrolizatları muz bitkisine topraktan ve yapraktan uygulanmıştır. Uygulama yapılmış muz bitkilerinde, uygulama yapılmamış muz bitkilerine göre hasat zamanı 28 gün kısalmıştır. Tavuk tüyünden elde edilen protein hidrolizatı erkenciliğin yanında meyve salkımındaki tarak sayısını, taraktaki meyve sayısını ve salkım ağırlığını sırasıyla %10, 24, 26 oranında arttırmıştır. Ayrıca araştırmacılar protein hidrolizatlarının tarımda kimyasal gübre kullanımını azaltacağının ve kümes hayvancılık sektöründeki artıkların değerlendirilmesinde çevre dostu bir yol olacağının kanaatine varmışlardır (Payan & Stall, 2003).

Aminoasit ve peptit fragmentleri içeren protein hidrolizatları, bitkini biyokütlesinde artışa neden olmaktadır. Bu artış, yapraktaki azot miktarının

yükselmesinden dolayı uyarılan fotosentez mekanizması ve üretilen sentatlardan kaynaklanmaktadır. Ticari olarak üretilen protein hidrolizatının uygulandığı domates bitkisinde kök ve gövde biyokütlesini, klorofil içeriğini ve yaprakta bulunan azot içeriğini sırası ile % 20, 27, 15 ve 21 oranında arttırabilmektedir. Ayrıca protein hidrolizatı domates bitkisinde kuvvetli köklerin gelişimini teşvik ederek azot alınımının artışına ve alınan azotun efektif şekilde kullanılmasını da sağlamaktadır (Colla vd., 2014).

Yaprak klorofil miktarındaki azot ve asimilasyonundaki artış, protein hidrolizatlarının oksin benzeri etki gösterdiğine bağlanmaktadır (Nardi, Carletti, Pizzeghello, & Muscolo, 2009). Kökleri kesilmiş domates bitkilerine uygulanan protein hidrolizatları köklenme de oksin benzeri aktivide göstermektedir (Colla vd., 2014).

Protein hidroliz prosesinde kullanılan farklı protein kaynakları ve yöntemleri nedeniyle elde edilen hidrolizatlarda, çeşitli moleküler ağırlığa sahip peptit fragmentleri oraya çıkmaktadır. Peptit fragmentlerinin moleküler ağırlığındaki bu değişim, protein hidrolizatlarının bitkiler üzerindeki kullanım dozunu ve biyolojik etkilerini değiştirmektedir. Bununla ilgili yürütülen bilimsel bir çalışmada, hayvansal menşeili protein hidrolizalarına ait çeşitli peptit fragmentleri saksıda yetiştirilen kivi bitkisine farklı dozlarda yapraktan uygulanmıştır. Çalışma sonucunda düşük moleküler ağırlığa sahip (1-3 kDa) peptit fragmentleri düşük konsantrasyonlarda bitkilerde gövde ve köklerin büyümesini arttırmıştır. Yüksek moleküler ağırlığa sahip (3-10 ve >10 kDa) peptit fragmentleri ise yüksek konsantrasyonlarda sadece gövde büyümesini arttırmıştır (Qurartieri, Lucchi, & Cavani, 2002). Giberellinler bitkilerde gövde uzamasından sorumlu olan bitki hormonudur. Protein hidrolizatları giberellin benzeri aktivite de göstermektedir. Giberellin üretimi yapamayan cüce bezelye bitkilerine uygulanan protein hidrolizatları bitki gövdesinin uzamasını teşvik edebilmektedir (L Cavani & Ciavatta, 2007). Bu veriler düşük molekül ağırlığa sahip amino asit ve peptitlerin bitkiler tarafından kolayca emildiğini, bitki bünyesinde sinyal molekülü olarak görev aldığını ve endojen fitohormon biyosentezini teşvik ettiğini göstermektedir (Colla vd., 2014).

Son yıllarda meyve ve sebzelerde bulunan fitokimyasal bileşikler, organizmaların sağlığına olumlu etkilerinden dolayı bilim adamları, gıda uzmanlar ve üreticiler arasında önemli bir ilgi oluşturmuştur (Gruda, 2009; Khanam, Oba, Yanase, & Murakami, 2012).

Fitokimyasallar, kardiyovasküler problemler, inme, artrit ve iltihaplı bağırsak hastalıkları gibi kronik hastalıkların zararlarını azaltan veya önleyen doğal antioksidan bileşiklerdir (Griep, Verschuren, Kromhout, Ocké, & Geleijnse, 2011; Slavin & Lloyd, 2012). Bu fitokimyasalların miktarı ve kalitesi bitki genotipine, yetiştirilme koşullarına ve tarım yönetimi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Rouphael vd., 2012; Rouphael, Schwarz, Krumbein, & Colla, 2010). Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda protein hidrolizatların bitkilere uygulanması sonucu bitkinin primer ve sekonder metabolizmasını değiştirerek karotonoidler, polifenoller ve flavonoidler gibi antioksidan bileşiklerin üretimi ve birikimin teşvik etmektedir (Ertani vd., 2014). Amino asit, peptit ve mineraller bakımından zengin olan tavuk tüyü protein hidrolizatı muz bitkisinde toplam fenolikler, flavonoidler ve antioksidant moleküllerin seviyesini arttırabilmektedir (Gurav & Jadhav, 2013). Aynı şekilde bitkisel menşeili protein hidrolizaları, kırmızı üzümlerde kalite parametreleri olan renk ve antosiyanin üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Kırmızı üzümlerin toplam fenolik bileşiklerini ve toplam antosiyanin değerlerinin arttırabilmektedir. Protein hidrolizatlarının bu etkileri sekonder metabolizmada özellikle fenilalanin amonyak yolağında yer alan komponentlerin gen ifadesinindeki artışla ilişkilendirilmektedir (Parrado vd., 2007).

Bitki bünyesindeki nitrat miktarı; bitkinin genetik yapısına, türüne, yetiştiricilik koşullarına, bitki kısımlarına, çevre faktörlerine ve uygulanan tarımsal yöntemlere göre değişmektedir. Sebzelerdeki nitrat oranı, bitkilerin topraktan kökleri vasıtasıyla alınan nitrat miktarına ve endojen nitrat redüktaz enzim aktivitesine bağlıdır (Ayaz & Yurttagül, 2006). Tarımsal verimi artırmak amacıyla toprağa uygulanan nitratlı gübreler ve endüstriyel faaliyetler sonucu çevreye yayılan nitratlı artıklar sebebiyle yetiştirilen bitkilerin nitratlarla kirlenmesine yol açmaktadır. Gerek ekimden önce ve gerekse daha sonraki aşamalarda ekili alanlara uygulanan sodyum, potasyum ve amonyum nitratlı yapay gübreler ile endüstriyel etkinlikler sonucunda çevreye yayılan nitratlı artıklar da kültür bitkilerinin nitratlarla kirlenmesine yol açmaktadır (Warman & Havard, 1998). Birim alandan verim artışı için yapılan fazla nitratlı gübreleme sonucunda, özellikle kök ve tepe organlarında nitrat biriktirmektedirler. Böylece ıspanak ve marul gibi bitkilerin kuru maddelerinin % 10'nundan fazlası nitrat olabilmektedir (Ayaz & Yurttagül, 2006). Toplum sağlığı açısından sebzeler ile alınan nitrat ile mide kanseri arasındaki yakın bir ilişki bulunmaktadır (Özdestan & Ali, 2010). Hayvansal menşeili protein hidrolizatlarının

biber bitkisine yapraktan uygulandıktan sonra köklerde nitrat alınımını azalttığını bildirmiştir (Ruiz vd., 2000).

Hidroponik olarak yetiştirilen çin lahanası sürgünleride amino asitlerin, büyüme ve nitrat biriktirme üzerine etkileri incelenmek için yürütülen bilimsel çalışmada araştırmacılar, hidroponik ortama ekledikleri nitrat azotunun % 20'sine eş değer amino asit karışımı eklemişlerdir. Amino asit karışımı içerisinde sistein, glisin, histidin ve arjinin bulunmamaktadır.Amino asit uygulanmış bitkilerde uygulanmamış bitkilere göre nitrat birikimi azalmıştır. Bitkiler üzerindeki bu çalışma amino asit karışımından asparajin, arjinin ve glutamin çıkartılmış ve bitkilerin büyümesinde azalma gözlemlenmiştir. Araştırmacılar deney sonucunda asparajin ve glutaminin bitki gelişimine olumsuz etki göstermeden nitrat azotu yerine kısmen kullanabileceği sonucuna varmışlardır (Jing vd., 2007).

Nitratın bitki bünyesindeki azalmasında etkili olan amino asitlerin rolü, nitrat metabolizmasında görev alan nitrat ve nitrit redüktaz, glutamin sentetaz, glutamat sentaz ve aspartat aminotranferaz enzim aktivitelerinin düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Calvo vd., 2014;Liu & Lee, 2012; Liu, Ko, Kim, & Lee, 2007).

2.2.4 Protein Hidrolizatları ve Abiyotik Stres Toleransı

Bitkiler, düşük veya yüksek sıcaklık, su stresi, yüksek ışık yoğunluğu, ultraviyole radyasyonu, besin eksikliği ve besin dengesizliği gibi çok sayıda abiyotik streslere maruz kalmaktadırlar (Ambrosini vd., 2021). Bu abiyotik stres faktörleri, üründe önemli verim kaybına neden olmaktadır ve iklim değişikliği ile de bu etki katlanarak artmaktadır (Rahmstorf & Coumou, 2011; Wang, Vinocur, Shoseyov, & Altman, 2004; Wani, Kumar, Shriram, & Sah, 2016). Avrupa Birliği tarafından yayınlanan dünyadaki çölleşme atlası verilerine göre, toprak yapısının bozulmasının ve iklim değişikliklerinin etkileri, 2050 yılına kadar küresel tarım ürünlerinin verimini % 10 azalmasına ve böylece ağır ekonomik kayıplara neden olacaktır (Cherlet vd., 2018). Kuraklık ve su stresi mısır bitkisindeki mahsülü %40 oranında (Daryanto, Wang, & Jacinthe, 2016) ve börülcede ise %68'e kadar verimi azalmaktadır (Farooq vd., 2017). Dahası, su stresi ve toprak tuzluluğu, oksidatif, osmotik ve sıcaklık stresini de tetiklemektedir (Landi, Hausman, Guerriero, & Esposito, 2017).

Araştırmacılar, çevre kirliliğinden sorumlu olan ve aynı zamanda abiyotik streslere karşı bitkiler için direnç sağlayan ve mahsül verimini artıran organik maddelere odaklanmaktadır (Suhag, 2016). Birçok biyoaktif maddeler bitkiler için biyostimulant olarak tanımlanmıştır. Bunlar, hımik ve fulvik asit, hayvansal ve bitkisel protein hidrolizatları, deniz yosunu ekstratıdır. Bitkiler için biyostimulant etki gösteren protein hidrolizatları özellikle organik protein artıklardan elde edildikleri için çevre kirliliğine karşı ekolojik bir çözüm olması hemde ekonomiye katkı sağlaması nedeniyle ilgi çekmektedir (Xu & Geelen, 2018).

Tuzluluk, artan insan nüfusunun artması ile birlikte yer küremizdeki verimli tarım alanlarıda yetiştirilen besin ürünlerinin üretimini önemli düzeyde kısıtlayan çevresel faktörlerlerdendir (Botella, Rosado, Bressan, & Hasegawa, 2005). Topraklarda oluşan tuz stresi, bitkilerin büyümesini ve gelişmesini osmotik ve iyon dengelerini değiştirerek engel olmaktadır (Parida & Das, 2005). Rizosferinde tuz miktarının artmasıyla birlikte kullanılabilir su azalmakta, bunun sonucu olarak bitkilerde osmotik stres oluşmaktadır (Tuteja, 2007). Osmotik stres sonucu bitkide hücre genişlemesi azalmasına ve sürgün gelişiminin yavaşlamasına neden olmaktadır. Ayrıca artan sodyum ve klor iyonları, potasyum, kalsiyum ve nitrat gibi gerekli besin elementleri ile rekabete girerek bitkilerde besin eksikliğini ve dengesizliğini meydana getirmektedir (Hu & Schmidhalter, 2005). Ayrıca sodyum klorür moleküler seviyedeki zararı ise DNA, protein, klorofil ve zar fonksiyonuna zarar veren reaktif oksijen türlerinin oluşumunu, fotosentezin inhibisyonu, metabolik toksisiteyi, K^+ alımının engellenmesini ve hücre ölümünü tetiklemektedir (Botella vd., 2005; Hong, Chao, Yang, Cho, & Kao, 2009).

Tuz stresi, hücre bölünmesini ve uzamasını etkileyerek, bitkilerde kök ve gövdede hücre sayısının, mitotik aktivitenin ve hücre bölünme oranının azalmasına neden olur (Burssens vd., 2000). Buna bağlı olarak bitkinin gövde ile kök uzunluğunda ve ağırlığında azalma; yapraklarda küçülme ve incelme ile sayılarında azalma; yaprak yüzeyinde bulunan mumsu tabaka ile kutikula tabakasında incelme; vasküler doku farklılaşmasında ve gelişiminde azalma meydana gelmektedir. Ayrıca, erken dönemde kökte lignifikasyon oluşumu da gözlenmektedir (Mohammad, Shibli, Ajlouni, & Nimri, 1998; Reddy & Iyengar, 1999).

Hipoksik ortam, tuzluluk ve besin stresinin oluşturulduğu ortamda yetiştirilen mısır bitkisi üzerinde kollajenden üretilmiş protein hidrolizatının etkileri incelenmiştir. Protein hidrolizatı stres altındaki bitkilerde kök uzamasını sağlamıştır. Ayrıca süperoksit dismutaz enzimini kodlayan ZMSOD1A geninin ifadesini de indüklemiştir. Bu nedenle, hipoksik ortam, tuzluluk ve besin stresinin neden olduğu abiyotik stres koşullarında protein hidrolizatları bitkinin antioksidan sisteminde görevli olan enzimlerin ifadesini düzenleyerek stresin olumsuz etkilerini azaltabilmektedir (Trevisan, Manoli, & Quaggiotti, 2019).

Dışarıdan uygulanan indolasetik asit tuz stresine maruz bırakılan buğday fidelerinde kök ve gövde gelişimini geliştirmektedir (Egamberdieva, 2009). Ayrıca eksojen olarak uygulanan triakontanol buğday ve turp bitkilerinin tuz stres hasarını iyileştirmektedir (Çavuşoğlu, Kılıç, & Kabar, 2008; Perveen, Shahbaz, & Ashraf, 2011). Yonca bitki proteinlerinden elde edilmiş protein hidrolizatı indolasetik asit ve trikontanol benzeri aktivite göstererek mısır bitkisinin NaCl ile oluşturulmuş tuz stresine ortamında büyümeyi önemli ölçüde uyarmaktadır (Ertani vd., 2013).

Tuzluluk stresi oluşturulmuş marul bitkisine yapraktan ve kökten uygulanan bitkisel menşeili protein hidrolizatı, oksidatif stresi azaltmış, osmotik regülasyonu düzenlemiş ve hormon ve steroller, terpenler, glukozinolatlar gibi sekonder metabolitlerin seviyelerini değiştirerek strese karşı tolerans sağlamış ve bitkinin azot metabolizmasını geliştirmiş ve fotosistem II'nin verimliliğini arttırmıştır. Bu etkilerinden dolayı marul bitkisinde tuzluluk stresi altında pazarlanabilir ürün verimini yükseltmiştir (Lucini vd., 2015).

Kuraklık, bitki hücrelerindeki su potansiyelinde azalma, stomaların işlevlerindeki değişiklikler ve reaktif oksijen türlerinin artışı ile oluşan oksidatif hasar süreçleri, bitkilerin fizyolojik işlevlerini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Strese ilk yanıt olarak reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu oksidatif strestir (Blokhina, Virolainen, & Fagerstedt, 2003; Neto vd., 2006). Bitki bünyesinde oluşan reaktif oksijen türlerinin seviyesi antioksidan maddeler ve süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GP) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler tarafından kontrol edilmektedir. Protein hidrolizatlarının, normal şartlar altında ve kuraklık stresi koşullarında mısır ve soya fasulyesinde SOD, CAT ve

APX enzimlerinin aktiviteleri incelenmiştir. Protein hidrolizatları bitkilerde SOD, CAT ve APX'in aktivitesini arttırarak, stres sonucu oluşan oksidatif hasarın azaltılmasında yardımcı olmaktadır (Vasconcelos, Zhang, Ervin, & Kiehl, 2009).

Tarım ve bahçe bitkilerinde ağır ekonomik verim kayıplarına neden olan bir diğer yaygın çevresel streste düşük sıcaklıktır. Düşük sıcaklık sürgün ve kök ağırlıklarında azalmalara neden olmaktadır. Hayvansal menşeili protein hidrolizatı kök ve sürgün taze ağırlıklarını arttırarak soğuk stresine karşı direnç sağlamaktadır (Botta, 2012).

2.3 Protein Hidrolizatlarının Farmasötik Etkisi

Bir peptidin farmasötik aktivitesi, yapısına, amino asit bileşimine, N ve C-terminal amino asit tipine, peptid zincirinin uzunluğuna, peptidi oluşturan amino asitlerin yük karakterine, hidrofobik / hidrofilik özelliklerine bağlıdır (Sánchez, Vázquez, & Safety, 2017). Örneğin, daha yüksek anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitör aktivitesine sahip peptitler genellikle aromatik veya bazik N-terminal amino asitlere, C-terminalinde daha yüksek miktarda hidrofobik ve pozitif yüklü amino asitlere sahiptir (Li & Yu, 2015). Bir diyet bileşeninin biyoaktif olarak kabul edilmesi için fizyolojik düzeyde ölçülebilir bir biyolojik etki sağlaması gerekir. Bu biyoaktivite, toksisite, alerjenite ve mutajenite gibi potansiyel olarak zararlı etkileri hariç tutan, sağlığı faydalı bir şekilde etkileme potansiyeline sahip olmalıdır (Möller vd., 2008). Protein hidrolizatlarının antioksidan, antimikrobiyal, antihipertansif, antikanser, antidiyabetik ve antilipidemik gibi farmasötik etkileri bulunmaktadır.

2.3.1 Protein Hidrolizatlarının Antioksidan Etkileri

Serbest radikaller, atomik veya moleküler yapılarında bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron içeren kararsız ve oldukça reaktif moleküllerdir (Halliwell, 2007). Oluşan bu reaktif moleküller oksijen ile tepkimeye girerek oksidatif stresten sorumlu olan süperoksit anyonu (O2•-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (HO•) bileşikleri oluştururlar (Karabulut & Gülay, 2016).

Oluşan bu serbest radikaller birçok biyolojik molekül ile reaksiyona girerek onların yapısını bozmaktadır. Yağ asitleri ile reaksiyonu sonucu MDA molekülü oluşmaktadır. Proteinler ile reaksiyonu sonucu proteinin üç boyutlu yapısını değiştirerek

işlevsiz hale getirmektedir. Serbest radikaller DNA ve RNA ile reaksiyonu sonucu mutasyonlara, nükleotit zincirlerini kırılmasına neden olmaktadır (Bostancı, 2014).

Balık protein hidrolizatları antioksidan aktiviteye sahip küçük peptit fragmentleri içermektedir (Elias, 2008). Protein hidrolizatlarının antioksidan potansiyeli, amino asit bileşimine ve enzimatik hidroliz ile ana proteinlerin üçüncül yapısının bozulmasına bağlıdır. Balık işleme artığı olarak ortaya çıkan alaska mezgit balık iskeletlerinden üretilen farklı peptit fragmenlerinin antioksidan özelliklerinin değerlendirildiği çalışmada Leu-Pro-His-Ser-Gly-Tyr amino asit sekansına sahip peptit fragmentinin en yüksek antioksidan özelliği taşıdığı bildirilmiştir (Je vd., 2005). Sardalya artıklarının enzimatik hidrolizi ile Leu-His-Tyr, Leu-Ala-Arg-Leu, Gly-Gly-Glu, Gly-Ala-His, Gly-Ala-Trp-Ala, Pro-His-Tyr-Leu ve Gly-Ala-Leu-Ala-Ala-His sekanslarına sahip peptit fragmentleri elde edilmiştir. Bu peptitler arasında en yüksek antioksidan özelliğini Leu-His-Tyr sergilemiştir ve muhtemelen His-Tyr dizisi amino asitlerinin varlığı, peptitlerin antioksidan aktivitesine önemli ölçüde katkı sağlamaktadır (Bougatef vd., 2010).

2.3.2 Protein Hidrolizatların Antimikrobiyal Etkileri

Antimikrobiyal peptitler, çeşitli bitki, omurgasız ve omurgalı hayvan türlerinde birçok doku ve hücre türü tarafından üretilen çeşitli molekül gruplarıdır. Amino asitler, sahip oldukları kompozisyonlar, amfipatiklik özellikler, katyonik yükler ve boyutları sayesinde mikroorganizmanın zar katmanlarına bağlanmalarını ve girişlerini sağlamaktadır (Brogden, 2005).

Bu peptitler, bakteri ve mantar gibi çeşitli mikroorganizmaların hücre büyümesinin inhibisyonunda ve öldürülmesinde rol oynamaktadır. Antimikrobiyal peptitlerin moleküler ağırlıkları genellikle 10 kDa''nun altındadır ve enzimatik hidroliz ile in vitro da üretilmektedir (Kim & Wijesekara, 2010).

Çeşitli patojenik mikrooganizmalara karşı 60'dan fazla antimikrobiyal peptit preperatı geliştirilerek piyasaya sürülmüştür (Fosgerau & Hoffmann, 2015). Potansiyel terapötik ajanlar olarak değerlendirilen antimikrobiyal peptitler, patojenik mikrooganizmalara karşı kullanılmaları umut vericidir (Cruz, Ortiz, Guzman, Fernandez Lafuente, & Torres, 2014). Bu peptitlerin çoğu, anyonik hücre duvarları ve

mikroorganizma zarları ile etkileşimlerini kolaylaştıran hem katyonik hem de hidrofobik özelliklere sahip amfipatik bir yapı sergilemektedir (Pimenta & De Lima, 2005).

Bir mezbaha yan ürünü olan sığır kanı, zengin bir antimikrobiyal peptit kaynağıdır. Sığır kanı ile yapılan çalışma da 653 Da molekül ağırlığına ve Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg sekansına sahip küçük hidrofilik peptit tanımlanmıştır. Bu peptit et koruyucu olarak lipid perosidasyonunu % 60 oranında geciktirmiş ve 14 gün boyunca mikrobiyal büyümeyi inhibe etmiştir (Przybylski vd., 2016).

Farklı ticari enzimler (termolizin+proteinaz A, tripsin, proteinaz K, tirosinaz, pepsin, papain ve proteaz) kullanılarak, sığır sarkoplazmik proteinlerinden elde edilen peptitlerden Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Gln peptitin *Salmonella, Typhimurium, Bacillus cereus, Escherichia coli* ve *Listeria monocytogenes* karşı, Gly-Phe-His-Ile peptitin *E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* karşı, Phe-His-Gly peptitin *P. aeruginosa* üzerine ve Asp-Phe-His-Ile-Asn-Gly peptitin *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermektedir (Jang, Jo, Kang, & Lee, 2008).

2.3.3 Protein Hidrolizatlarının Antihipertansif Etkileri

Tansiyonun yüksek seyretmesi sonucu oluşan hipertansiyon, dünyadaki erişkin nüfusunun çeyreğini etkileyen ve her yıl hipertansiyona bağlı 9,4 milyon ölümün görüldüğü kardiovasküler bir hastalıktır (Hartmann & Meisel, 2007; Kes, Gökdoğan, & Tuna, 2016). Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) (EC 3.4.15.1) bir dipeptitil karboksipeptitazdır ve anjiyotensin I'i, damar büzücü etkisi olan anjiyotensin II'ye dönüştürür. Memelilerde kan basıncı, sıvı ve tuz dengesinin düzenlenmesinde önemli fizyolojik rol oynamaktadır (Hartmann & Meisel, 2007). ADE inhibitörlerinin geliştirilmesi, kronik kardiyovasküler hastalıklarının tedavisinde önemli bir basamak oluşturmuştur. ADE inhibitörleri ADE'nin katalizlemesi sonucu oluşan anjiotensin II'nin yapımını bloke ederek ve brakidinin yıkımını azaltarak endotelden salgılanan nitrik oksit ve prostaglandin yapımını artırarak vazodilatör olarak etki göstermektedir (Yüksel, 2004). ADE inhibitörleri olarak da bilinen antihipertansif peptitler, süt, mısır ve balık gibi protein kaynaklarından elde edilebilmektedir (Kim vd., 2012).

Pirinç proteinlerinin alkalaz enzimi ile hidroliz edilmesi sonucu elde edilen hidrolizat *in vitro* koşullarda ADE inhibitörü olarak aktivite göstermiştir. Potansiyel ADE

inhibitörü olarak izole edilen ve tanımlanan Thr-Gln-Val-Tyr sekansına sahip peptit spontan hipertansif ratlarında 30 mg/kg vücut ağırlığı dozunda tek doz oral olarak uygulandığında önemli derece kan basıncını düşürmüştür (Li, Qu, Wan, & You, 2007). İnsan beslenmesinde önemli yere sahip olan yumurtanın ihtiva ettiği ovotransferrinden elde edilen Ile-Gln-Trp ve Leu-Lys-Pro sekansına sahip iki tripeptit'in sıçanlara oral uygulanması ile birlikte tansiyon düşürücü etki gösterdiği saptanmıştır (Majumder vd., 2015).

2.3.4 Protein Hidrolizatlarının Antikanser Etkileri

Protein hidrolizatları birçok kanser hücre suçlarında sitotoksik etki göstermektedir. Bu protein hidrolizatları doğrudan veya sitotoksik ajanları veya radyoizotop taşıyıcıları olarak kullanılabilmektedir. Protein hidrolizatları küçük boyutları ve düşük toksisite özellikleri, hücre difüzyonu ve yüksek doku penetrasyonu gibi avantajlara sahiptir (Ünal vd., 2018) Protein hidrolizatlarının kanser hücresi üzerinde migrasyonun inhibisyonu, transkripsiyon ve hücre çoğalmasının engellenmesi, apoptozun teşviki , tümörleri besleyen kan damarlarının oluşumunun inhibisyonu gibi etkiler göstermektedir (Cicero vd., 2017; Su vd., 2014).

Soya fasulyesinin pepsin/pankreatin ile enzimatik hidrolizi sonucu elde edilen protein hidrolizatları Caco-2, HT-29, HCT-116 insan kolon kanseri hücrelerinde sitotoksisite oluşturmuştur (Montoya, Ledesma, Silván, Escobedo, & Villaluenga, 2018).

Kan midyesi (*Tegillarca granosa*) dokularından elde edilen sırasıyla 398.44 Da ve 243.23 Da moleküler ağırlığa, Trp-Pro-Pro ve Gln-Pro sekanslarına sahip iki peptitin PC-3, DU-145, H-1299 ve HeLa'nın hücre suşlarına doza bağlı olarak güçlü sitotoksisite göstermiştir (Chi, Hu, Wang, Li, & Ding, 2015).

2.3.5 Protein Hidrolizatlarının Antidiyabetik Etkileri

Diyabetes mellitus, insülin metabolizmasında meydana gelen işlevselsizlik sonucu kan glukoz düzeyinin yüksekliği ile karekterize kronik metabolik bir hastalıktır (Tosun, Satman, & Erkoç, 2011). Kan şekerinin artması, başta kan damarları ve sinirler olmak üzere vücut doku ve organlarına zarar vermektedir (Ünal vd., 2018).

Dipeptitil peptitaz IV bağırsakta besinlerin sindirilmesinde ve absorpsiyonunda görev alan bir enzimdir. Dipeptitil peptitaz IV ve alfa-glikozidaz gibi kan şekerini düzenleyen anahtar enzim aktivitelerini inhibasyonunu sağlayan biyoaktif peptitler diyabet'in tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal protezlar ile süt proteinlerinin enzimatik hidroliz ile elde edilen hidrolizatları dipeptitil peptitaz IV enzimini inhibe edebilmektedir (Manzano, Suarez, & Yada, 2018).

Ev kriket böceği (*Gryllodes sigillatus*)'in alkalaz enzimi ile hidrolizi sonucu elde edilen protein hidrolizatlarının dipeptitil peptitaz IV üzerindeki inhibisyon özelliklerinin araştırıldığı çalışmada, %60-85 hidroliz derecesine ulaşılmış protein hidrolizatların en yüksek düzeyde inhibisyon etkisi göstermiştir (Hall vd., 2018).

2.3.6 Protein Hidrolizatlarının Antilipidemik Etkileri

Protein hidrolizatları *in vitro, ex vivo* ve *in vivo* çalışmalarda hipolipidemik etki gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Protein hidrolizatları, safra asitlerini bağlayarak, kolesterol absorpsiyonunu inhibe ederek etki etmektedir. Ayrıca 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA redüktaz enziminin gen ifadesini de düzenlemektedir. 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA redüktaz enzimi kolesterol biyosentezinde önemli regülatör enzimdir. Bu enzimin inhibisyonu kolesterol biyosentez hızını azaltmaktadır (Manzano, Suarez, & Yada, 2018).

Beta-laktoglobülinin hidrolizinden elde edilen Ile-Ile-Ala-Glu-Lys sekansına sahip peptitin Caco2 hücrelerinde kolesterol emilimini baskılamış ayrıca sıçanlarda oral yol ile uygulandığında *in vivo* da hipokolesterolemik aktivite göstermiştir (Semen & Altıntaş, 2015).

Zeytin tohumu proteinlerinin enzimatik hidrolizi ile elde edilen protein hidrotlizatı yüksek miktarda glutamik asit, aspartik asit, glutamin ve asparajin içermektedir. 5 kDa'dan yüksek molekül ağırlığına sahip peptit fragmentlerinin, lipaz enzimlerinin ve kolestrol esteraz enziminin inhibisyonu ile kolesterol düşürücü etkisi göstermektedir (Prados, Marina, & García, 2018).

Protein hidrolizatları bitkiler ve insanlar üzerinde birçok aktiviteye sahiptir. Protein hidrolizatlarından etkili sonuçları alınabilmesi için, substrat seçimi, hidroliz

yöntemi, hidroliz yönteminin optimizasyonu, filtreleme ve paketleme gibi protein hidroliz prosesini oluşturan basamaklarında iyi bilinmesi gerekmektedir.

2.4 Protein Hidroliz Prosesi

2.4.1 Substrat Seçimi

İnek sütü, peynir ve süt ürünleri gibi hayvansal menşeili protein kaynakları, buğday, mısır, soya fasulyesi, pirinç, mantarlar, kabak, sorgum gibi mahsüller bitkisel menşeili protein ve peptit kaynakları insanların diyetlerinde kullanıldıkları için protein hidrolizatları daha çok çevre kirliliğine neden olan ve endüstriyel faaliyetlerden kaynaklanan sığır kanı, jelatin, boynuz, kıl, yün, deri, tavuk tüyü, mezbaha ve balık artıkları gibi hayvansal menşeili veya mısır, buğday, susam tohum artıkları ve algler gibi bitki menşeili artıklardan elde edilmesi önem kazanmıştır.

Balık endüstrisi, dünya çapında birçok ülke için önemli bir ekonomik kaynaktır (Oosterveer, 2008). Balık işleme endüstrisi % 40'ı insan tüketimine yönelik balık ürünleri üretmekte baş, deri, yüzgeçler, iç organlar ve yumurtaları içeren % 60'lık bölüm ise artık olarak değerlendirilmektedir (Dekkers, Raghavan, Kristinsson, & Marshall, 2011). Balıkçılık sektöründen kaynaklanan bu büyük miktarlardaki balık artıkları çevresel kirlilik ve bertaraf sorunlarını ortaya çıkarmaktadır. Bu ürünler yüksek miktarda protein içeren hayvan yemi, balık unu ve gübre gibi katma değerli ürünlere dönüştürülmesi en ekonomik ve ekolojik çözüm yöntemidir (Hsu, 2010). Balık artıkları olarak sınıflandırılan baş (Batista, Ramos, Coutinho, Bandarra, & Nunes, 2010; Gbogouri, Linder, Fanni, & Parmentier, 2004; Sathivel vd., 2003; Souissi, Bougatef, Ellouz, & Nasri, 2007), deri artıkları (Kumar, Nazeer, & Jaiganesh, 2012; Lee, Jeon, & Byun, 2011; Ngo, Qian, Ryu, Park, & Kim, 2010; Yin vd., 2010) , iç organlar (Batista vd., 2010; Bhaskar, Benila, Radha, & Lalitha, 2008; Bougatef vd., 2010; Hathwar, Bijinu, Rai, & Narayan, 2011), kemik artıklarından (Je, Qian, Byun, & Kim, 2007) farklı enzimler kullanılarak protein hidrolizatları üretilmiştir.

Aynı şekilde hayvancılık işletmelerin hızla gelişmesi, modernleşmesi ve yoğun işletmecilik faaliyetleri, birtakım sorunları da beraberinde getirmiştir. Mezbahanelerde işlenen hayvan sayısının artması ekonomik potansiyele sahip olan hayvansal artıkların artmasına, balıkçılık sektöründe olduğu gibi çevre için büyük sorunların oluşmasına

neden olmaktadır. Gerekli önlemler alınmadığı taktirde, mezbahane işletmelerinde ortaya çıkan hayvansal artıklar, potansiyel bir kirletici olarak yer altı ve yer üstü su kaynaklarını ve çevreyi kirletebilir (Karaman, 2006).

Erzurum Et ve Balık Kurumu Kesimhanesinden kaynaklanan hayvansal artıklı kirli sular ile sulanan tarım topraklarındaki mikrobiyal kirlenmenin incelendiği bir araştırma da hayvansal artık ile kontamine olmuş sularda ve tarım topraklarında insan, hayvan, bitki ve çevre için zararlı mikroorganizmalar olan *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* ve bazı koliform bakterilerin çok yüksek olduğu saptanmıştır (Danış, 1996).

Mezbaha artıklarının imha edilmesi veya işlenmesi sırasında bazı zorluklar ortaya çıkabilir. Mezbaha artıklarının ihtiva ettiği yüksek su ve yağ içeriğinden dolayı mikroorganizmalar için elverişli bir ortam oluşturmaktadır. Mikrobiyal aktiviler sonucu biyolojik stabilite korunamayabilir. Yüksek yağ içeriğinden kötü kokulu yağ asitleri ortaya çıkabilir. Ayrıca mezbaha artıkları insan, hayvan, bitki ve çevre için zararlı patojenlerin kaynağını da oluşturabilir. Yakılarak imha edilmesi ise yüksek enerji gerektirmektedir (Jayathilakan vd., 2012).

Mezbaha artıkları olarak değerlendirilen ürünler; kan, iç organlar, kemik, mide, testisler, rektum, akciğer, yemek borusu, boynuzlar ve toynaklar gibi hayvan organlarıdır. Büyükbaş ve küçükbaş hayvanların karkas ve hayvansal artık oranları çizelge 2.2'de verilmiştir. Büyükbaş hayvanlardan elde edilen artıklar %37 iken küçükbaş hayvanlardan elde edilen hayvansal artıklar % 37.5'tir (Jayathilakan vd., 2012).

Çizelge 2.2 Büyükbaş ve küçükbaş karkas ve artık miktarları.

	Büyükbaş (600 kg/hayvan)		Küçükbaş (60 kg/hayvan)	
	%	Kg	%	Kg
Karkas	63	378	62,5	37,5
Artık	37	222	37,5	22,5

Mezbaha atıklarından kan, canlı hayvan ağırlığının % 4'nü (Wismer-Pedersen, 1988) ve potansiyel ticari değere sahip birçok protein içermektedir (Piot, Guillochon, & Thomas, 1986). Mezbahalardan artık olarak çıkan kan doğrudan çevreye verildiğinde yüksek kirletici yükü nedeniyle sorunlu bir yan üründür (Del Hoyo, Rendueles, & Díaz, 2008).

Bunların yanında hayvancılık endüstrisinde bir risk olarak değerlendirilecek husus ise hayvansal kaynaklı hastalıklardır. Sığır, koyun, tavuk, kuş vb. kanatlı hayvanlar gibi pek çok hayvan türüne ait zoonoz hastalıklar insanlara bulaşarak ciddi sorunlar oluşturabilirler. Zoonozlar, bakteriyel, paraziter, viral ve mantar kaynaklı olabilmektedir. Bu zararlı mikroorganizmalar hayvanlarda hastalığa neden olurlar ve çeşitli yollarla insanlara bulaşabilmektedir. En çok karşılaşılan zoonoz hastalıklardan; *Rhabdovirus, Brucellosis, Listeriosis, Leptospirosis, Bacillus anthracis, Salmonellosis, Psittacosis, Yersiniosis, Tularemi, Toxocara canis, Tuberculosis, Camplyobacter jejuni, Leichmaniasis, Ruam* ve *Toxoplasmosis* olarak sayılabilir (Demirhan, Çelen, Çelen, & Şahinler, 2016).

Kanın doğrudan tüketimi, tüketicilerin olumsuz algısı ve dini kısıtlamalardan dolayı sınırlı kalmıştır. Bunun sonucunda kanın biyoteknolojik olarak işlenip içerisinde biyoaktif peptitleri ihtiva ettiği protein hidrolizatına dönüştürülme fikri ortaya çıkmıştır (Bah, Bekhit, Carne, & McConnell, 2013). Bir çok araştırmacı alkalaz (Hyun & Shin, 2000; Wei & Chiang, 2009), nötraz (Hyun & Shin, 2000), papain (Hyun & Shin, 2000), tripsin (X. Liu vd., 2010), pepsin (Hyun & Shin, 2000; Ren vd., 2011) gibi enzimler kullanarak kan proteinlerinden ADE inhibitör aktivitesi gösteren peptitler elde etmişlerdir.

Diğer mezbaha artığı olan akciğer yaklaşık 170 g/kg protein içeriğine sahiptir. Özellikle kan, kemik ve akciğer ticari anlamda biyoaktif peptitlerin kaynağıdır (Lafarga, Álvarez, & Hayes, 2017; Minkiewicz, Dziuba, & Michalska, 2011). Akciğer dokusundan elde edilen protein hidrolizatı yaklaşık %15-20 oranında biyoaktif peptit içermektedir (Lynch, Álvarez, O'Neill, Keenan, & Mullen, 2018). Ayrıca sığır akciğeri yüksek miktarda kolejen ve elastin içermektedir (Darine, Christophe, & Gholamreza, 2010). Akciğerden çeşitli proteazlar kullanılarak elde edilen protein hidrolizatları antioksidan ve anti inflamatuar aktivite göstermişlerdir (O'Sullivan, Lafarga, Hayes, & O'Brien, 2017).

Trakya Bölgesi hayvancılık sektörü için Türkiye'de ayrı bir öneme sahiptir. Bölgede canlı hayvan sevklerine getirilen kontroller ve uygulanan aşı programları sonucunda Kasım 2007'den beri Trakya'da şap hastalığı rapor edilmemiştir. Dünya Hayvan Sağlığı Teşkilatı Trakya bölgesi için şap hastalığı bulunmadığı tescillemiş ve bu hastalıktan arî bölge olarak tanımlanmıştır.

Trakya bölgesinde hayvan sevkiyatlarının denetim altına alınması, piyasanın kontrolü, Edirne ilinde bulunan "Canlı Hayvan Borsası" ve "Et ve Et Ürünleri Entegre Tesisi" ile Keşan ve Havsa ilçelerinde faaliyet gösteren "Canlı Hayvan Pazarları" bulunması nedeniyle bölgede hayvancılık oldukça gelişmiş durumdadır. 2010 yılında mezbaha kesim adetleri çizelge 2.3'te verilmiştir (Balkan, 2011).

Çizelge 2.3 2010 yılında Edirne mezbahanelerinde hayvan kesim adetleri.

Mezbahalar	KüçükBaş (Adet)	Büyükbaş (Adet)
Edirne Belediye Mez. (3.sınıf)	5276	3953
Edirne Et Entegre Tesisi (1.sınıf)	763	419
Havsa Belediye Mez. (3.sınıf)	456	1888
İpsala Belediye Mez. (3.sınıf)	105	27
Keşan Mezbahası (1.sınıf)	41050	9741
Uzunköprü Bel. Mez. (1.sınıf)	1732	2930
Toplam	49382	18958

Trakya bölgesinde bulunan mezbaha faaliyetlerinden dolayı ortaya çıkan hayvansal artıkların oluşturduğu çevre sorunlarının önüne geçilmesi, bu artıklar arasında yer alan akciğer dokusunun hem fiziksel hemde kimyasal özelliklerinden dolayı katma değeri yüksek, antioksidan ve anti inflamatuar özelliklerinin bildirildiği ve literatürde üretim proseslerinin bilgi eksikliğinden dolayı akciğer dokusu protein hidrolizat kaynağı olarak seçilmiştir.

2.4.2 Hidroliz Yöntemleri

Endüstriyel uygulamalarda protein hidrolizatı üretebilmek için kimyasal ve enzimatik hidroliz olmak üzere 2 farklı yöntem kullanılmaktadır. Kimyasal yöntemler kendi içerisinde asidik hidroliz ve alkali olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

Asidik Hidroliz ile ilgili yapılan çalışmalar

Proteinlerin hidrolizi ile ilgili ilk deneyler 1820'de Henri Braconnot tarafından jelatin, yün ve kas liflerini konsantre sülfürik asit ile hidroliz çalışması ile başlamıştır. (Mustăţea vd., 2019). Koç boynuzunu 6 N HCl ile 80C°'de 24 saat inkübe edildiği

çalışmada , hidroliz sonucu sırasıyla 3.9, 8.17, 5.19, 4.02, 4.66 ve 5.9 mg/ml aspartik asit, glutamik asit, glisin, lösin, arjini ve prolin amino asitleri elde edilmiştir (Kurbanoglu, Atici, & Algur, 2004).

Kanatlı hayvan tüylerini 3 farklı asit çeşidi kullanarak hidroliz kinetiğini incelendiği araştırmada, sülfürik asit, nitrik asit ve fosforik asit 0.5-6 M konstrasyonlarında 70-90°C'de sıcaklıkta zamana göre çözünebilir proteinlerin miktarlarını tayin edilmiştir. Araştırma sonucunda sülfürik asitin nitrik asit ve fosforik asite göre daha etkili olduğunu bildirmiştir (Bouhamed & Kechaou, 2017)

Alkali Hidroliz ile ilgili yapılan çalışmalar

Koyun ve tavşan artıkları, koyun derisi, koyun akciğeri ve kalbi, sığır artıkları ve kemikleri ile yaptığı çalışmada 0.45 M KOH ve 0.15 NaOH ile birlikte hazırladığı solüsyonu kullanmıştır. Çalışma sonucunda ise kullanılan hayvansal artıkların %100 çözünebilir olduğunu bildirmiştir (Gousterova vd., 2008)

Başka bir çalışmada ise koyun yününü 0.15 M KOH ve 0.05 M NaOH ile hazırlanan solüsyon içinde 120°C'de 20 dakika inkübe etmiştir. Elde edilen çözelti, vakum altında 70°C'de kurutulmuştur. Elde edilen sıvı içerisinde % 75-80 oranında suda çözülebilen peptitler, amino asitler, tuzlar, yağlar ve bazı karbonhidratlar ve potasyum gibi tarım için önemli besin elementleri elde edildiği bildirilmiştir (Nustorova, Braikova, Gousterova, Tonkova, & Nedkov, 2005).

Yapılan diğer çalışmada ise KOH ve NaOH eklendiği solüsyonda koyun yünü 120 °C ve 2,03 atmosfer basıncında inkübe edilmiş ve deney sonucunda çözeti içerisinde % 75-80 oranında suda çözünür peptit, amino asit, tuzlar, lipid ve bazı karbonhidratlar elde edilmiştir (Gousterova vd., 2003).

Literatürde alkali hidroliz ile kombine edilmiş enzimatik hidroliz birçok makale mevcuttur. Alkali hidroliz yöntemiyle ile enzimatik hidroliz yöntemini kombine edildiği çalışmada, alkali hidroliz yönteminde $CaOH_2$, enzimatik yöntemde ise Esperase 6.0T proteolitik enzim kullanılmıştır. Bu yöntem ile koyun yününün en yüksek %60 oranında hidrolizi gerçekleşmiştir (Krejci, Mokrejs, & Sukop, 2011).

Koyun yününün alkali hidrolizi çalışmasında 2,5 N KOH oranında hazırlanmış çözelti içerisinde 100 gr koyun yününü 60°C'de 24 saat içerisinde kademeli olarak

hidroliz etmiş ve hidrolizatın kurutulmasından sonra %67.8 protein ve 29.2 gr da kül elde edilmiştir. Protein içeriğinde ise %8 oranında glutamik asit, %5 oranında sistein amino asiti tespit edilmiştir (Taskin, Unver, Firat, Ortucu, & Yildiz, 2016).

Enzimatik hidroliz ile ilgili yapılan çalışmalar

Artık sığır boynuzu ve koynağının öğütülmüş toz haline getirdikten sonra farklı enzim konsantrasyonlarında 50°C'de pH 8'de 5 saat muamele edildikten sonra %34-60 oranında protein kaynaklarını çözülmüştür. Bu karışımın içerisinde proteinler, peptitler ve 18 adet serbest amino asitler bulunduğunu bildirmiştir (Veselá & Friedrich, 2009).

Balık atıklarının hem asidik hem de enzimatik hidroliz yöntemlerini kullanarak hidroliz edildiği çalışmada, asidik yöntemde 4, 6 ve 8 M'lık HCl ve 15 psi basınç altında 90 dakika muamele edilmiştir. Reaksiyon sonucunda %30-35'lik hidroliz derecesine ulaşmış ve reaksiyon sonunda %0.1-0.4 oranında büyük molekül ağırlıklı moleküllerin olduğu sonucuna varılmıştır. Enzimatik yöntemde ise %2.4 ve 6 (w/w) papain enzimi kullanılmıştır. Balık proteinleri 3 farklı enzim konsantrasyonunda 5, 10 ve 15 saat boyunca 40 °C'de muamele edilmiştir. Reaksiyon sonucunda %20-24 oranında hidroliz derecesine ve %0.18-0.33 oranında ağır molekül ağırlığına sahip moleküller tespit edilmiştir. Araştırmacılar hidroliz derecesinin reaksiyon süresi arttıkça artmakta olduğunu fakat enzim konsatrasyonuna göre hidroliz derecesinin değişmediği sonucuna varmışlardır (Wisuthiphaet, Kongruang, & Chamcheun, 2015).

Koray Korkmaz "Ticari Enzimler Kullanılarak Farklı Balık Türü Atıklarından Hidrolizat Üretimi ve Kalitesinin Belirlenmesi" isimli doktora çalışmasında alabalık, hamsi ve mezgit atıklarının alkali proteaz, protameks ve flavourenzim ile farklı konsatrasyonlarında ve farklı süreçlerde enzimatik olarak hidroliz etmiştir. Bu enzimler için balık hidrolizatlarının optimum enzim konsatrasyonu ve sıcaklık değerlerini cevap yüzey yöntemi ile optimize ederek elde edilen protein hidrolizatlarının kimyasal içeriklerini karşılaştırmıştır.

Balık artıklarının hidroklorik asit ve proteaz enzimlerinden papain ve alkalaz muamele edilmiştir. Asit hidrolizi için optimum şartlarda 4 mol/L hidroklorik asit ile 100 °C'de 90 dakika muamele edince %50 hidroliz derecesi elde edilmiştir. Enzimatik hidroliz için ise %6 alkalaz konsantrasyonu, 61.23°C sıcaklık ve 27.36 dakika reaksiyon

gerçekleştirildiğinde %88.90 hidroliz derecesine ulaşılmıştır. Enzimatik hidroliz ile elde edilen protein hidrolizatı, %16.35 oranında glutamik asit, %10.41 oranından aspartik asit ve %8.48 oranında lizin elde edilmiştir (Wisuthiphaet, Klinchan, & Kongruang, 2016).

Atlantik Morina balığının iç organlarının nötral pH'da çözünebilirliğini araştırmışlardır. Çalışmada iç organların parçalanması için içsel enzimlerin tek olarak veya 7 çeşit ticari enzim (alkalaz 2.4 L, neutraz 0.8 L, protamexTM, papain, bromelain, aktinidin ve bir bitki proteaz karışımı) kullanılmıştır. Hidrolizatlarda ise kuru madde, α-amino grupları ve peptitlerin moleküler ağırlıklarının dağılımı incelenmiştir. Alkalaz ve papain kuru madde çözünürlülüğünde en yüksek verimi vermiştir. Yüksek alkalaz konsantrasyonu ile bu verim %95 seviyelerine kadar çıkarılabilir olduğu bildirmiştir. İlginç olarak, içsel enzim aktivitesi kuru madde çözünürlüğünde % 75 oran ile başarılı gözlenmiştir (Aspmo, Horn, & Eijsink, 2005).

Mezbahanede atık olarak ortaya çıkan taze kanı, mikrobiyal kökenli serin proteaz ve metalloprotezlar kullanarak enzimatik hidroliz gerçekleştirmiştir. Enzimatik hidroliz ile taze kandaki 32.9 mg/mL total protein oranı 1.5 mg/mL'ye düşmüştür. Partikül boyutu ise 46.92 μm'den 19.89 μm'ye gerilediğini bildirmiştir (Jeon, Kim, Cho, & Yoo, 2013).

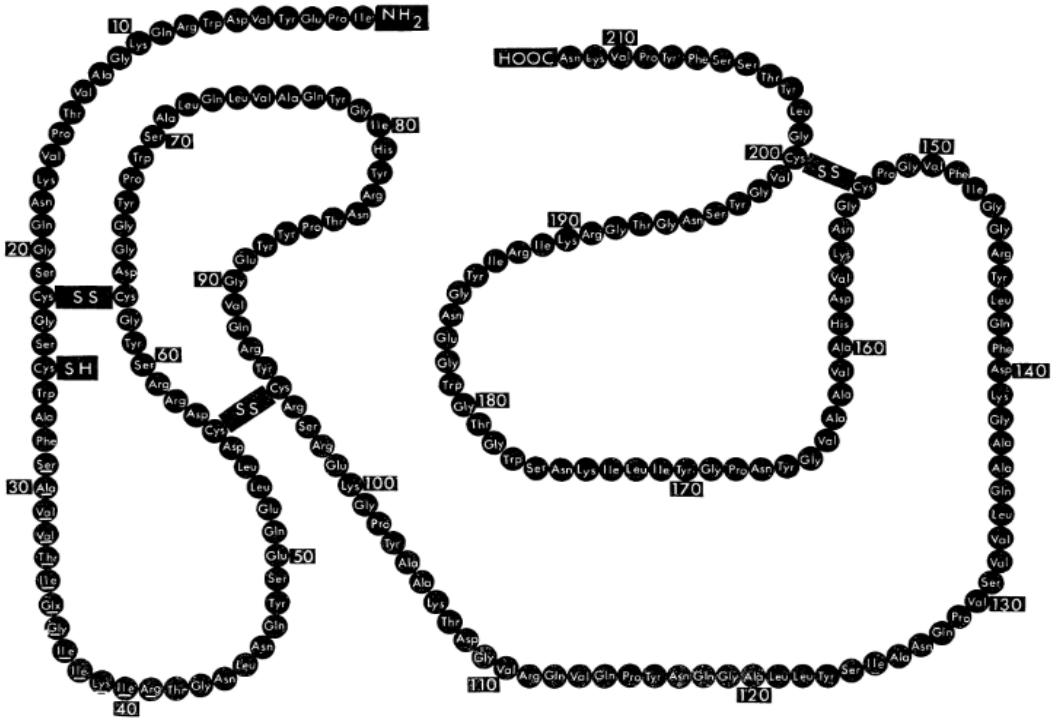
Sığır akciğerini papain, kollajenaz ve alkalaz enzimlerini kullanarak hidroliz edilmesi ile sığır akciğerinin biyoaktif peptitlerin salınımı için iyi bir substrat olduğunu bildirmiştir (Lafarga & Hayes, 2017).

Papain Enzimi

Papain (EC 3.4.22.2), papaya (*Carica papaya* L.) lateksinden izole edilmiş bir endolitik bitki sistein proteaz enzimidir. Papain, olgunlaşmamış papayanın meyvelerine kesi atılması ve ardından kesiden akan lateksin toplanıp kurutulmasıyla elde edilir Papain, proteinlere, kısa zincirli peptidlere, amino asit esterlerine ve amid bağlantılarına karşı kapsamlı proteolitik aktivite gösterir ve gıda ve tıp alanlarında yoğun bir şekilde uygulanır (Uhlig, 1998). 3.406 Da'lık moleküler ağırlığa sahip tek zincirli bir proteindir. Papain, çok çeşitli koşullar altında stabil ve aktif olan bir sistein hidrolazdır. Yüksek sıcaklıklarda bile çok kararlıdır (Cohen, Coghlan, & Dihel, 1986).

Papain enzimi tercihen, bazik amino asitleri, özellikle arginin, lisin ve fenilalanini takip eden kalıntıları içeren peptit bağlarını kesmektedir. (Menard vd., 1990). Papain

aktivitesi için optimum pH, farklı substrata göre değişen 3.0-9.0 aralığındadır (Edwin & Jagannadham, 2000; Ghosh, 2005). Protein, molekülün bu köprüler boyunca katlandığı, enzimin stabilitesine katkıda bulunan yan zincirler arasında güçlü bir etkileşim yarattığı üç disülfür köprüsü ile stabilize edilir. Üç boyutlu yapı, aralarında bir yarık bulunan iki farklı yapısal alandan oluşur. Bu yarık, kimotripsin katalitik üçlüsüne benzetilen katalitik bir diad içeren aktif bölgeyi içerir (Şekil 2.2). Katalitik diad sistein-25 ve histidin-159 amino asitlerinden oluşur (Menard vd., 1990).



Şekil 2.2 Papain enziminin amino asit sekansı.

Papain enzimi yapısının iyi bilinmesi, yüksek sıcaklılarda stabil kalması, pH 3-9'da çalışabilmesi ve proteinlere, kısa zincirli peptidlere ve amid bağlantılarına karşı kapsamlı proteolitik aktivite göstermesi nedeniyle akciğerin enzimatik hidrolizi için kullanılması uygun görülmüştür.

2.4.3 Optimizasyon

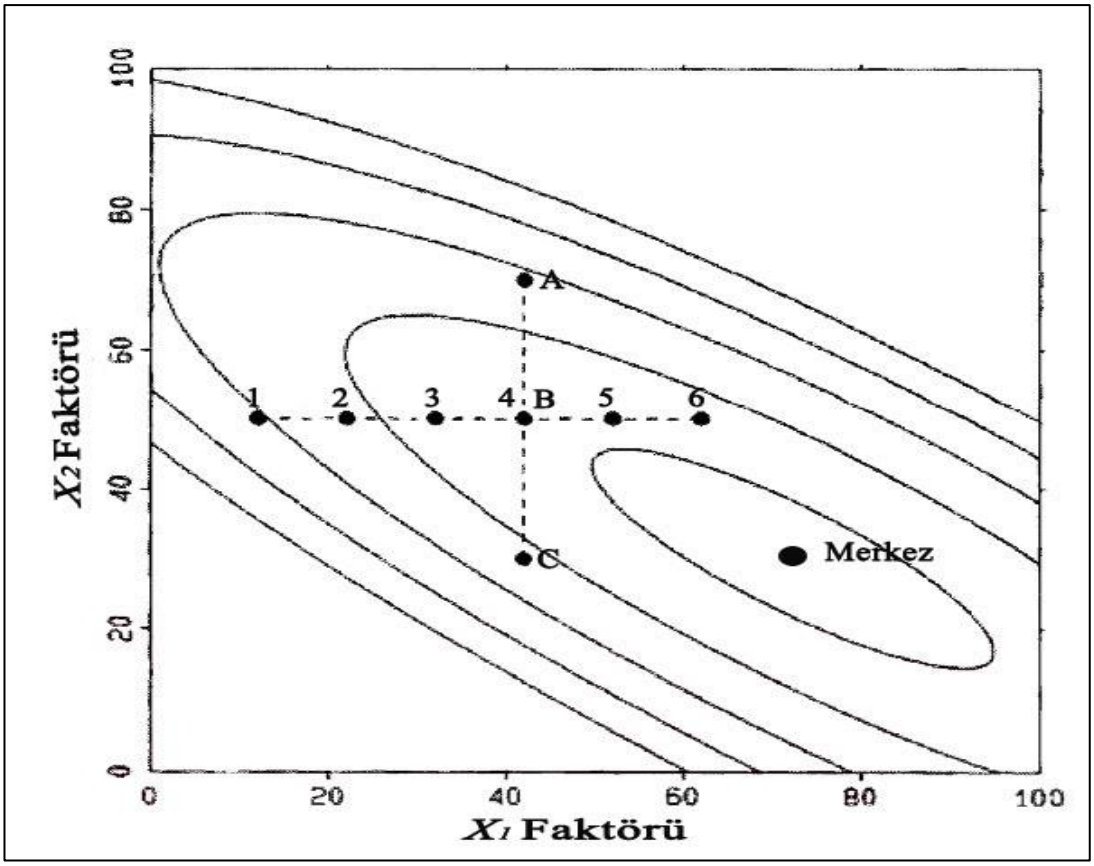
Ürün veya proses geliştirmede iki strateji izlenebilmektedir. Bunlardan birincisi kontrol edilebilen faktörleri değerlendirerek optimum değerlere getirerek ürün veya prosesin performansını arttırmaktır. İkincisi ise ürün veya proses performansını aynı

seviyede tutarak düşük maliyetli çözümler oluşturmaktır. Bu stratejiler gerçekleştirmek için öngörülen tahmini koşullar belirlenerek bu koşullar altında deney çıktıları alınır ve ürün veya proses performansı gözlemlenerek gerekli bu koşulların kabulü veya reddi şeklinde düzenlemeler yapılarak ürünler optimize edilmeye çalışılmaktadır. Bu bağlamda, optimizasyon çalışmalarının hedefi, bir ürünün özelliklerini veya üretim prosesin koşullarını optimize etmek için sistemin davranışlarını ve sisteme etki eden faktörler arasındaki ilişkiler gerçek koşullar altında modellenmesi yapmak ve gerekli deney stratejilerini geliştirmektir (Özden, 2020; Savaşkan, 2003).

Optimizasyon çalışmalarında kullanılan klasik çalışmaların sağladığı deney tasarım yöntemi, oldukça fazla vakit alan ve yüksek maliyeti olan Tam Faktöriyel Deney Tasarımları kullanılmaktaydı (Keleş, 1996; Savaşkan, 2003). Klasik deney tasarımı yaklaşımlarının temeli deneyde bulunan tek bir faktörün değerleri değiştirilerek ürün veya proseste elde edilen çıktıların değişimini gözlemektir. Bu tasarımların en zor özelliği ürün veya proses çıktıları üzerinde etkili olan bağımsız faktörlerin tümünü kontrol altında tutarak etkileşimlerini değerlendirmektir (Savaşkan, 2003).

Bu yaklaşımın daha iyi anlaşılması için örnek vermek gerekirse bir protein hidrolizatı üretim prosesinde, proses üzerinde etkisini incelemek istediğimiz sıcaklık (X_1) ve süre (X_2) olmak üzere iki bağımsız değişken olduğunu varsayalım. Bir kerede bir bağımsız faktörün incelendiği durumda önce X_2 faktörüne sabit bir değer verilmektedir, sadece X_1 faktörünün farklı seviyelerinde ölçüm yapılarak, yanıt üzerinde X_1'in etkisi hakkında bir değerlendirme yapılmaktadır. Tasarımın ikinci aşamasında ise X_1 faktörü için en iyi sonuç veren değer sabit tutularak X_2 faktörü için değişik seviyelerde ölçümler yapılarak optimum nokta bulunmaya çalışılmaktadır. Şekil 2.3'de gösterildiği gibi X_1 faktörü farklı seviyelerde denenmiş ve A, B ve C noktaları elde edilmiştir ve bu noktalardan bir doğru çizilmiştir. X_1 faktörü için optimum koşul B noktası seçilmiş ve sabitlenmiştir. X_1 bu seviyede sabit tutularak X_2 faktörü farklı seviyelerde çalışılmıştır ve 1, 2, 3, 4 ve 5 noktaları elde edilmiştir. Bu noktalar üzerinden geçen bir doğru çizildiğinde protein hidrolizatı için en optimum nokta B ve 4 noktaların keşistiği noktalar belirlenmiştir. Şekil 2.3'te de görüldüğü gibi değerlendirilen optimum nokta gerçek

optimum noktadan uzak olduğu görülmektedir (Savaşkan, 2003).



Şekil 2.3 Bir kerede bir faktöriyel deney tasarımı.

Matematik ve istatistikçiler hem klasik yöntemden kaynaklanan deney sayısı, süresi ve maliyetlerini azaltmak hemde deney çıktılarına etki eden faktörlerin tek başlarına ve diğer faktörler ile yaptığı etkileri ortaya koymak amacıyla modern deney tasarım modellerini geliştirilmiştir. Modern deney tasarımları, bağımsız faktörlerin çeşitli seviyelerinin çıktıları üzerindeki etkileri ve bu etkilerin sebeplerini araştırarak, deney çıktılarının optimizasyonunu ve sistem güvenirliğini artırmayı hedeflemektedir. Ayrıca deneylerin yürütülmesi için belirli bir sistematik oluşumunu sağlamaktadır. Modern deney tasarımı optimizasyon çalışmaları, sadece istatiksel bir yaklaşım değil, aynı zamada kaliteyi artıran, sonuçların güvenirliliğini sağlayan, Ar-Ge faaliyetlerinde kullanılabilen, diğer teknikleri destekleyen ve tamamlayan teknikler olarak değerlendirilebilir (Fowlkes & Creveling, 1995; Keleş, 1996; Savaşkan, 2003; Vining, 1999).

Modern Deney Tasarım Modeli Olarak Regresyon Analizine Dayalı Yanıt Yüzeyi Deney Tasarımı Metodu

1970'li yıllarda Box ve Wilson tarafından geliştirilen Yanıt Yüzey Deney Tasarımı Metodu, deney çıktıları üzerine etki eden bağımsız değişkenlerin optimum koşulları belirlemek için tasarlanmıştır (Myers, 1991). Box ve Wilson, yapılabilecek en az sayıda deney ile yanıt değişkeninin en yüksek değerini aldığı noktayı bulmaya yoğunlaşmışlardır. Box ve Wilson'ın optimizasyondaki yaklaşımları, yanıt değeri ile bağımsız değişkenler arasındaki korelasyonu regresyon analizi yardımı ile açıklamaya çalışmaktadır (Vuchkov & Boyadjieva, 2001). Birinci dereceden denklemler, ikinci derece karesel denklemler ve bağımsız değişkenlerin birbirleri ile olan etkileşim terimleri, regresyon denklemini oluşturmaktadır (Özden, 2020).

X_1 (Sıcaklık), X_2 (Konsatrasyon) ve X_3 (Süre) olarak belirlenen bağımsız değişkenler ile yanıt arasında aşağıdaki gibi regresyon denklemi yazılmaktadır. Denklemde β simgesi katsayıları ifade etmektedir (Özden, 2020).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1^2 + \beta_5 X_2^2 + \beta_6 X_3^2 + \beta_7 X_1 X_2 + \beta_8 X_1 X_3 + \beta_9 X_2 X_3 \quad (2.1)$$

Birinci Dereceden Lineer Terimler: $\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3$ (2.2)

İkinci Dereceden Karesel Terimler: $\beta_4 X_1^2 + \beta_5 X_2^2 + \beta_6 X_3^2$ (2.3)

Etkileşim Terimler: $\beta_7 X_1 X_2 + \beta_8 X_1 X_3 + \beta_9 X_2 X_3$ (2.4)

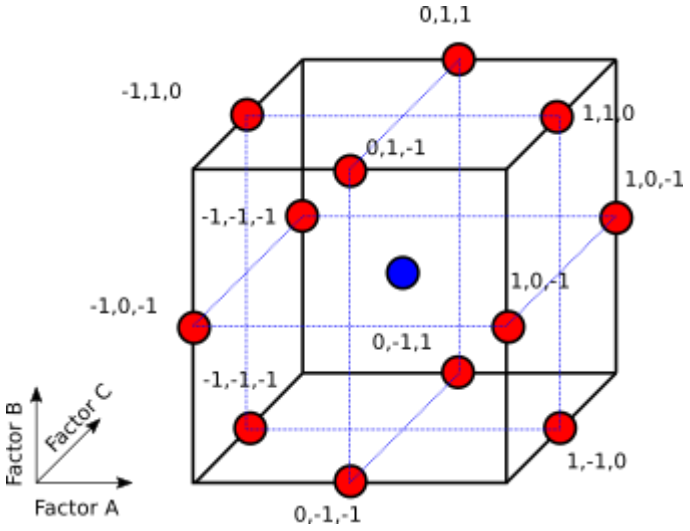
Yanıt Yüzey Deney Tasarım Modelinde, deney için yeterli miktarda veri ile en yüksek bilgiye ulaşılabilmesi, faktörler arasındaki değişimin belirlenebilmesi, optimizasyon çalışmalarının kolay olması, deneylerde bir sistematiğin oluşması ve bağımsız değişkenler ile yanıt arasında regresyon modeli kurulabilmesi gibi avantajlarından dolayı biyoloji, biyoteknoloji, kimya, kimya mühendisliği, çevre, gıda teknolojileri, imalat ve eczacılık alanlarında kullanılmaktadır (Baş, 2010; Del Castillo, 2007; Özden, 2020).

Yanıt Yüzey Deney Tasarım Modeli, deney için uygun yönteminin seçilmesi üzerine deney çıktıları toplanarak, yanıt üzerine faktörlerin etkisini belirleyerek bir matematiksel model oluşturup, bu modelde optimizasyon çalışmasını hedeflemektedir. Yanıtın optimum noktaya ulaşması için genelde Yanıt Yüzeyi Deney Tasarım Modellerinden Merkezi Kompozit veya Box-Behnken Deney Tasarım modelleri kullanılmaktadır (Özden, 2020).

Optimizasyonun son aşamasında yanıt ve bağımsız değişkenler arasındaki en uygun bağlantı tespit edilmeye çalışılır ve Yanıt Yüzeyi Analizi ile elde edilen regresyon modelinin oluşturduğu grafikler ile ürün veya prosesin davranışları görsel hale getirilmektedir (Savaşkan, 2003).

Merkezi Kompozit Deney Tasarımı

Merkezi Kompozit Deney Tasarımı (CCD), Box ve Wilson tarafından literatüre eklenmiştir ve deney noktaları üç boyutlu küp örneği ile şekil 2.4'te gösterilmektedir.



Şekil 2.4 CCD üç boyutlu gösterimi.

Optimizasyon çalışmalarında en fazla kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Bu deney tasarımında merkez noktadan çözüm uzayının dışına doğru uzatılan, α değeri olarak isimlendirilen kodlanmış uzunluk değeri kullanılmaktadır. α değerinde saptanan noktaların dışında bir çözüm uzayı aranmaktadır. Bağımsız değişlenler X_1, X_2 ve X_3 olarak gösterilen 3 faktörlü CCD için deney planlanmak istenirse çizelge 2.4 gibi olacaktır.

Çizelge 2.4 Merkezi kompozit deney tasarımı.

Deney Sayısı	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	α	0	0
10	α	0	0
11	0	-α	0
12	0	α	0
13	0	0	-α
14	0	0	α
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

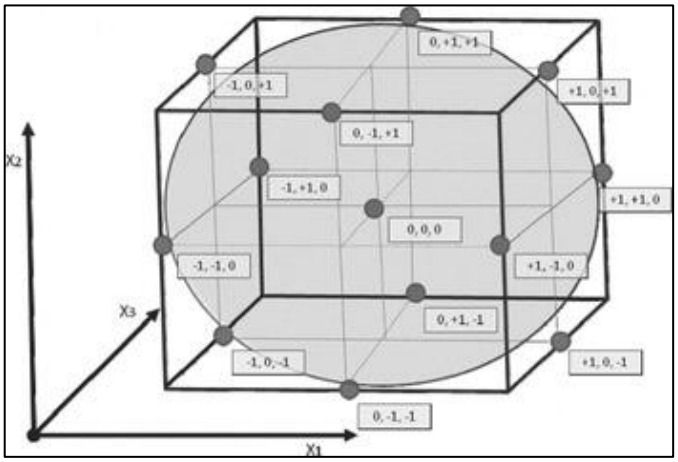
Deney tasarımında ilk 8 deney tam faktöriyel deney düzeneği ile oluşturulduktan sonra her bir bağımsız değişken için –α ve +α seviyeleri eklenir. 8 tane köşelerde, 6 adet merkezde ve 6 adet α noktasında olmak üzere 20 adet deneyden oluşmaktadır (Özden, 2020).

Merkezi kompozit tasarımı kendi içerisinde farklı türlere ayrılmaktadır (Değirmencioğlu & Yazgı, 2006):

1- İlgi Alanını Dıştan Çevreleyen Dizayn (Circumscribed Desing):
   Merkez kompozit dizaynının orijinal formudur. Tüm deney alanında yüksek bir tahminleme yapılması sağlanır. Her faktör için 5 seviyeye ihtiyaç vardır.
2- İlgi Alanını İçten Çevreleyen Dizayn (Inscribed Desing):
   CCD'nin her faktör seviyeinin α ile bölünmesi ile oluşur. Her faktör için 5 seviyeyi ihtiyaç vardır.
3- Yüzey Merkezli Diyazn (Face Centered Desing):
   Her faktör için 3 seviyeye ihtiyaç vardır.

Box-Behnken Deney Tasarımı

Box-Behnken Deney Tasarımı (BBD) 1960 yılında Box ve Behnken tarafından literatüre kazandırılmıştır. Bu yöntemin önemli avantajlarından biri de kararlaştırılan optimum koşulların endüstriye uygulanabilirliğinin olmaması durumunda, endüstride bu koşullara en yakın durumun uygulanması sonucunda elde edilebilecek proses verimini ek deneyler yaparak doğrulanmasına gerek kalmaksızın gösterebilmesidir. BBD dizaynı bütün noktaların yarıçapı √2 olan küresel bir dizayndır (Şekil 2.5) (Korkmaz, 2018).



Şekil 2.5 BBD üç boyutlu gösterimi.

Kübik olan bölge her bir değişkenin üst ve alt sınırlarını oluşturmaktadır. Küpün içindeki noktalar, prosesin fiziksel kısıtlamalarından dolayı uygulanması imkânsız veya çok yüksek maliyetli olan faktör-seviye kombinasyonlarını ifade ettiğinde avantajlı bir yöntemdir. Bu dizayn oluşturulurken bağımsız değişkenlerin belirlenen bir noktası merkez seçilir ve bu nokta dizaynda 0 noktasını temsil eder. Bu değerden eşit uzaklıkta bulunan noktalar ise +1 ve -1 değerleri ile belirlenmektedir (Korkmaz, 2018). Bağımsız değişlenler X_1, X_2 ve X_3 olarak gösterilen 3 faktörlü Box-Benhken Deney Tasarım için deney planlanmak istenirse çizelge 2.5'te gösterildiği gibi olacaktır.

Çizelge 2.5 Box-Benhken deney tasarımı.

Deney Sayısı	Bağımsız Değişkenler		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

ANOVA Analizi, Regresyon Denklemi ve Model Özet Çizelgesi

Yanıt Yüzey Deney Tasarım Modellerinde Minitab ile analizinde 3 adet istatiksel çıktı alınmaktadır. Bunlar ANOVA Analizi, Regresyon Denklemi, Model Özet çizelgesidir.

Varyans analizi (ANOVA), iki veya daha fazla faktör seviyesi ortalamalarının eşit olduğu hipotezini test etmektedir. ANOVA testi, farklı faktör seviyelerindeki yanıt değişken ortalamalarını karşılaştırarak bir veya daha fazla faktörün önemini değerlendirir. Sıfır hipotezi, faktör seviyesi ortalamaları eşit olduğunu belirtirken, alternatif hipotez en az birinin farklı olduğunu belirtmektedir. Bir ANOVA analizini yapabilmek için, sürekli bir yanıt değişkenine ve iki veya daha fazla düzeye sahip bağımsız faktöre sahip olmak gerekmektedir.

Varyans analizi grup ortalamaları arasındaki varyansla gruplar içindeki varyansı karşılaştırarak çalışmaktadır (Minitab, 2021b). Yanıt Yüzey Yönteminde varyans analizin kullanılmasının amacı, bağımsız faktörlerin yanıt üzerindeki etkileri ortaya optimum performans elde edilecek seviyeri tespit etmek ve bu seviyeler düzeyinde oluşabilecek değişkenliği azaltarak kontrol altına almaktır. Varyans analizi, deneysel verilerin analizini ve deney için gerekli kararların verilebilmesinde kullanılmaktadır. ANOVA

çizelgesi, toplam serbestlik derecesi, kareler toplamının, ayarlanmış ortalma karelere, F değeri ve P değerinden oluşmaktadır (Savaşkan, 2003).

Çizelge 2.6 Yanıt yüzey yöntemi için örnek bir ANOVA çizelgesi.

Kaynak	**DF**	**Adj SS**	**Adj MS**	***F değeri***	***P değeri***	
Model	**9**	**975,75**	**108,417**	**3,61**	**0,029**	*****
Lineer	**3**	**611,92**	**203,974**	**6,79**	**0,009**	*****
Sıcaklık	**1**	**566,45**	**566,450**	**18,85**	**0,001**	*****
Konsantrasyon	1	44,77	44,775	1,49	0,250	
Süre	1	0,70	0,698	0,02	0,882	
Karesel	3	272,29	90,763	3,02	0,081	
Sıcaklık*Sıcaklık	1	0,00	0,002	0,00	0,994	
Konsantrasyon*Konsantrasyon	1	33,12	33,123	1,10	0,318	
Süre*Süre	1	62,74	62,738	2,09	0,179	
Etkileşim	3	93,06	31,019	1,03	0,419	
Sıcaklık*Konsantrasyon	1	82,90	82,898	2,76	0,128	
Sıcaklık*Süre	1	9,79	9,790	0,33	0,581	
Konsantrasyon*Süre	1	0,37	0,368	0,01	0,914	
Error	10	300,45	30,045			
Lack-of-Fit	5	300,45	60,090	*	*	
Pure Error	5	0,00	0,000			
Total	19	1276,20				

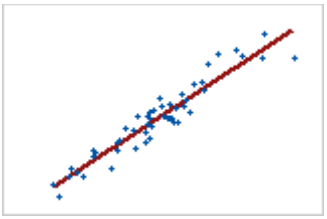
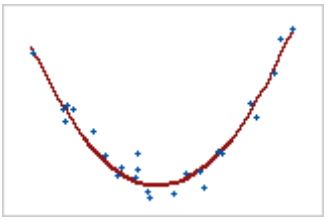
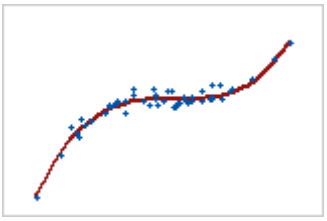
Toplam serbestlik derecesi (DF) deney verilerinizdeki bilgi miktarıdır ve örneklemdeki gözlem sayısı ile belirtmektedir. Düzeltilmiş kareler toplamı (Adj SS), model için listelenen farklı kaynaklar için değişim ölçütleridir (Minitab, 2021a). ANOVA çizelgesinde belirtilen Adj SS değerlerinin değerlendirilmesi ile sıcaklık, konsantrasyon ve süre faktörlerinin ana etkilerinin ve aralarındaki etkileşimleri incelenen sistem üzerine önemli bir etkisi olup olmadığının göstergesidir (Savaşkan, 2003). Çizelge 2.6'da görüldüğü gibi sıcaklık ana etkeni incelenen sistemde önemli etkileri bulunmaktadır. Saf hata toplamı (Adj SS Pure Error), karelerin hata toplamının bir parçasıdır. Verilerindeki değişiklikleri aynı faktör değerlerine sahip gözlemler için ölçmektedir. Toplam kareler toplamı (Adj SS Total), karelerin model toplamı ve karelerin hata toplamından oluşmaktadır. Verilerdeki toplam varyasyonu ölçmektedir. Minitab, ANOVA çizelgesindeki *p* değerlerini ve R^2 değerini hesaplamak için karelerin toplamını kullanmaktadır. Genellikle, karelerin toplamları yerine *p* değerlerini ve R^2 değerleri yorumlanmaktadır. Düzeltilmiş ortalama kareler (Adj MS), modeldeki sıralarına

bakılmaksızın, diğer tüm terimlerin modelde olduğu varsayılarak, bir terimin veya modelin ne kadar varyasyon açıkladığını ölçmektedir. Ayarlanmış kareler toplamından farklı olarak, ayarlanmış ortalama kareler, serbestlik derecelerini dikkate alır. Minitab, ANOVA çizelgesindeki *p* değerlerini ve düzeltilmiş R^2 istatistiğini hesaplamak için ayarlanmış ortalama kareleri kullanmaktadır. Genellikle, ayarlanmış ortalama kareler yerine *p* değerlerini ve düzeltilmiş R^2 değeri yorumlanmaktadır (Minitab, 2021a).

ANOVA analizinde her test için *F* değeri hesaplanmaktadır. Model için *F* değeri, modeldeki herhangi bir terimin yanıtla ilişkili olup olmadığını belirlemek için kullanılan test istatistiğidir. Bağımsız faktör terim türleri için *F* değeri, bir grup terimin yanıtla ilişkili olup olmadığını belirlemek için kullanılan test istatistiğidir. Bireysel terimler için *F* değeri terimin yanıtla ilişkili olup olmadığını belirlemek için kullanılan test istatistiğidir. Lack-of-fit (Uyumsuzluk) testi için *F* değeri, modelde bileşenlerin, süreç değişkenlerinin ve deneydeki terimlerin eksik olup olmadığını belirlemek için kullanılan test istatistiğidir (Minitab, 2021a).

Yeterince büyük bir *F* değeri, istatistiksel anlamlılığı göstermektedir. Minitab, testin istatistiksel önemini gösteren *p* değerinin hesaplanması için *F* değerini kullanmaktadır. *p* değeri, sıfır hipotezine karşı kanıtları ölçen bir olasılıktır. *p* değeri, α (0.05)'dan küçük veya eşit ise model yanıtın varyasyonunu açıkladığını göstermektedir. *p* değeri, α (0.05)'dan büyük ise model yanıttaki değişimi açıkladığı sonucuna varılmamaktadır. Böyle durumlarda yeni bir model kurulması gerekmektedir (Minitab, 2021a).

Yanıt yüzey yöntemine ait ANOVA çizelgesinde verilerin eğilimini göstermek için lineer model, karesel model veya kübik model türleri tanımlanmaktadır. Model türü, modele ait verilerin doğru tanımlanmasında ve yanıtın tahmini konusunda önemli bir faktördür. Lineer bir model, verilerde sabit bir artış veya azalma oranı bir eğri şeklinde göstermektedir. Karesel model verilerdeki eğriliği U veya ters çevrilmiş U şekli ile göstermektedir. Kübik model ise, verilerde bir tepe-vadi şekli ile göstermektedir (Minitab, 2022a).

Model Türleri	Grafikler
Lineer $Y = \beta_o + \beta_1 X$	
Karesel $Y = \beta_o + \beta_1 X + \beta_2 X^2$	
Kübik $Y = \beta_o + \beta_1 X + \beta_2 X^2 + \beta_3 X^3$	

Şekil 2.6 Yanıt yüzey yönteminide kullanılan modellerin gösterimi.

Her model türü, modeli oluşturmak için kullanılan denklemin derecesine (X değişkeninin en yüksek değerine) karşılık gelmektedir Y ise yanıtın değeridir. βo kesişimi ve $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ ise kat sayıları ifade etmektedir (Minitab, 2022a)

Yanıt Yüzey Yöntemine ait ANOVA testi ile bağımsız değişkenlerin farklı seviyelerinin yanıt üzerine etkilerinin nasıl olduğu incelenmektedir. Optimizasyon çalışmalarında, ANOVA testinden sonra deneyler sonucunda elde edilen veriler kullanarak bağımsız değişkenler ve yanıt değeri arasındaki ilişki regresyon analizi yardımı ile matematiksel formül haline getirilmektedir. Bu formüle kullanılarak optimizasyonu gerçekleştirilmektir. Deneylerle elde edilen veriler, regresyon analizi sonucunda matematiksel bir formül (Denklem 2.1) şeklinde çıktı olarak alınmaktadır. Regresyon analizi, şekil 4.2 ve şekil 4.3'de gösterildiği gibi üç boyutlu yanıt yüzey ve kontür grafikleri ile görsel hale getirilmektedir. Üç boyutlu yanıt yüzey grafiğinde iki

bağımsız değişken (X_1 ve X_2) çeşitli seviyelerinde elde edilen yanıt (% Hidroliz Derecesi) y ekseninde gösterilmektedir. Optimizasyon için önemli veri olarak iki bağımsız değişkenin yanıt üzerindeki etkileri bir yanıt yüzeyi şeklinde gösterilmektedir. Yüzey grafiği yardımıyla hedeflenen yanıtı sağlayan bağımsız faktörlere ait seviyelerin belirlenmesi mümkün olmaktadır (Savaşkan, 2003). Regresyon analizi, varyans analizi ile beraber istatistiksel problemlerin çözümlerinde kullanılmaktadır. Deney tasarım metodu uygulanarak oluşturulmuş optimizasyon deneylerinin incelenmesinde de önemli bir yeri bulunmaktadır.

Regresyon analizi, deney tasarımda bağımsız değişkenler ile yanıt arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır. Ayrıca bağımsız faktörlerin yanıt üzerindeki etkisinin ve bağımsız değişkenlerin kombinasyonu içerisinde yer almayan noktalarında tahmin edilmesini sağlamaktadır. Yapılan tahminler kontrörlerin grafikleri (Şekil 4.2) ile görsel hale getirilir (Savaşkan, 2003).

Minitab ile oluşturulan Yanıt Yüzey Modelinin regresyon analiz özeti çizelge 2.7'de olduğu gibidir. Model özet çizelgesi S değeri, R-sq R-sq(adj), R-sq(pred) değerlerinden oluşmaktadır.

Çizelge 2.7 Örnek model özeti çizelgesi.

S	*R-sq*	*R-sq(adj)*	*R-sq(pred)*
1.08757	%95.92	%92.25	%62.26

S değeri, veri değerleri ile uygun değerler arasındaki mesafenin standart sapmasını temsil etmektedir. Modelin yanıtı ne kadar iyi tanımladığını değerlendirmek için *S* değeri kullanılmaktadır. *S* değeri, yanıt değişkeninin birimlerinde ölçülür ve veri değerlerinin uygun değerlerden uzaklığını göstermektedir. *S* değeri ne kadar düşük ise, modelin yanıtı o kadar iyi tanımlanmaktadır (Minitab, 2022b).

R-sq (R^2) model tarafından açıklanabilen yanıttaki varyasyon yüzdesidir. Model tarafından açıklanmayan varyasyon toplamının modeldeki toplam varyasyon toplamına oranı ile hesaplanmaktadır. *R-sq* her zaman %0 ile %100 arasında yer almaktadır. *R-sq* değeri ne kadar yüksek olursa, kurulan model verilere o derece uyum sağlamaktadır. Tahmin edilen yanıt değerinin gerçek yanıt değerine uygunluğunu belirlemek için *R-sq*

değeri yorumlanmaktadır (Minitab, 2022b). *R-sq* değeri Ar-Ge ve mühendislik uygulamalarında %90'dan büyük olması arzu edilmektedir (Savaşkan, 2003). Düzeltilmiş R^2 (R-sq (adj), model tarafından açıklanan, gözlem sayısına göre modeldeki belirleyici sayısı için ayarlanan, cevabın yüzdesidir. Farklı sayıda tahmin ediciye sahip modelleri karşılaştırmak R-sq (adj) değeri kullanılmaktadır. Öngörülen R^2 (R-sq (pred)) modelin tahmin edilecek cevabı ne kadar iyi tahmin ettiğini belirlemek için kullanılmaktadır (Minitab, 2022b).

Literatürde optimizasyon için kullanılan Yanıt Yüzey Deney Tasarım Modellerinden Merkezi Kompozit ve Box- Behnken Deney Tasarım yöntemlerinin analizlerinde Microsoft'un geliştirmiş olduğu Minitab (Özden, 2020), herkesin kullanımına açık ve ücretsiz olarak edinilen "Essential Regression and Experimental Design" programı (Savaşkan, 2003) ve Statsoft 'un geliştirdiği STATISTICA (Korkmaz, 2018) programları kullanılabilmektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Materyalin Temini

Araştırmada, Trakya bölgesindeki mezbahalardan atık olarak değerlendirilen sığır akciğeri Hayrabolu mezbahanesinden temin edilmiştir. Akciğer örnekleri 500 g paketler halinde porsiyonlanmış ve Trakya üniversitesi Mimarlık Fakültesi Peyzaj Mimarlığı Bölümü Bitki Doku Kültürü laboratuvarında -20 °C'de depolanmıştır.

3.1.2 Kimyasal Maddeler

- Potasyum Hidroksit (Unid)
- Sülfürik Asit (Merck)
- Papain Enzimi (Enzybel)
- Folin Reaktifi (Merck)
- Bakır (II) Sülfat Pentahidrat Extra püre (Tekkim)
- Sodyum Hidroksit Payet Extra püre (Beyanlab)
- Sodyum Karbonat Extra püre (Tekkim)
- Potasyum Sodyum Tartarat (Zag Kimya)
- Bovine serum albümin (Sigma Aldrich)
- Trichloroacetic acid (Merck)

3.1.3 Kullanılan Malzemeler

Erlen mayer, piset, pens, bisturi, kurutma kağıtı, ipek elek, alümünyum folyo, mikropipet ve uçları, pastör pipeti, maske, pamuk, porselen kroze, cam deney tüpleri, eldiven, mezür, balonjoje, eldiven.

3.1.4 Araç ve Gereçler

- Spektrofotometre (Rayleigh -VIS 7220G
- Kül fırını (Nüve-MF120)
- Etüv (Thermomac-DO45)
- Manyetik Karıştırıcı (Thermomac-TM19)
- pH (Adwa- AD12)
- Hassas Terazi (Ohaus-PR224)
- Santrifüj (Elektro.mag-M815E)
- Homojenizatör (Isolab-62L1L001)

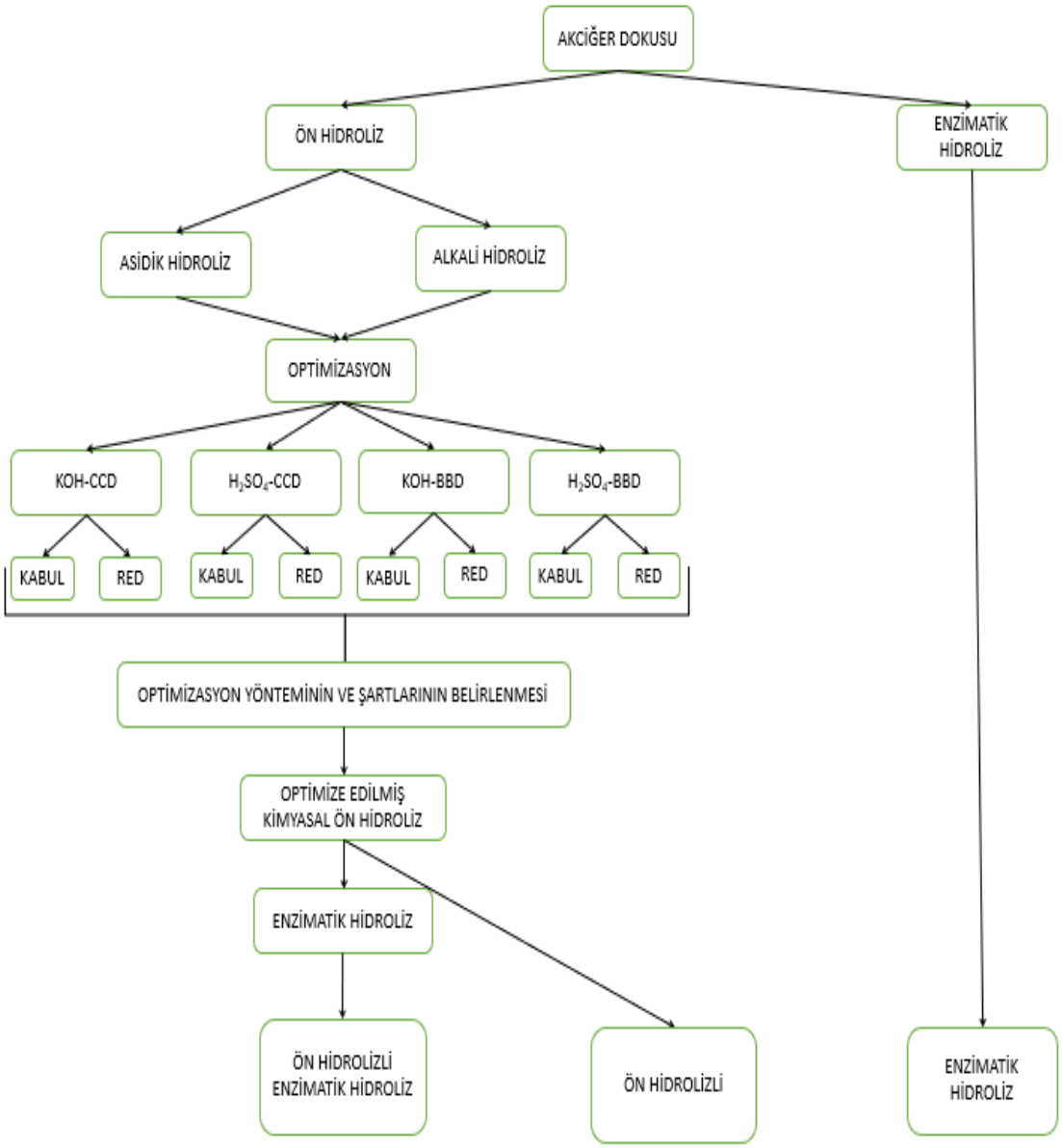
3.2 Yöntem

Bu araştırmada, akciğer dokusundan protein hidrolizatı elde etmek için şekil 3.1'de gösterilen adımlar uygulanmıştır. Enzimatik hidroliz, asidik ve alkali bazlı ön hidroliz uygulanmış enzimatik hidroliz olarak iki hidroliz prosesi planlanmıştır. Enzimatik hidrolizde belirlenen şartlarda akciğer dokusu papain enzimi kullanılarak hidroliz prosesi gerçekleştirilmiştir. Asidik ve alkali bazlı ön hidrolizli enzimatik hidroliz için, ön hidroliz koşulları Yanıt Yüzey Yöntemi kullanılarak bağımsız değişkenler optimize edilmeye çalışılmıştır. Minitab 19 bilgisayar programı ile oluşturulan deney tasarımlarından, istatiksel olarak anlamlı olan yöntem seçilerek ön hidroliz yöntemi olarak kabul edilmiştir. Kabul edilen ön hidroliz koşullarında gerçekleştirilen kimyasal hidroliz sonrasında papain enzimi kullanılarak enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidroliz, ön hidrolizli enzimatik hidroliz ve ön hidrolizden elde edilen hidrolizatlar kimyasal değerler bakımından karşılaştırılmıştır.

3.2.1 Enzimatik Hidroliz

Dondurulmuş halde 500 g paketler halinde depolanan akciğer dokusu küçük parçalar halinde parçalanmış ve oda sıcaklığında çözdürülmüştür. Küçük parçalara ayrılan akciğer 1:1 oranında distile su ile karıştırılmış ve endojen enzimlerin inaktivasyonu için 130°C'de 20 dakika etüvde bekletilmiştir. Kademeli olarak soğutulan karışımın pH'ı 6,5'e 1 M H_2SO_4 ile ayarlandıktan sonra 1:100 enzim/substrat oranında papain enzimi karıştırılarak 65°C'de 24 saat muamele edilmiştir (O'Sullivan vd., 2017). Enzimatik hidrolizin sonlandırılması için 90°C'de 20 dakika etüvde tutulmuş ve 150 µm

ipek elekten geçirilerek analizler için +4°C'de saklanmıştır. Enzimatik hidroliz ile elde edilen hidrolizatlar, ön hidroliz ve ön hidrolizli enzimatik hidrolizden elde edilecek hidrolizatlar ile karşılaştırmak için kuru madde, organik madde, kül, protein miktarı, hidroliz derecesi ve protein verimi analizleri yapılmıştır.



Şekil 3.1 Yöntem akış şeması.

3.2.2 Ön Hidroliz Deney Tasarımı

Asidik ve Alkali bazlı ön hidroliz optimizasyonu için Yanıt Yüzey Yöntemlerinden CCD ve BBD yöntemleri ile 3 faktörlü olarak tasarlanmış ve modeller

için bağımsız değişkenler X_1 (Sıcaklık 50-70-90°C), X_2 (Konsantrasyon 1-3-6 M) ve X_3 (Süre 8-16-24 saat) şartların belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 CCD ve BBD dizaynı için bağımsız değişken ve kodlanmış düzeyler.

Bağımsız Değişkenler	***Kodlanmış Düzeyler***		
	-1	**0**	**+1**
Sıcaklık (°C) X_1	50	70	90
Konsantrasyon (M) X_2	1	3	6
Süre(Saat) X_3	8	16	24

Akciğer alkali ve asidik ön hidroliz optimizasyonu için 3 faktörlü CCD için yirmi deneysel tasarım gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Bağımsız değişkenler X_1 (sıcaklık (°C)), X_2 (konsantrasyon (M)), X_3 (süre (saat)) ve kodlu değişkenler (X_1,X_2,X_3) için, CCD dizaynı.

	Kodlu Değişkenler			**Bağımsız Değişkenler**			**Yanıt**	
	X_1	X_2	X_3	x_1	x_2	x_3	**Alkali %HD**	**Asidik % HD**
1	-1	-1	-1	50	1	8	-	-
2	1	-1	-1	90	1	8	-	-
3	-1	1	-1	50	6	8	-	-
4	1	1	-1	90	6	8	-	-
5	-1	-1	1	50	1	24	-	-
6	1	-1	1	90	1	24	-	-
7	-1	1	1	50	6	24	-	-
8	1	1	1	90	6	24	-	-
9	-1	0	0	50	3	16	-	-
10	1	0	0	90	3	16	-	-
11	0	-1	0	70	1	16	-	-
12	0	1	0	70	6	16	-	-
13	0	0	-1	70	3	8	-	-
14	0	0	1	70	3	24	-	-
15	0	0	0	70	3	16	-	-
16	0	0	0	70	3	16	-	-
17	0	0	0	70	3	16	-	-
18	0	0	0	70	3	16	-	-
19	0	0	0	70	3	16	-	-
20	0	0	0	70	3	16	-	-

Akciğer alkali ve asidik ön hidroliz optimizasyonu için 3 faktörlü BBD için on beş deneysel tasarım gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Bağımsız X_1 (sıcaklık (°C)), X_2 (konsantrasyon (M)), X_3 (süre (saat)) ve kodlu değişkenler (X_1,X_2,X_3) için BBD dizaynı.

	Kodlu Değişkenler			Bağımsız Değişkenler			Yanıt	
	X_1	X_2	X_3	x_1	x_2	x_3	Alkali % HD	Asidik % HD
1	-1	-1	0	50	1	16	-	-
2	1	-1	0	90	1	16	-	-
3	-1	1	0	50	6	16	-	-
4	1	1	0	90	6	16	-	-
5	-1	0	-1	50	3	8	-	-
6	1	0	-1	90	3	8	-	-
7	-1	0	1	50	3	24	-	-
8	1	0	1	90	3	24	-	-
9	0	-1	-1	70	1	8	-	-
10	0	1	-1	70	6	8	-	-
11	0	-1	1	70	1	24	-	-
12	0	1	1	70	6	24	-	-
13	0	0	0	70	3	16	-	-
14	0	0	0	70	3	16	-	-
15	0	0	0	70	3	16	-	-

3.2.3 Asidik ve Alkali Bazlı Ön Hidroliz ve Optimizasyonu

Ön hidroliz deney tasarımı ile belirlenen koşullarda hazırlanan çözeltiler, akciğer dokusu ile 1:1 oranında karıştırılmıştır. Endojen enzimlerin inaktivasyonu için 130 °C'de 20 dakika etüvde bekletilmiştir. Daha sonra numuneler deney tasarımlarında belirlenen sıcaklık ve sürelerde kimyasal hidroliz gerçekleştirilmiştir. Hidrolizden sonra hidrolizatlar 150 µm ipek elekten geçirilerek analizler için +4 °C'de saklanmıştır. Optimizasyon yönteminde yanıt olarak hidroliz derecesi ölçülmüştür. Optimize edilmiş koşullarda gerçekleştirilecek ön hidroliz ile elde edilecek hidrolizatlar enzimatik hidroliz için hazırlanmıştır. Bunun yanında ön hidroliz ile elde edilmiş hidrolizatlar, enzimatik hidroliz ve ön hidrolizli enzimatik hidrolizden elde edilecek hidrolizatlar ile karşılaştırmak için kuru madde, organik madde, kül protein miktarı, hidroliz derecesi ve protein verimi analizleri yapılmıştır.

3.2.4 Ön Hidrolizden Sonra Enzimatik Hidroliz

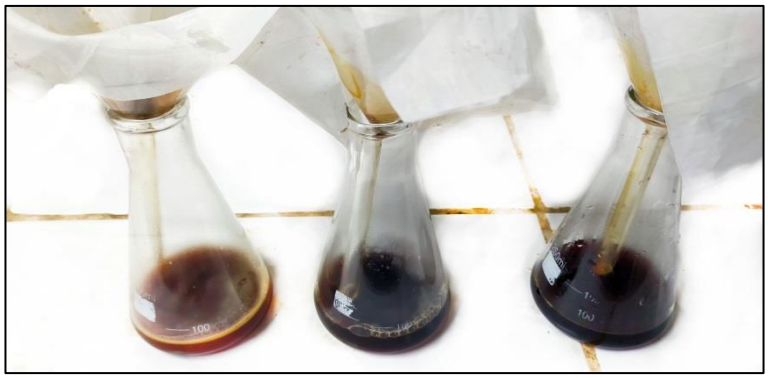
Optimizasyonda belirlenen sıcaklık ve sürede kimyasal hidroliz gerçekleştirilmiştir. Kimyasal hidrolizden sonra pH 6.5'e ayarlanarak 65 °C'de 24 saat 1/100 oranında enzim/substrat oranında papain enzimi ile enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir. Enzimatik hidrolizin sonlandırılması için 90 °C'de 20 dakika etüvde tutulmuş ve 150 µm ipek elekten geçirilerek analizler için +4 °C'de saklanmıştır. Ön hidrolizli enzimatik hidroliz ile elde edilen hidrolizatlar, enzimatik hidroliz ve ön hidrolizden elde edilen hidrolizatlar ile karşılaştırmak için kuru madde, organik madde, kül, protein miktarı, hidroliz derecesi ve protein verimi analizleri yapılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.2 Akciğerlerin parçalanması.



Şekil 3.3 Akciğerlerin hidroliz ajanları ile karıştırılması.



Şekil 3.4 Hidroliz sonrası ipek elekten süzülme.

3.2.5 Kuru Madde

Temiz ve darası alınmış porselen kroze içerisine bir miktar hidrolizat numunesi tartılmıştır. Etüv içerisine yerleştirilen numuneler 70°C sıcaklıkta sabit ağırlığa ulaşıncaya kadar kurutulmuştur. Etüvden çıkarılan numuneler desikatöre yerleştirilerek soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan numuneler tartılarak aşağıdaki formül ile kuru madde miktarı hesaplanmıştır (Kaçar, 2009).

$$\%\ Kurumadde = \frac{Son\ Tartım\ (g) - Dara(g)}{Numune\ Miktarı}\ x\ 100 \qquad (3.1)$$

3.2.6 Kül

Ham kül analizinde kullanılan porselen krozeler ilk önce 103ºC'de 1 saat süreyle etüvde kurutulup daha sonra desikatörde soğutulduktan sonra 0.1 mg duyarlı hassas terazide daraları alınmıştır. Krozeler içerisine homojenize edilmiş örnekten 3.3-5 g tartılıp bu örnekler 4 saat 550 ºC'de rengi açık gri oluncaya kadar yakılmış ve ardından desikatör içinde oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra, hassas terazide tartılmıştır (Kaçar, 2009). Örneğe ait % ham kül sonuçları aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\%\ Ham\ Kül = \frac{Son\ Tartım\ (g) - Dara\ (g)}{Numune\ Miktarı\ (g)}\ x\ 100 \qquad (3.2)$$

3.2.7 Organik Madde

Yüzde kuru madde miktarı bilinen hidrolizatın, yüzde ham kül miktarı da tespit edildikten sonra aşağıdaki formül yardımıyla % organik madde içeriği hesaplanmıştır (Kaçar, 2009).

$$\%\ Organik\ Madde = \%\ Kuru\ Madde - \%\ Ham\ Kül \quad (3.3)$$

3.2.8 Lowry Metodu İle Protein Miktarının Ölçülmesi ve Protein Standat Grafiğinin Oluşturulması

Alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının bakır iyonları ile kompleks oluşturması esasına dayanan deneyde bakır-peptid komplekslerin Folin Reaktifi ile reaksiyona girerek mavi mor renk oluşturur (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951).

Bovine serum albümini ile 1, 1.5, 2, 2.5, 3 g/L konsantrasyonlarındaki standart çözeltiler hazırlanmıştır. Mikropipet yardımı ile deney tüpleri içerisinde 200 µL standart çözeltilerden pipetlenmiştir. Deney tüplerindeki standart çözeltiler üzerine 200 µL alkali bakır çözeltisi 200 µL koyularak karanlıkta 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra deney tüplerine 800 µL dilue Folin Reaktifi eklenerek karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan mavi-mor renk spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda kör'e karşı okunmuştur. Elde edilen değerlere göre protein standart eğrisi çizilmiştir. Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.2.9 Akciğer Dokusu Protein Miktarının Belirlenmesi

Akciğer dokuları 1:1 oranında doku/distile su ile karıştırılmıştır. Daha sonra 30.000 rpm de 5 dakika homojenizatörde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve Lowry metodu kullanılarak protein analizi yapılmıştır.

3.2.10 Hidrolizatlarda Toplam Protein Miktarını Ölçülmesi

Hidroliz proseslerinden elde edilen hidrolizatlarda toplam protein miktarının belirlenmesi için hidrolizatlar 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve Lowry metodu kullanılarak protein miktar analizi yapılmıştır.

3.2.11 Hidroliz Derecesi

Hidroliz Derecesi, hidroliz sonrasında triklor asetik asitte (TCA) çözünen proteinin, toplam proteine oranlanması ile elde edilmektedir. Hidroliz sonrasında toplam

protein miktarı bilinen hidrolizatlar, %20' lik triklorasetik asitle 1:1 oranında karıştırılmış ve bu karışım 4˚C'de 30 dakika tutulduktan sonra 3.000 x g'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak Lowry metodu ile TCA'da çözünmüş halde bulunan protein miktarı analiz edilmiştir (Alemán, Giménez, Gómez-Guillén, & Montero, 2011). Hidroliz derecesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% HD = \frac{TCA'da \text{ Çözünmüş } Protein\ Miktarı}{Hidrolizatın\ Toplam\ Protein\ Miktarı} \quad (3.4)$$

3.2.12 Protein Verimi

Elde edilen protein hidrolizatlarının verimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Korkmaz, 2018):

$$Protein\ Verim = \frac{100\ gr\ hammaddeden\ elde\ edilen\ akciğer\ hidrolizatındaki\ protein\ miktarı}{100\ gr\ Akciğerdeki\ toplam\ protein\ miktarı} \quad (3.5)$$

3.2.13 İstatiksel Analizler

Optimizasyon deneyleri, Yanıt Yüzey Deney Tasarım yöntemlerinden CCD ve BBD modelleri Minitab 19 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Akciğer dokusundan elde edilen hidrolizatların kuru madde, kül, organik madde, protein miktarları ve protein verimleri Minitab 19 yazılımı kullanılarak Tukey çoklu karşılaştırma testi ($P<0.05$ önem düzeyinde One-way Anova) uygulanmıştır.

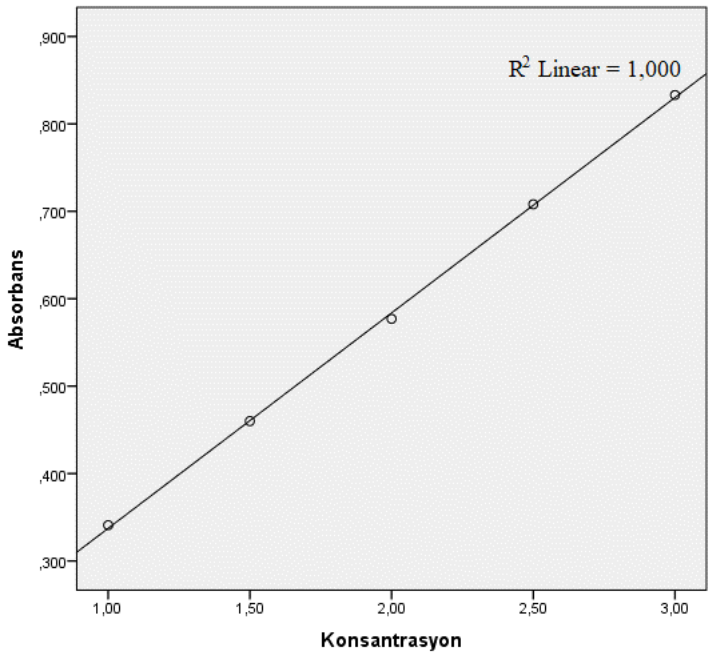
BÖLÜM 4

BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Protein Standart Grafiği

Bovine serum albümini ile 1, 1.5, 2, 2.5, 3 g/L konsantrasyonlarındaki standart çözeltileri ikişer kez çalışılarak protein standart eğrisi çizilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda protein kalibrasyon eğrisinin denklemi ve şekil 4.1'de verilmiştir.

y = 0.09+0.25x



Şekil 4.1 Protein standart grafiği.

4.2. Enzimatik Hidroliz

Protein kaynaklarının papain ile enzimatik hidrolizi ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur.

Çin Mersin balık artıklarını papain enzimi kullanarak 70°C sıcaklıkta, pH 6'da, %3 enzim/substrat oranında, 6 saat şartlarında enzimatik hidroliz gerçekleştirilmiştir.

Hidroliz sonrası analiz edilen hidroliz derecesi %24.89 olarak tespit edilmiştir (Noman vd., 2018).

Gölet çopra balığını (*Misgurnus anguillicaudatus)* enzimatik hidrolize tabi tutulduğu çalışmada, enzimatik hidrolizde papain ve protamex enzmimleri kullanılmıştır. Papain hidrolizinde sırasıyla sıcaklık, pH, zaman ve enzim subtratrat oranları 55°C, 7.2 saat, %0.26 şartlarında elde ettikleri hidrolizatlarda %18 oranında hidroliz derecesi tespit edilmiştir. Aynı çalışmada sırasıyla sıcaklık ve pH sabit tutularak sırasıyla zaman ve enzim substrat oranlarını 4-6-20 saat, %0.28-%0.30, %0.32 şartlarında %23-28-33 hidroliz derecesi tespit edilmiştir (You, Zhao, Cui, Zhao, & Yang, 2009).

Papain enzimi kullanarak akciğerin enzimatik hidroliz çalışmasında, akciğer dokusunu pH 6.5'te 65 °C sıcaklıkta, 1:100 enzim/substrat oranında 24 saat enzimatik hidrolize gerçekleştirilmiştir. Hidroliz sonrasında hidrolizatta %6.4 oranında hidroliz derecesi tespit edilmiştir (Lafarga & Hayes, 2017).

Yapılan bu tez çalışmasında akciğerlerin papain ile enzimatik hidrolizi için pH'ı 6.5'e 1 M H_2SO_4 ile ayarlandıktan sonra 1:100 enzim/substrat oranında papain enzimi karıştırılarak 65 °C'de 24 saatte hidroliz gerçekleştirimiştir. Hidroliz sonrasında hidrolizatlarda %15.98 ± 1.471 hidroliz derecesi tespit edilmiştir. Akciğerin papain ile enzimatik hidroliz ile elde edilen hidrolizatlara ait düşük hidroliz derecesi, Lafarga vd. (2017) yapmış olduğu çalışma ile uyum göstermektedir.

4.3. Ön Hidroliz Optimizasyonu

Akciğerlerden protein hidrolizat üretimi ile ilgili çalışmalarda hidrolizat deneyleri sonucunda belirlenen en uygun sıcaklık, konsantrasyon ve süre aralıkları dikkate alınarak, CCD ve BBD modellerine göre yapılmıştır. Önerilen matematiksel modeller varyans analizi ve regrasyon istatistiksel yöntemi ile değerlendirilmiştir. Yöntemde deneysel çalışma aralıkları olarak en düşük sıcaklık değeri 50°C, en yüksek sıcaklık değeri olarak 90°C, en düşük ajan konsantrasyonu 1 M KOH ve H_2SO_4, en yüksek ajan konstrasyonu 6 M KOH ve H_2SO_4, en düşük süre 8 saat, en yüksek süre 24 saat olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada kimyasal hidroliz için kullanılan KOH ve H_2SO_4 ile hidrolizasyon çalışması, üç bağımsız değişken (sıcaklık, konsantrasyon, süre) üç düzeyli (-1,0,1) olarak analiz edilmiştir. CCD ve BBD dizaynları kullanılarak belirlenen sıcaklık, konsantasyon

ve süre bağımsız değişkenlerine karşı, yanıt değişkenleri, deneysel ve yöntem tarafından öngörülen hidroliz derecesi (HD) çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 CCD ile modellenmiş akciğer artıklarında alkali ve asidik hidroliz ile bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler yanıt değişkeni; CCD-Y_{Al} Alkali ön hidroliz derecesi (% HD), CCD-Y_{As}: Asidik ön hidroliz derecesi.

	X_1 (Sıcaklık °C)	X_2 (Konsantrasyon M)	X_3 (Süre Saat)	CCD-Y_{Al}	CCD-Y_{As}
1	50	1	8	63,2	82,12
2	90	1	8	80,27	94,61
3	50	6	8	70,04	83,96
4	90	6	8	86,68	94,85
5	50	1	24	54,19	82,2
6	90	1	24	89,68	94,56
7	50	6	24	74,07	84,56
8	90	6	24	81,14	92,22
9	50	3	16	81,76	83,7
10	90	3	16	82,11	90,16
11	70	1	16	80,61	88,59
12	70	6	16	77,18	90,71
13	70	3	8	77,91	92,06
14	70	3	24	76,46	90,41
15	70	3	16	83,05	89,25
16	70	3	16	83,05	89,25
17	70	3	16	83,05	89,25
18	70	3	16	83,05	89,25
19	70	3	16	83,05	89,25
20	70	3	16	83,05	89,25

Akciğerin ön hidroliz optimizasyonunda CCD ile oluşturulmuş alkali hidrolize ait ANOVA analizi çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelge 4.2'da görüldüğü gibi CCD ile oluşturulan alkali hidroliz deneylerinde, Model F değer 3.61 modelin anlamlı olduğunu ifade etmektedir. 0.029 p değeri 0.05'ten küçük olması model terimlerinin anlamlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2 KOH kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, ajan konstrasyonu, süreden etkilenen HD'nin CCD ile hesaplanan ANOVA çizelgesi.

Kaynak	**DF**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Value**	**P-Value**	
Model	**9**	**975,75**	**108,417**	**3,61**	**0,029**	*
Lineer	**3**	**611,92**	**203,974**	**6,79**	**0,009**	*
Sıcaklık	**1**	**566,45**	**566,450**	**18,85**	**0,001**	*
Konsantrasyon	1	44,77	44,775	1,49	0,250	
Süre	1	0,70	0,698	0,02	0,882	
Karesel	3	272,29	90,763	3,02	0,081	
Sıcaklık*Sıcaklık	1	0,00	0,002	0,00	0,994	
Konsantrasyon*Konsantrasyon	1	33,12	33,123	1,10	0,318	
Süre*Süre	1	62,74	62,738	2,09	0,179	
Etkileşim	3	93,06	31,019	1,03	0,419	
Sıcaklık*Konsantrasyon	1	82,90	82,898	2,76	0,128	
Sıcaklık*Süre	1	9,79	9,790	0,33	0,581	
Konsantrasyon*Süre	1	0,37	0,368	0,01	0,914	
Error	10	300,45	30,045			
Lack-of-Fit	5	300,45	60,090	*	*	
Pure Error	5	0,00	0,000			
Total	19	1276,20				

Çizelge 4.2'da görüldüğü gibi CCD ile akciğer artıklarınının alkali hidroliz parametreleri optimizasyonunda, 0.009 p değeri ile lineer model önerilmiştir. Lineer model terimlerinden hidroliz derecesi üzerine 0.001 p değeri ile sıcaklık faktörü istatiksel olarak anlamlı bulunurken, konsantrasyon ve süre terimleri önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Modelin R^2 değeri çizelge 4.3'de verilmiştir. Minitab 19 programı ile hesaplanan R^2 değeri %76.46 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre CCD modelinde kullanılan bağımsız değişkenler yanıttaki varyasyonunun %76.46'ini açıklayabilmektedir. %23.54 'lik kısım modelde yer almayan diğer bağımsız değişkenlerden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.3 KOH kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, konstrasyon, süreden etkilenen HD'nin CCD ile hesaplanan R^2 ve düzeltilmiş R^2 çizelgesi.

S	**R-sq**	**R-sq(adj)**	**R-sq(pred)**
5.48134	76.46%	55.27%	0.00%

ANOVA testinde 0,029 p değeri 0,05'ten küçük olmasına rağmen, R^2 değeri %95'ten küçük olduğundan dolayı hidroliz optimizasyonu için uygun olmadığı kararına varılmıştır.

Akciğerin ön hidroliz optimizasyonunda CCD modeli ile oluşturulmuş asidik hidrolize ait ANOVA analizi çizelge 4.4'de verilmiştir. CCD ile oluşturulan asidik hidroliz deneylerinde, Model F değer 26.12 modelin anlamlı olduğunu ifade etmektedir. 0.00000856 p değeri 0.05'ten küçük olması model terimlerinin anlamlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4 H_2SO_4 kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, konstrasyon, süreden etkilenen HD'nin CCD ile hesaplanan ANOVA çizelgesi.

Kaynak	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Model	**9**	**278,090**	**30,899**	**26,12**	**0,00000856**	*****
Lineer	**3**	**248,533**	**82,844**	**70,04**	**0,00000051**	*****
Sıcaklık	**1**	**245,354**	**245,354**	**207,43**	**0,00000005**	*****
Konsantrasyon	1	1,781	1,781	1,51	0,24791693	
Süre	1	1,398	1,398	1,18	0,30242953	
Karesel	**3**	**20,951**	**6,984**	**5,90**	**0,01384079**	*****
Sıcaklık*Sıcaklık	**1**	**18,125**	**18,125**	**15,32**	**0,00289194**	*****
Konsantrasyon*Konsantrasyon	1	0,013	0,013	0,01	0,91952287	
Süre*Süre	**1**	**8,304**	**8,304**	**7,02**	**0,02432758**	*****
Etkileşim	3	5,733	1,911	1,62	0,24720172	
Sıcaklık*Konsantrasyon	1	3,886	3,886	3,28	0,10000082	
Sıcaklık*Süre	1	1,411	1,411	1,19	0,30032436	
Konsantrasyon*Süre	1	0,436	0,436	0,37	0,55710444	
Error	10	11,828	1,183			
Lack-of-Fit	5	11,828	2,366	*	*	
Pure Error	5	0,000	0,000			
Total	19	289,918				

Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi CCD ile akciğer artıklarınının asidik hidroliz parametreleri optimizasyonunda 0.00000051 p değeri ile lineer model ve 0.01384079 p değeri ile kübik model önerilmiştir. Lineer model terimlerinden hidroliz derecesi üzerine 0.00000005 p değeri ile sıcaklık faktörü istatiksel olarak anlamlı bulunurken, konsantrasyon ve süre terimlerin önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Kübik Model terimlerinden hidroliz derecesi üzerine 0.01384079 p değeri ile Sıcaklık*Sıcaklık

ve 0.02432758 p değeri ile Süre*Süre interaksiyonu istatiksel olarak önemli iken, Konsantrasyon*Konsantrasyon interaksiyonu önemsiz etkiye sahip olduğu bulunmuştur.

Modelin R^2 değeri çizelge 4.5'de verilmiştir. Minitab 19 programı ile hesaplanan R^2 değeri %95.92 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre Merkezi Kompozit Deney Tasarım modelinde kullanılan bağımsız değişkenler yanıttaki varyasyonun %95.92'ini açıklayabilmektedir. %4.08 'lik kısım modelde yer almayan diğer bağımsız değişkenlerden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.5 H_2SO_4 kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, konstrasyon, süreden etkilenen HD'nin CCD ile hesaplanan R^2 ve düzeltilmiş R^2 çizelgesi.

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.08757	95.92%	92.25%	62.26%

ANOVA testinde 0.00000856 p değeri 0.05'ten küçük olması ve R^2 değeri %95'ten büyük olması nedeniyle hidroliz optimizasyonu için uygun olduğu kararına varılmıştır.

Modele ait regresyon analizi aşağıda verilmiştir:

$$\text{Asidik \% HD} = 40{,}88 + (1{,}237 * X_1) + (1{,}25 * X_2) - (0{,}691 * X_3) - (0{,}00642 * X_1 * X_1) + (0{,}011 * X_2 * X_2) + (0{,}0272 * X_3 * X_3) - (0{,}01388 * X_1 * X_2) - (0{,}00262 * X_1 * X_3) - (0{,}0116 * X_2 * X_3)$$

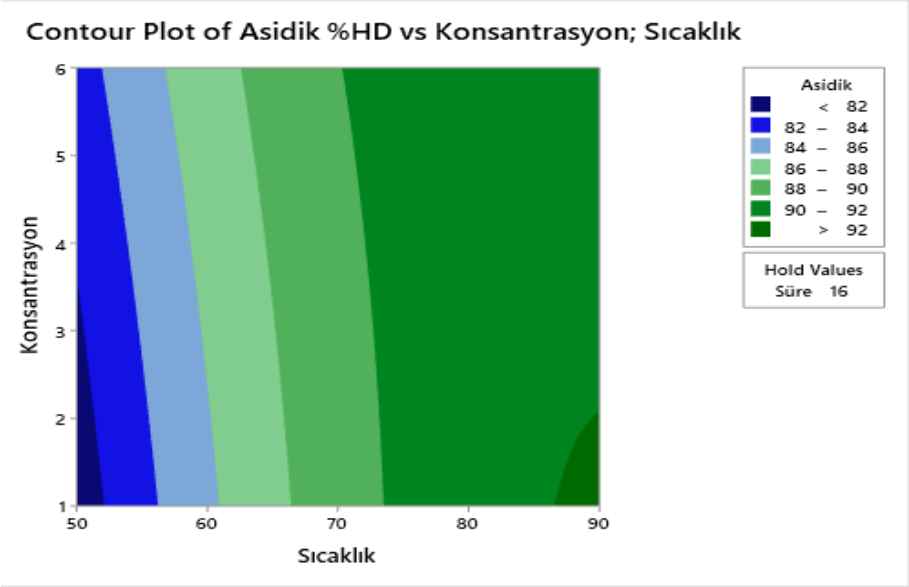
Regresyonun doğrulanmasında Minitab 19 programı ile hesaplanan tahmini hidroliz dereceleri ile deneysel gözlemlerden elde edilen hidroliz dereceleri oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Akciğer artıklarından H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidrolizasyonda HD için karşılık gelen tahmini değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlemlenen hidroliz dereceleri.

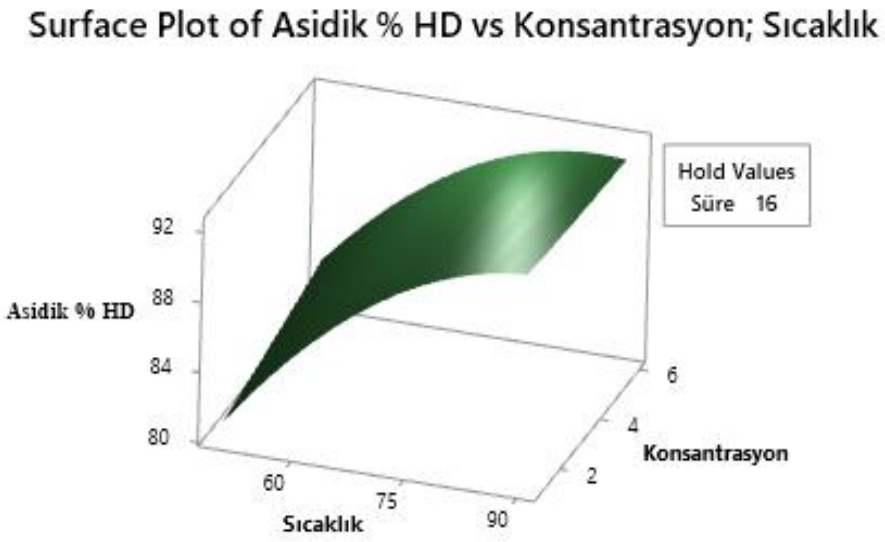
	X_1 (Sıcaklık °C)	X_2 (Konsantrasyon M)	X_3 (Süre Saat)	Tahmini Değer	Deneysel Gözlem
1	50	1	8	82,31	82,12
2	90	1	8	94,46	94,61
3	50	6	8	85,01	83,96
4	90	6	8	94,38	94,85
5	50	1	24	82,87	82,2
6	90	1	24	93,34	94,56
7	50	6	24	84,64	84,56
8	90	6	24	92,33	92,22

9	50	3	16	81,68	83,7
10	90	3	16	91,87	90,16
11	70	1	16	89,07	88,59
12	70	6	16	89,92	90,71
13	70	3	8	91,41	92,06
14	70	3	24	90,75	90,41
15	70	3	16	89,34	89,25
16	70	3	16	89,34	89,25
17	70	3	16	89,34	89,25
18	70	3	16	89,34	89,25
19	70	3	16	89,34	89,25
20	70	3	16	89,34	89,25

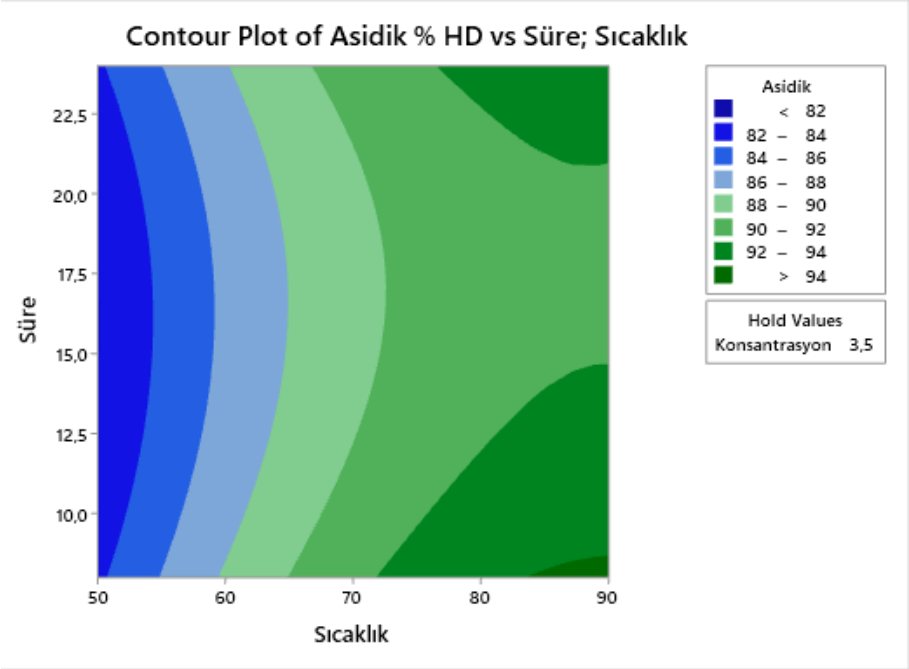
Çizelge 4.6'da verilen regresyon formülünün grafiksel gösterimi olan 3 boyutlu Cevap Yüzeyleri Minitab 19 programı kullanılarak elde edilmiştir (Şekil 4.2-3-4-5-6-7).



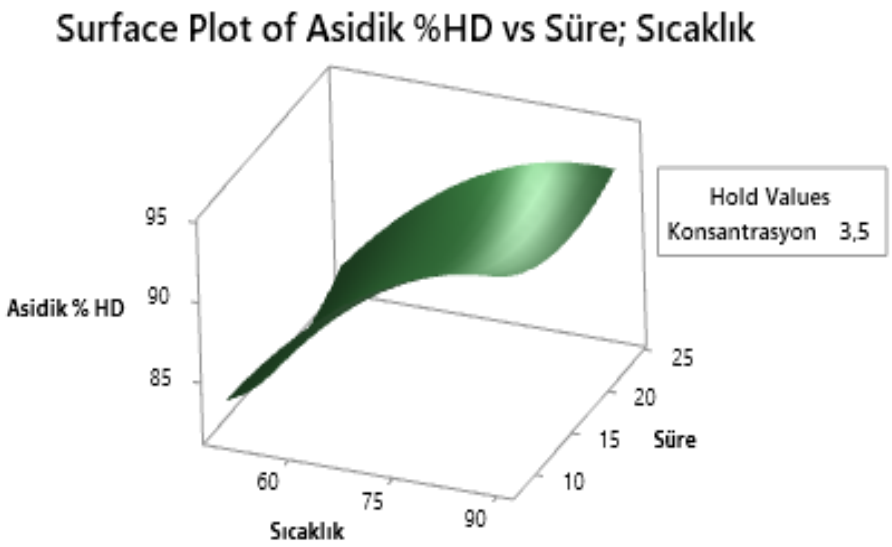
Şekil 4.2 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile konstrasyon ve sıcaklık değişimini gösteren kontür grafiği.



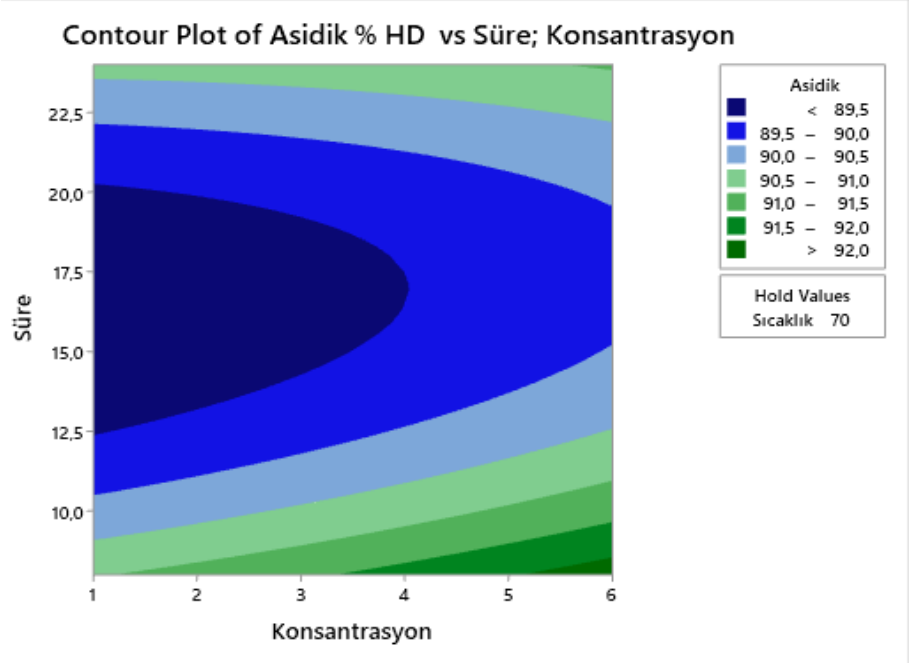
Şekil 4.3 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile konstrasyon ve sıcaklık değişimini gösteren üç boyutlu grafik.



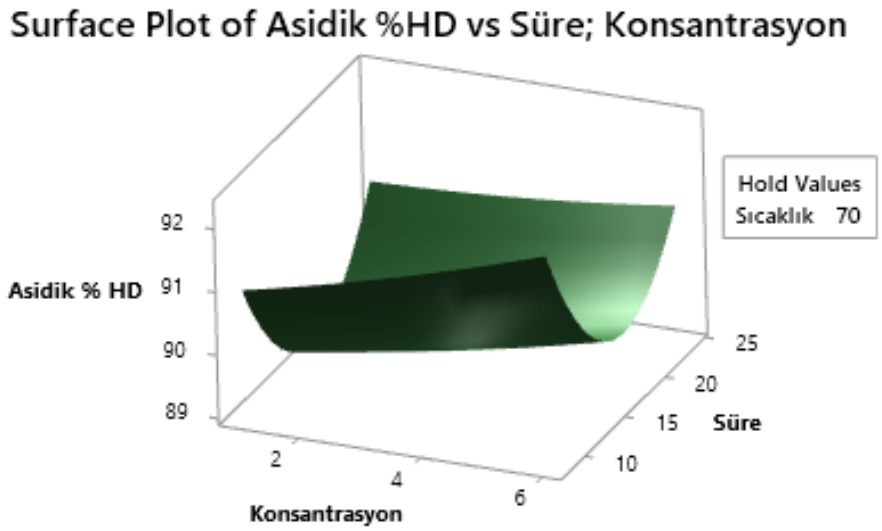
Şekil 4.4 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile süre ve sıcaklık değişimini gösteren kontür grafiği.



Şekil 4.5 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile süre ve sıcaklık değişimini gösteren üç boyutlu grafik.



Şekil 4. CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile süre ve konsantrasyon değişimini gösteren kontür grafiği.



Şekil 4.7 CCD ile akciğer artıklarında H_2SO_4 kullanılarak asidik ön hidroliz ile süre ve konsantrasyon değişimini gösteren üç boyutlu grafik.

BBD modeli kullanılarak belirlenen sıcaklık, ajan konsantrasyonu ve süre bağımsız değişkenlerine karşı, yanıt değerinin deneysel gözlem hidroliz dereceleri çizelge 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 BBD ile modellenmiş akciğer artıklarında alkali ve asidik hidroliz ile bağımsız değişken seviyeleri ile birlikte gözlemlenen değerler yanıt değişkeni; BBD-Y_{Al} Alkali hidroliz derecesi, BBD-Y_{As}: Asidik hidroliz derecesi.

X_1 (Sıcaklık °C)	X_2 (Konsantrasyon M)	X_3 (Süre Saat)	BBD-Y_{al}	BBD-Y_{as}
50	1	16	57,5	86,85
90	1	16	65,61	85,36
50	6	16	81,23	92,49
90	6	16	88,54	96,99
50	3	8	80,37	82,09
90	3	8	88,87	96,29
50	3	24	79,86	92,26
90	3	24	65,58	97,56
70	1	8	74,94	92,34
70	6	8	83,11	87,91
70	1	24	90,82	93,63
70	6	24	79,46	84,77
70	3	16	83,05	89,25
70	3	16	83,05	89,25
70	3	16	83,05	89,25

Akciğerin ön hidroliz optimizasyonunda BBD modeli ile oluşturulmuş alkali hidrolize ait ANOVA analizi çizelge 4.8'de verilmiştir. BBD modeli ile oluşturulan alkali

hidroliz deneylerinde, lineer model ve kübik model istatiksel ve bunlara ait terimler istatiksel olarak önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.8 KOH kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, ajan konstrasyonu, süreden etkilenen HD'nin ANOVA çizelgesi (BBD).

Kaynak	**DF**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Value**	**P-Value**
Model	9	678,17	75,352	0,67	0,717
Lineer	3	274,68	91,561	0,81	0,538
Sıcaklık	1	12,01	12,013	0,11	0,757
Konsantrasyon	1	236,21	236,205	2,10	0,207
Süre	1	26,47	26,466	0,24	0,648
Karesel	3	248,11	82,702	0,74	0,574
Sıcaklık*Sıcaklık	1	161,87	161,874	1,44	0,284
Konsantrasyon*Konsantrasyon	1	66,89	66,893	0,60	0,475
Süre*Süre	1	18,55	18,547	0,17	0,701
Etkileşim	3	192,33	64,111	0,57	0,658
Sıcaklık*Konsantrasyon	1	0,43	0,427	0,00	0,953
Sıcaklık*Süre	1	129,73	129,732	1,15	0,332
Konsantrasyon*Süre	1	62,17	62,174	0,55	0,490
Error	5	561,99	112,398		
Lack-of-Fit	3	561,99	187,331	*	*
Pure Error	2	0,00	0,000		
Total	14	1240,16			

Modelin R^2 değeri çizelge 4.9'da verilmiştir. Minitab 19 programı ile hesaplanan R^2 değeri %54.68 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre BBD modelinde kullanılan bağımsız değişkenler yanıttaki varyasyonunun %54.68'ini açıklayabilmektedir. %45.32'lik kısım modelde yer almayan diğer bağımsız değişkenlerden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.9 KOH kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, ajan konstrasyonu, süreden etkilenen HD'nin CCD ile hesaplanan R^2 ve düzeltilmiş R^2 çizelgesi (BBD).

S	**R-sq**	**R-sq(adj)**	**R-sq(pred)**
10.6018	54.68%	0.00%	0.00%

ANOVA çizelgesindeki modele ait p değeri 0.05'ten büyük olması ve R^2 değerinin %95'ten küçük olması sebebiyle akciğerin alkali hidroliz optimizasyonu için kullanılan BBD modelinin uygun olmadığına karar verilmiştir.

Akciğerin ön hidroliz optimizasyonunda BBD modeli ile oluşturulmuş asidik hidrolize ait ANOVA analizi çizelge 4.3:10'da verilmiştir. BBD modeli ile oluşturulan asidik hidroliz deneylerinde, lineer model ve kübik model istatiksel ve bunlara ait terimler istatiksel olarak önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Çizelge 4.10 H_2SO_4 kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, konstrasyon, süreden etkilenen HD'nin ANOVA çizelgesi (BBD)

Kaynak	**DF**	**Adj SS**	**Adj MS**	**F-Value**	**P-Value**
Model	9	126,393	14,0437	0,40	0,888
Lineer	3	77,662	25,8874	0,74	0,570
Sıcaklık	1	66,906	66,9062	1,92	0,224
Konsantrasyon	1	1,980	1,9800	0,06	0,821
Süre	1	8,776	8,7760	0,25	0,637
Karesel	3	17,610	5,8700	0,17	0,913
Sıcaklık*Sıcaklık	1	11,699	11,6987	0,34	0,587
Konsantrasyon*Konsantrasyon	1	1,812	1,8121	0,05	0,829
Süre*Süre	1	3,841	3,8415	0,11	0,753
Etkileşim	3	32,550	10,8500	0,31	0,817
Sıcaklık*Konsantrasyon	1	4,619	4,6187	0,13	0,730
Sıcaklık*Süre	1	19,803	19,8025	0,57	0,485
Konsantrasyon*Süre	1	8,129	8,1289	0,23	0,649
Error	5	173,936	34,7872		
Lack-of-Fit	3	173,936	57,9786	*	*
Pure Error	2	0,000	0,0000		
Total	14	300,329			

Modelin R^2 değeri çizelge 4.11'de verilmiştir. Minitab 19 programı ile hesaplanan R^2 değeri %42.08 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre BBD modelinde kullanılan bağımsız değişkenler yanıttaki varyasyonunun %42.08'ini açıklayabilmektedir. %57.92 'lik kısım modelde yer almayan diğer bağımsız değişkenlerden kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.11 H_2SO_4 kullanılarak akciğer artıklarında yapılan optimizasyon deneyleri sırasında sıcaklık, konstrasyon, süreden etkilenen HD'nin BBD ile hesaplanan R^2 ve düzeltilmiş R^2 çizelgesi (BBD).

S	**R-sq**	**R-sq(adj)**	**R-sq(pred)**
5,89806	42,08%	0,00%	0,00%

ANOVA çizelgesindeki modele ait p değeri 0.05'ten büyük olması ve R^2 değerinin %95'ten küçük olması sebebiyle akciğerin asidik hidroliz optimizasyonu için kullanılan BBD modelinin uygun olmadığına karar verilmiştir.

CCD ve BBD ile tasarımı yapılmış ön hidroliz optimizasyon deneylerinin karar çizelgesi çizelge 4.12'da verilmiştir.

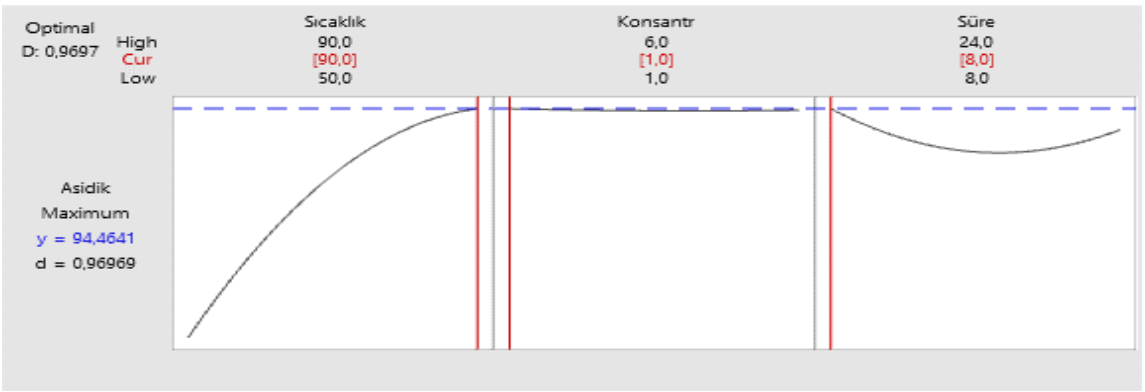
Çizelge 4.12 CCD ve BBD ile tasarımı yapılmış optimizasyon deneylerinin karar çizelgesi.

Ön Hidroliz Ajanı	Deney Tasarımı	ANOVA Model p Değeri	Modele Ait R^2 Değeri	Karar
KOH	CCD	0.029	%76.46	RED
H_2SO_4	**CCD**	**0.00000856**	**%95.92**	**KABUL**
KOH	BBD	0.717	%54.68	RED
H_2SO_4	BBD	0.888	%42.08	RED

Karar çizelgesinde gösterildiği gibi ANOVA testinde modele ait 0.00000856 p değeri 0,05'ten küçük olması, R^2 değeri %95'ten büyük olması sebebiyle ön hidroliz optimizasyonu için en uygun tasarım modelinin CCD ile oluşturulmuş asidik hidroliz olduğu kararına varıldıktan sonra parametreler için optimizasyon aşamasına geçilmiştir. Optimizasyon sonuçları çizelge 4.13'de verilmiştir. X_1 Sıcaklık faktörü için 90°C, X_2 Ajan Konsantrasyonu faktörü için 1 M, X_3 süre faktörü için 8 saat optimum değerler olarak bulunmuştur. Yanıt Yüzey Yöntemi ile elde edilen ön hidroliz optimizasyon kombinasyonları şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.13 Akciğer artıklarında H_2SO_4 ile yapılan ön hidrolizasyon için optimumu koşullar, HD için tahmini değer ve doğrulama deneyleri sırasında gözlenen HD (%).

Ön Hidroliz Ajanı	Optimum Koşullar			Deneysel Gözlem HD (%)	Tahmini Değer HD (%)
	X_1 Sıcaklık (°C)	X_2 Konsantrasyon (M)	X_3 Süre (Saat)		
H_2SO_4	90	1 M	8	94.61	94.46



Şekil 4.8 Yanıt yöntemi ile elde edilen ön hidroliz optimizasyon kombinasyonları.

Balık artıklarının asidik hidroliz prosesinin optimizasyonunu incelendiği çalışmada, asidik hidroliz için optimum şartların 100 °C'de, 4 mol/L hidrokloril asit ve 90 dakika olduğunu ve bu şartlarda %50.70 hidroliz derecesi elde edildiğini bildirmiştir (Wisuthiphaet vd., 2016).

İran mersin balığı (*Acipenser persicus)* iç organları kullanarak asidik hidroliz ile protein hidrolizatı elde ettikleri çalışmada, pH 3.3, sıcaklık 85 °C'de 18 saat hidroliz şartlarında elde ettikleri hidrolizatlara ait hidroliz derecesini %68.87 olarak tespit edilmiştir (Ovissipour, Safari, Motamedzadegan, & Shabanpour, 2012).

Yapılan bu tez çalışmasında akciğerlerin CCD modeli ile oluşturulan asidik ön hidroliz için belirlenen optimum koşullar (90°C-1M H_2SO_4-8 saat) altında gerçekleştirilen kimyasal hidroliz gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hidrolizatlarda %94,61 oranında hidroliz derecesi tespit edilmiştir. Akciğerin H_2SO_4 kullanılarak yapılan kimyasal ön hidroliz ile elde edilen hidrolizatlara ait hidroliz derecesi literatürde belirtilen hidroliz derecelerine göre yüksek bulunmuştur. Bu yüksek hidroliz derecesinin, hidroliz prosesindeki sıcaklık, süre, ajan cinsi, ajan konstrasyonu ve kullanılan protein kaynağının farklı olmasından dolayı kaynakladığı düşünülmektedir.

4.4. Ön hidrolizli Enzimatik Hidroliz

Optimize edilmiş ön hidroliz şartları olarak belirlenen 90°C'de 1 M H_2SO_4 ajan konsantrasyonunda 8 saat süre ile akciğer dokusu kimyasal hidroliz edildikten sonra pH 6 M KOH ile 6.5'e ayarlanmış ve 65°C'de 1/100 enzim/substrat oranında 24 saat enzimatik hidrolize tabii tutulmuştur. Elde edilen hidrolizatlara ait hidroliz derecesi 94.731±1.983 olarak tespit edilmiştir.

4.5. Protein Verimi

İran mersin balığı (*Acipenser persicus)* iç organları kullanarak asidik hidroliz ile protein hidrolizatı elde ettikleri çalışmada pH 3.3, sıcaklık 85°C'de 18 saat hidroliz şartlarında elde ettikleri hidrolizatlara ait verim değerini %83.64 olarak tespit edilmiştir (Ovissipour vd., 2012).

Kapelin balığını farklı enzimler kullanarak enzimatik olarak hidroliz edildiği çalışmada, papain enzimi ile elde edilen hidrolizatlarda %57.1 oranında verim sağlanmıştır (Shahidi, Han, & Synowiecki, 1995).

Bu çalışmada verim hesaplamada kullanılmak için analiz edilen akciğer dokusunda 1/1 oranında hazırlanmış homojenatta 119 g/L protein tespit edilmiştir. Papain kullanılarak elde edilen akciğer protein hidrolizatında verim %48.017±1.098, ön hidrolizde %85.933±0.654 ve ön hidrolizli enzimatik hidrolizde ise %86.830±1.386 verim tespit edilmiştir. Bu bağlamda hidrolizatların protein verimi literatür ile uyumludur.

4.6. Enzimatik ve Ön hidrolizli Enzimatik Hidroliz ve Ön Hidroliz ile elde Edilen Hidrolizatların Karşılaştırılması

Enzimatik, ön ve ön hidrolizli enzimatik hidroliz elde edilen hidrolizatların hidroliz derecesi, protein miktarı, kuru madde, organik madde, kül ve verim karşılaştırılması çizelge 4.14'de verilmiştir.

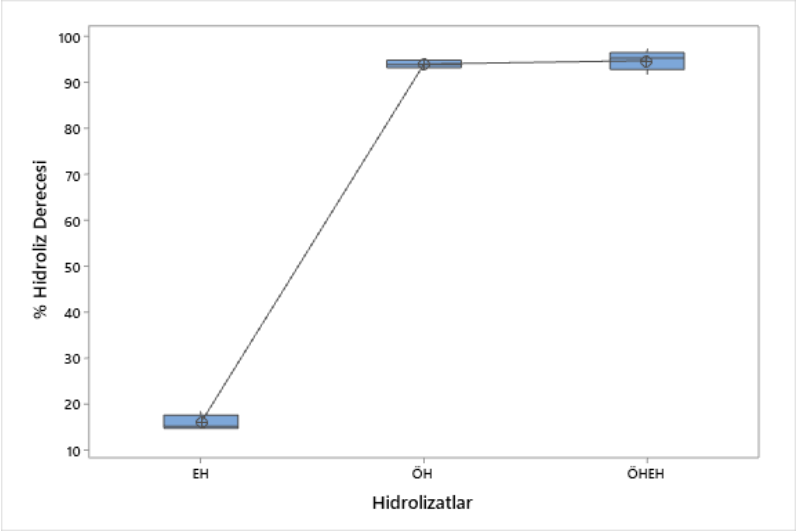
Çizelge 4.14 Hidrolizatlara ait HD, protein miktarı, % kuru madde, % organik madde, % kül ve % verim sonuçları.

HİDROLİZAT (N)	HD	PROTEİN MİKTARI G/L	KURU MADDE%	ORGANİK MADDE %	KÜL %	VERİM %
EH (10)	15.9±1.47	57.1±1.307^{c}	6.3±0.091	6.02±0.02	0,33±0,1	48.01±1.0
ÖH (10)	94.0±0.848^{a}	102.2±0.778^{a}	16.8±0.13^{ab}	16.5±0,129^{a}	0,3±0.010	85.9±0.654^{a}
ÖHEH (10)	94.7±1.983^{a}	103.3±1.649^{a}	16.7±0.050^{a}	16.4±0.140^{a}	0.2±0.158	86.8±1.386^{a}

İstatiksel analiz tek yönlüVaryans Analizi yöntemi ile yapılmıştır.

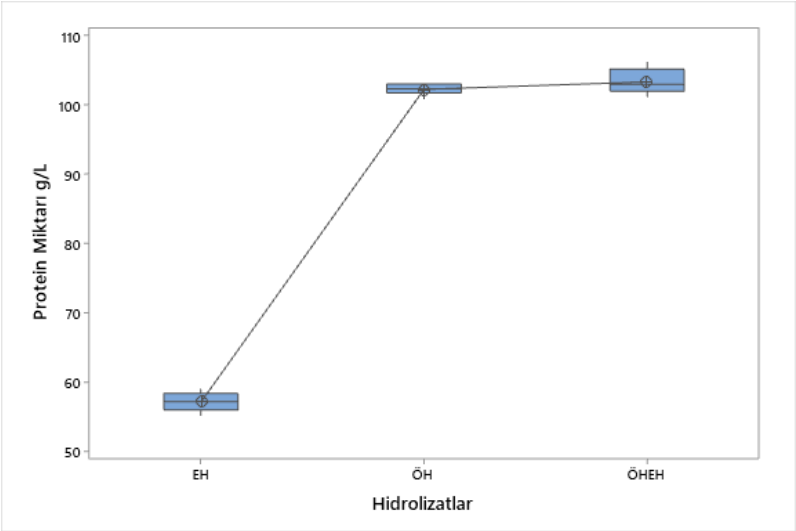
a: $p<0.05$ enzimatik hidroliz yöntemi ile elde edilen hidrolizat grubuna göre karşılaştırma yapıldı.
b: $p<0.05$ ön hidroliz yöntemi ile elde edilen hidrolizat grubuna göre karşılaştırma yapıldı.

Deneyler sonucunda elde edilen hidrolizatlar da hidroliz derecesi bakımından ön hidrolizli enzimatik hidrolizde ve ön hidroliz proseslerinde enzimatik hidroliz prosesine göre anlamlı derecede yükselme gözlemlenmiştir. Ön hidrolizli enzimatik hidroliz ve ön hidrolizde hidroliz derecesi bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Hidrolizatların hidroliz derecesi sonuçlarına ait boxplot gösterimi şekil 4.9'da verilmiştir.



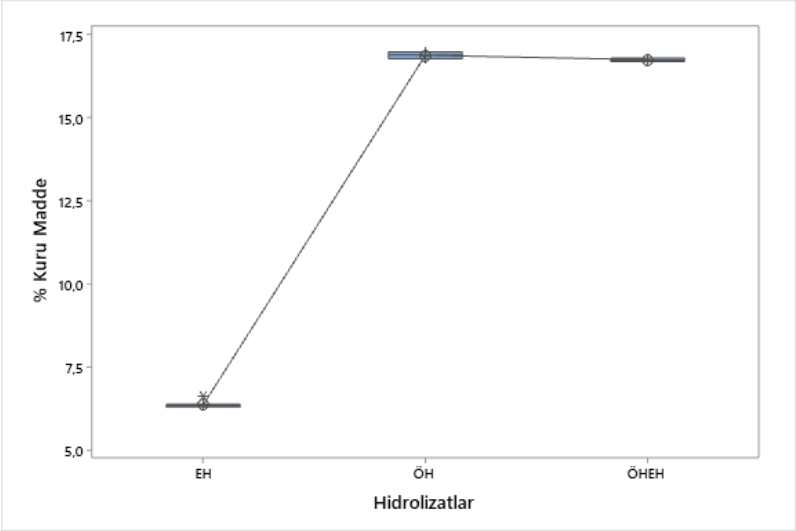
Şekil 4.9 Hidroliz derecesi sonuçlarına ait boxplot gösterimi.

Protein miktarları bakımından ön hidrolizli enzimatik hidrolizde ve ön hidroliz proseslerinde enzimatik hidroliz prosesine göre anlamlı derecede yükselme gözlemlenmiştir. Ön hidrolizli enzimatik hidroliz ve ön hidrolizde hidroliz derecesi bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Hidrolizatların protein miktarları sonuçlarına ait boxplot gösterimi şekil 4.10'da gösterilmiştir.



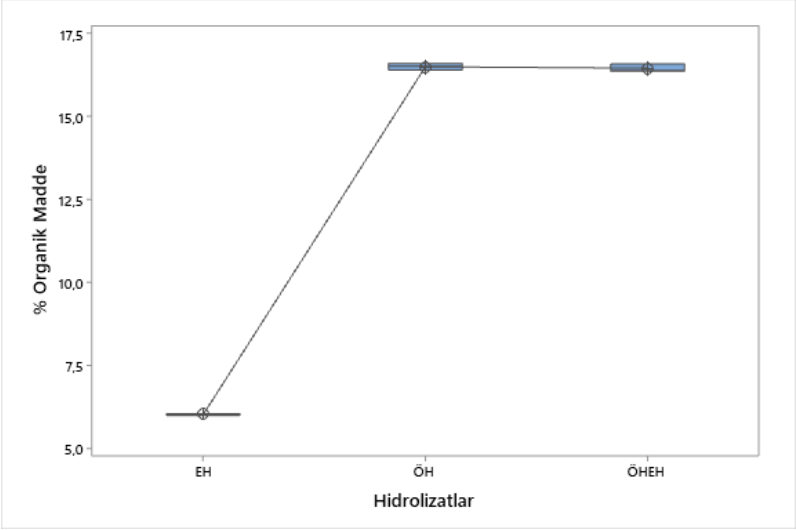
Şekil 4.10 Protein miktarlarına sonuçlarına ait boxplot gösterimi.

Kuru madde bakımından ön hidrolizli enzimatik hidrolizde ve ön hidroliz proseslerinde enzimatik hidroliz prosesine göre anlamlı derecede yükselme gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Buna ilaveten ön hidrolizli enzimatik hidrolizde ön hidrolize göre kuru madde miktarında anlamlı derecede yükselme gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Hidrolizatların kuru madde miktarına ait boxplot gösterimi şekil 4.11'de verilmiştir.



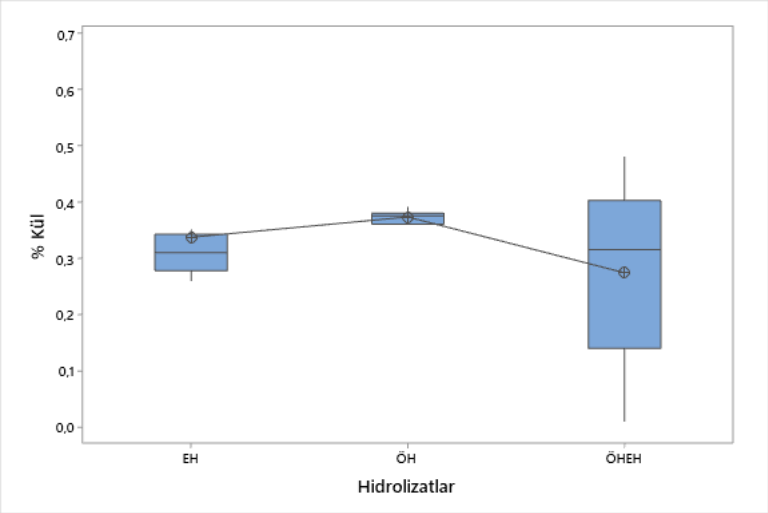
Şekil 4.11 Kuru madde miktarları sonuçlarına ait boxplot gösterimi.

Organik madde bakımından ön hidrolizli enzimatik hidrolizde ve ön hidroliz proseslerinde enzimatik hidroliz prosesine göre anlamlı derecede yükselme gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Buna ilaveten ön hidrolizli enzimatik hidrolizde ön hidrolize göre organik madde miktarında anlamlı derecede yükselme gözlemlenmiştir ($p<0.05$). Hidrolizatların kuru madde miktarına ait boxplot gösterimi şekil 4.12'de verilmiştir.



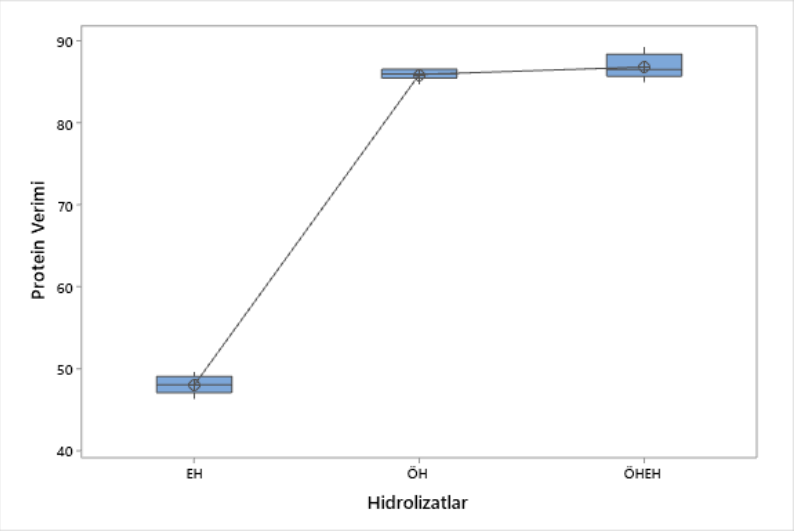
Şekil 4.12 Organik madde miktarı sonuçlarına ait boxplot gösterimi.

Kül miktarı bakımından enzimatik hidroliz, ön hidrolizli enzimatik hidrolizde ve ön hidroliz proseslerinde elde edilen sonuçlarda anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Hidrolizatların kül miktarına ait boxplot gösterimi şekil 4.13'te verilmiştir.



Şekil 4.13 Kül miktarı sonuçlarına ait boxplot gösterimi.

Protein verimi bakımından ön hidrolizli enzimatik hidrolizde ve ön hidroliz proseslerinde enzimatik hidroliz prosesine göre anlamlı derecede yükselme gözlemlenmiştir. Ön hidrolizli enzimatik hidroliz ve ön hidrolizde protein verimi bakımından anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Hidrolizatların protein verim sonuçlarına ait boxplot gösterimi şekil 4.14 da verilmiştir.



Şekil 4.14 Hidrolizatların protein verimlerine ait boxplot gösterimi.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, akciğer dokusunun hidroliz prosesleri ile ilgili yaptığımız deneylerin sonuçları aşağıda verilmiştir:

1- Modern deney tasarım modellerinden CCD ve BBD modelleri başarılı bir şekilde kurulmuştur.
2- Alkali ön hidrolizin optimizasyonu için CCD ile oluşturulmuş deney tasarım modeli istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu model için Lineer model önerilmiştir. Lineer model terimlerinden sıcaklık istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Lineer modele ait diğer terimler, karesel modele ait terimler ve etkileşim modeline ait terimler istatiksel olarak önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur ($p>0.05$).
3- Optimizasyon için CCD deney tasarımı ile oluşturulan akciğer dokusunun alkali hidroliz prosesine ait ANOVA testinde 0.029 p değeri 0.05'ten küçük olmasına rağmen, R^2 değeri %95'ten küçük olduğundan dolayı hidroliz optimizasyonu için kullanılan CCD deney tasarım modelinin uygun olmadığı kararına varılmıştır.
4- Asidik ön hidrolizin optimizasyonu için CCD ile oluşturulmuş deney tasarım modeli istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Bu model için Lineer ve karesel model önerilmiştir. Lineer model terimlerinden sıcaklık, karesel model terimlerinden sıcaklık*sıcaklık ve süre*süre istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Lineer modele ait diğer terimler, karesel modele konstrasyon*konsantrasyon terimi ve etkileşim modeline ait terimler istatiksel olarak önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur ($p>0.05$).
5- Optimizasyon için CCD deney tasarımı ile oluşturulan akciğer dokusunun asidik ön hidroliz prosesine ait ANOVA testinde 0.00000856 p değeri 0.05'ten küçük

olması ve R^2 değeri %95'ten büyük olması nedeniyle hidroliz optimizasyonu için kullanılan CCD deney tasarım modelinin uygun olduğu kararına varılmıştır

6- Alkali ön hidrolizin optimizasyonu için BBD ile oluşturulmuş deney tasarım modeli istatiksel olarak bir öneme sahip olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Bu model için lineer model terimleri, karesel model terimleri ve etkileşim model terimleri istatiksel olarak önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur ($p>0.05$).

7- Optimizasyon için BBD deney tasarımı ile oluşturulan akciğer dokusunun alkali hidroliz prosesine ait ANOVA testinde p değeri 0.05'ten büyük olması ve R^2 değerinin %95'ten küçük olması sebebiyle akciğerin alkali hidroliz optimizasyonu için kullanılan BBD modelinin uygun olmadığına karar verilmiştir.

8- Asidik ön hidrolizin optimizasyonu için BBD ile oluşturulmuş deney tasarım modeli istatiksel olarak bir öneme sahip olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Bu model için lineer model terimleri, karesel model terimleri ve etkileşim model terimleri istatiksel olarak önemsiz bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur ($p>0.05$).

9- Optimizasyon için BBD deney tasarımı ile oluşturulan akciğer dokusunun asidik hidroliz prosesine ait ANOVA testinde p değeri 0.05'ten büyük olması ve R^2 değerinin %95'ten küçük olması sebebiyle akciğerin alkali hidroliz optimizasyonu için kullanılan BBD modelinin uygun olmadığına karar verilmiştir.

10- Modern deney tasarım modellerinin istatiksel olarak değerlendirildikten sonra CCD ile oluşturmuşmuş akciğer dokusunun asidik hidrolizi optimizasyonu Minitab 19 programı ile analiz edilmiştir. Optimizasyon analiz sonucunda maksimum hidroliz derecesi için 90°C'de 1 M H_2SO_4 ile 8 saat koşulları belirlenmiştir.

11- Optimizasyon için seçilen bu koşullarda tahmini hidroliz derecesi %94.46 olarak hesaplanmıştır. Doğrulama için belirtilen koşullarda asidik hidroliz edilen akciğer dokusunda %94.61 oranında hidroliz derecesi tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre tahmini hidroliz derecesi ile deneysel hidroliz derecesinin oldukça yakın olduğu bulunmuştur.

12- Enzimatik hidroliz için akciğer dokusu pH 6.5'te, 65 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Enzimatik hidroliz sonucu %15.984±1.471 hidroliz derecesi,

57.140±1.307 g/L protein, %6.370±0.091, kuru madde, %6.02±0.020 organik madde, %0.337±0,110 kül ve %48.017±1.098 proetin verimi elde edilmiştir.

13- Ön hidroliz optimizasyondan elde edilen 90°C'de 1 M H_2SO_4 ile 8 saat koşulların akciğer dokusu kimyasal olarak hidroliz edilmiştir. Deneyler sonucunda %94.005±0.848 hidroliz derecesi, 102.260±0.778 g/L protein, %16.876±0.137 kuru madde, %16.503±0,129 organik madde, %0.373±0.010 kül ve %85.933±0.654 protein verimi elde edilmiştir.

14- Ön hidroliz için optimizasyondan elde edilen 90°C'de 1 M H_2SO_4 ile 8 saat koşulların akciğer dokusu kimyasal olarak hidroliz edilmiş ve enzimatik hidroliz için akciğer dokusu pH 6.5'te, 65 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ön hidrolizli enzimatik hidroliz sonucu %94.731±1.983 hidroliz derecesi, 103.340±1.649 g/L protein %16.742±0.050 kuru madde, %16.460±0.140 organik madde. %0.274±0.158 kül ve %86.830±1.386 protein verimi elde edilmiştir.

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçlara göre, akciğer artıklarından protein hidrolizatı üretilmesi konusunda aşağıdaki öneriler sıralanabilir:

1- Elde edilen akciğer protein hdirolizatının içerdiği karbonhidrat, yağ, serbest amino asit, kimyasal özellikleri ve emülsifi, köpük oluşturma gibi fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi, ayrıca insan ve çevre için zararlı olabilecek patojenlerin mikrobiyolojik olarak incelenmesi
2- Akciğer protein hidrolizatını oluşturan peptitlerin elektroforez yöntemleri kullanılarak boyutlarının belirlenmesi,
3- Elde edilen akciğer protein hidrolizatının depolamaya bağlı kimyasal kompozisyon ve kalite değişimlerinin incelenmesi,
4- Akciğerlerin ön hidrolizinde kullanılan H_2SO_4 kimyasalının fiyat/fayda bakımından fizibilite raporunun araştırılması,
5- Akciğerlerin enzimatik hidrolizinde kullanılan papain enziminin fiyat/fayda bakımından fizibilite raporunun araştırılması,
6- Akciğerlerden elde edilen protein hidrolizatlarının bitkilerin primer ve sekonder metabolizmasına, çiçeklenme, bitki gelişimi ve verim ve bitkilerde abiyotik streslerin olumsuz etkilerin giderilmesi üzerine etkilerinin incelenmesi,
7- Akciğer dokusundan elde edilen protein hidrolizatlarının antikanser, antihipertansif, antioksidan, antilipidemik gibi farmasotik etkilerinin incelenmesi

8- Protein hidroliz prosesinde önemli basamakları oluşturan filtrasyon ve kurutma yöntemlerinin araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Alemán, A., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Enzymatic hydrolysis of fish gelatin under high pressure treatment. *International journal of food science technology, 46*(6), 1129-1136.

Ambrosini, S., Sega, D., Santi, C., Zamboni, A., Varanini, Z., & Pandolfini, T. (2021). Evaluation of the potential use of a collagen-based protein hydrolysate as a plant multi-stress protectant. *Frontiers in plant science, 12*, 63.

Apone, F., Tito, A., Carola, A., Arciello, S., Tortora, A., Filippini, L., Chrispeels, M. J. (2010). A mixture of peptides and sugars derived from plant cell walls increases plant defense responses to stress and attenuates ageing-associated molecular changes in cultured skin cells. *Journal of biotechnology, 145*(4), 367-376.

Aspmo, S. I., Horn, S. J., & H. Eijsink, V. G. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (Gadus morhua L.) viscera. *Process Biochemistry, 40*(5), 1957-1966.

Ayaz, A., & Yurttagül, M. (2006). Sebzelerin Nitrat ve Nitrit İçeriklerine Etki Eden Faktörler. *Beslenme ve Diyet Dergisi, 34*(2), 51-64.

Baglieri, A., Cadili, V., Monterumici, C. M., Gennari, M., Tabasso, S., Montoneri, E., Negre, M. (2014). Fertilization of bean plants with tomato plants hydrolysates. Effect on biomass production, chlorophyll content and N assimilation. *Scientia Horticulturae, 176*, 194-199.

Bah, C. S. F., Bekhit, A. E.-D. A., Carne, A., & McConnell, M. A. (2013). Slaughterhouse Blood: An Emerging Source of Bioactive Compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 12*(3), 314-331.

Balkan, T. (2011, Şubat). Edirne İl Tarım Müdürlüğü 2010 Yılı Çalışma Raporu. 15 Mart 2022 tarihinde http://edirne.tarim.gov.tr/Belgeler/2010calisma.doc. adresinden erişildi.

Baş, C. (2010). *Cevap Yüzeyi Tasarımları ve Sinir Ağları Yaklaşımı. (*Doktora Tezi).Ankara Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara.

Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N., & Nunes, M. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (Aphanopus carbo) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry, 45*(1), 18-24.

Bayat, R. A., Kuşvuran, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., & Üstün, A. S. (2014). Tuz Stresi Altındaki Genç Kabak (Cucurbita pepo L. ve C. moschata Poir.) Bitkilerine Uygulanan Prolin'in, Antioksidatif Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkisi. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 1*(1), 25-33.

Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R. G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (Catla catla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource technology, 99*(2), 335-343.

Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany, 91*(2), 179-194.

Bostancı, H. E. (2014). *Deneysel olarak diyabet oluşturulmuş sıçanlarda vitaminlerin oksidasyona etkisi.* (Yüksek Lisans Tezi), Pamukkale Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.

Botella, M. A., Rosado, A., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (2005). Plant adaptive responses to salinity stress. *Plant abiotic stress, 21*, 38-70.

Botta, A. (2012). Enhancing plant tolerance to temperature stress with amino acids: an approach to their mode of action. *Paper presented at the I World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture*, 1009, 29-35.

Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (Sardinella aurita) by-products proteins. *Food Chemistry, 118*(3), 559-565.

Bouhamed, S. B. H., & Kechaou, N. (2017). Kinetic study of sulphuric acid hydrolysis of protein feathers. *Bioprocess Biosyst Eng, 40*(5), 715-721.

Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews microbiology, 3*(3), 238-250.

Burssens, S., Himanen, K., Van de Cotte, B., Beeckman, T., Van Montagu, M., Inzé, D., & Verbruggen, N. (2000). Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in Arabidopsis thaliana. *Planta, 211*(5), 632-640.

Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant, 383*(1), 3-41.

Cavani, L., & Ciavatta, C. (2007). Attività biostimolante negli idrolizzati proteici. *Informatore Agrario, 63*(44), 46.

Cavani, L., Ciavatta, C., & Gessa, C. (2003). Determination of free L-and D-alanine in hydrolysed protein fertilisers by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A, 985*(1-2), 463-469.

Cerdán, M., Sánchez-Sánchez, A., Oliver, M., Juárez, M., & Sánchez-Andreu, J. (2008). Effect of foliar and root applications of amino acids on iron uptake by tomato plants. *Paper presented at the IV Balkan Symposium on Vegetables and Potatoes*, 830, 481-488.

Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chem, 135*(4), 3020-3038.

Cherlet, M., Hutchinson, C., Reynolds, J., Hill, J., Sommer, S., & von Maltitz, G. (2018). World Atlas of Desertification. Luxembourg: Publication Office of the European Union. In.

Chi, C.-F., Hu, F.-Y., Wang, B., Li, T., & Ding, G.-F. (2015). Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (Tegillarca granosa) muscle. *Journal of Functional foods, 15*, 301-313.

Cho, S., Kwak, K., Park, D., Gu, Y., Ji, C., Jang, D., . . . Kim, S. (2004). Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (Isurus oxyrinchus) cartilage. *Food Hydrocolloids, 18*(4), 573-579.

Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., & Anand, S. (2012). Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology, 65*(1), 1-12.

Cicero, A. F., Fogacci, F., & Colletti, A. (2017). Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: a narrative review. *British journal of pharmacology, 174*(11), 1378-1394.

Cohen, L. W., Coghlan, V. M., & Dihel, L. C. J. G. (1986). Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA. *Gene, 48*(2-3), 219-227.

Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Rouphael, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae, 196*, 28-38.

Colla, G., Rouphael, Y., Canaguier, R., Svecova, E., & Cardarelli, M. (2014). Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in plant science, 5*, 448.

Crawford, D. L., Lynch, J. M., Whipps, J. M., & Ousley, M. A. (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied environmental microbiology, 59*(11), 3899-3905.

Cruz, J., Ortiz, C., Guzman, F., Fernandez Lafuente, R., & Torres, R. (2014). Antimicrobial peptides: promising compounds against pathogenic microorganisms. *Current medicinal chemistry, 21*(20), 2299-2321.

Çavuşoğlu, K., Kılıç, S., & Kabar, K. (2008). Effects of some plant growth regulators on stem anatomy of radish seedlings grown under saline (NaCl) conditions. *Plant Soil Environ, 54*(10), 428-433.

Danış, Ü. (1996). Et İşleme Tesisleri ve Yerleşim Yeri Atıklarının Karasu Nehrine Etkisi. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, 2*(1), 9-14.

Darine, S., Christophe, V., & Gholamreza, D. (2010). Production and functional properties of beef lung protein concentrates. *Meat Science, 84*(3), 315-322.

Daryanto, S., Wang, L., & Jacinthe, P.-A. (2016). Global synthesis of drought effects on maize and wheat production. *PloS one, 11*(5), e0156362.

De Azevedo Neto, A. D., Prisco, J. T., Enéas-Filho, J., de Abreu, C. E. B., Gomes-Filho, E. J. E., & Botany, E. (2006). Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. *Environmental Experimental Botany, 56*(1), 87-94.

De Lucia, B., & Vecchietti, L. (2012). Type of bio-stimulant and application method effects on stem quality and root system growth in LA Lily. *European Journal of Horticultural Science, 77*(1), 10.

Değirmencioğlu, A., & Yazgı, A. (2006). Tepki Yüzeyleri Metodolojisi" Optimizasyon Esaslı Çalışmalara İlişkin Teorik Esaslar ve Tarımsal Mekanizasyon Uygulamaları". *Tarım Makinaları Bilimi Dergisi, 2*(2), 111-115.

Dekkers, E., Raghavan, S., Kristinsson, H. G., & Marshall, M. R. (2011). Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry, 124*(2), 640-645.

Del Castillo, E. (2007). *Process optimization: a statistical approach* (Vol. 105): Springer Science & Business Media.

Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2008). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science, 78*(4), 522-528.

Demirhan, S. A., Çelen, B., Çelen, M. F., & Şahinler, N. (2016). Hayvancılıkta İş Sağlığı ve Güvenliği. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5*, 303-314.

Dieterich, F., Boscolo, W., Pacheco, M., Silva, V., Gonçalves, G., & Vidotti, R. (2014). Development and characterization of protein hydrolysates originated from animal agro industrial byproducts. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research, 1*(2), 1-7.

Drobek, M., Frąc, M., & Cybulska, J. (2019). Plant biostimulants: Importance of the quality and yield of horticultural crops and the improvement of plant tolerance to abiotic stress A review. *Agronomy, 9*(6), 335.

Dziuba, B., & Dziuba, M. (2014). Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 13*(1), 5-26.

Edwin, F., & Jagannadham, M. (2000). Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 1479*(1-2), 69-82.

Ertani, A., Cavani, L., Pizzeghello, D., Brandellero, E., Altissimo, A., Ciavatta, C., & Nardi, S. (2009). Biostimulant activity of two protein hydrolyzates in the growth and nitrogen metabolism of maize seedlings. *Journal of plant nutrition soil science, 172*(2), 237-244.

Ertani, A., Francioso, O., Tugnoli, V., Righi, V., & Nardi, S. (2011). Effect of commercial lignosulfonate-humate on Zea mays L. metabolism. *Journal of agricultural food chemistry, 59*(22), 11940-11948.

Ertani, A., Pizzeghello, D., Francioso, O., Sambo, P., Sanchez-Cortes, S., & Nardi, S. (2014). Capsicum chinensis L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: chemical and metabolomic approaches. *Frontiers in plant science, 5*, 375.

Ertani, A., Schiavon, M., Muscolo, A., & Nardi, S. (2013). Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed Zea mays L. plants. *Plant soil, 364*(1), 145-158.

Fan, X., Gordon-Weeks, R., Shen, Q., & Miller, A. J. (2006). Glutamine transport and feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. *Journal of experimental botany*, 57(6), 1333-1340.

Farooq, M., Gogoi, N., Barthakur, S., Baroowa, B., Bharadwaj, N., Alghamdi, S. S., & Siddique, K. (2017). Drought stress in grain legumes during reproduction and grain filling. *Journal of Agronomy Crop Science*, 203(2), 81-102.

Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today, 20*(1), 122-128.

Fowlkes, W. Y., & Creveling, C. M. (1995). *Engineering methods for robust product design: using Taguchi methods in technology and product development*. New York: Addison-Wesley Publishing Company.

Gajc-Wolska, J., Kowalczyk, K., Nowecka, M., Mazur, K., & Metera, A. (2012). Effect of organic-mineral fertilizers on the yield and quality of endive (Cichorium endivia L.). *Acta Sci Pol, 11*, 189-200.

García-Martínez, A., Díaz, A., Tejada, M., Bautista, J., Rodríguez, B., Santa María, C., Parrado, J. (2010). Enzymatic production of an organic soil biostimulant from wheat-condensed distiller solubles: Effects on soil biochemistry and biodiversity. *Process Biochemistry, 45*(7), 1127-1133.

Gbogouri, G., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of food Science, 69*(8), 615-622.

Gezgin, T., Karakus, S., & Bulbul, H. (2020). Et ürünlerinde hidroksiprolin miktarının belirlenmesinde mikrodalga ile protein hidrolizi yönteminin araştırılması. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*(23), 25-29.

Ghosh, S. (2005). Physicochemical and conformational studies of papain/sodium dodecyl sulfate system in aqueous medium. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects., 264*(1-3), 6-16.

González-Montoya, M., Hernández-Ledesma, B., Silván, J. M., Mora-Escobedo, R., & Martínez-Villaluenga, C. (2018). Peptides derived from in vitro gastrointestinal digestion of germinated soybean proteins inhibit human colon cancer cells proliferation and inflammation. *Food Chemistry, 242*, 75-82.

Gousterova, A., Nustorova, M., Christov, P., Nedkov, P., Neshev, G., & Vasileva-Tonkova, E. (2008). Development of a biotechnological procedure for treatment of animal wastes to obtain inexpensive biofertilizer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24*(11), 2647-2652.

Gousterova, A., Nustorova, M., Goshev, I., Christov, P., Braikova, D., Tishinov, K., B. (2003). Alkaline hydrolysate of waste sheep wool aimed as fertilizer. *Biotechnology & Biotechnological Equipment, 17*(2), 140-145.

Gruda, N. (2009). Do soilless culture systems have an influence on product quality of vegetables? *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 82, 141–147.

Gurav, R. G., & Jadhav, J. P. (2013). A novel source of biofertilizer from feather biomass for banana cultivation. *Environmental Science Pollution Research, 20*(7), 4532-4539.

Hall, F., Johnson, P. E., & Liceaga, A. (2018). Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (Gryllodes sigillatus) protein. *Food Chemistry*, 262, 39-47.

Halliwell, B. (2007). Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free radicals in biology medicine*, 187-267.

Halpern, M., Bar-Tal, A., Ofek, M., Minz, D., Muller, T., & Yermiyahu, U. (2015). The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. *Advances in agronomy, 130*, 141-174.

Hartmann, R., & Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Current opinion in biotechnology, 18*(2), 163-169.

Hathwar, S. C., Bijinu, B., Rai, A. K., & Narayan, B. (2011). Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. *Applied Biochemistry Biotechnology, 164*(1), 115-124.

Hoff, T., Truong, H. N., & Caboche, M. (1994). The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. *Plant, Cell Environment, 17*(5), 489-506.

Hong, C. Y., Chao, Y. Y., Yang, M. Y., Cho, S. C., & Kao, C. H. (2009). Na+ but not Cl− or osmotic stress is involved in NaCl-induced expression of glutathione reductase in roots of rice seedlings. *Journal of Plant Physiology, 166*(15), 1598-1606.

Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., & Wu, G. (2017). Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *J Anim Sci Biotechnol, 8*, 24.

Hsu, K. C. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry, 122*(1), 42-48.

Hu, Y., & Schmidhalter, U. (2005). Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition Soil Science*, 168(4), 541-549.

Hua-Jing, W., Liang-Huan, W., Min-Yan, W., Yuan-Hong, Z., Qin-Nan, T., & Zhang, F.-S. (2007). Effects of amino acids replacing nitrate on growth, nitrate accumulation, and macroelement concentrations in pak-choi (Brassica chinensis L.). *Pedosphere, 17*(5), 595-600.

Huang, T., Jander, G., & de Vos, M. (2011). Non-protein amino acids in plant defense against insect herbivores: representative cases and opportunities for further functional analysis. *Phytochemistry, 72*(13), 1531-1537.

Hyun, C.-K., & Shin, H.-K. (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry, 36*(1-2), 65-71.

Jang, A., Jo, C., Kang, K.-S., & Lee, M. (2008). Antimicrobial and human cancer cell cytotoxic effect of synthetic angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides. *Food Chemistry, 107*(1), 327-336.

Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., & Bawa, A. S. (2012). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J Food Sci Technol, 49*(3), 278-293.

Je, J.-Y., Park, P.-J., & Kim, S.-K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (Theragra chalcogramma) frame protein hydrolysate. *Food Research International, 38*(1), 45-50.

Je, J.-Y., Qian, Z.-J., Byun, H.-G., & Kim, S.-K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry, 42*(5), 840-846.

Jeon, Y., Kim, H., Cho, Y., & Yoo, H. (2013). Biological conversion from slaughter blood into amino acid liquefied fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development, 4*(5), 509.

Kaçar, B. (2009). *Toprak Analizleri*. Ankara:Nobel Yayın Dağıtım.

Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute, 4*(1).

Karaman, S. (2006). Hayvansal üretimden kaynaklanan çevre sorunları ve çözüm olanakları. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 9*(2), 133-139.

Katedra, B. Ż. (2022). 24.04.2022 tarihinde https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/ adresinden erişildi.

Kauffman, G. L., Kneivel, D. P., & Watschke, T. L. (2007). Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Science, 47*(1), 261-267.

Keleş, Ö. (1996). *Matkap uçlarının ark pvd ile tin kaplanmasında proses parametrelerin taguchi metodları ile optimizasyonu.* (Yüksek Lisans Tezi), İstanbul Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

Kes, D., Gökdoğan, F., & Tuna, D. (2016). Hipertansiyonu Olan Hastaların Tamamlayıcı ve Alternatif Tedavi Kullanımı: Literatür Taraması *Journal of Cardiovascular Nursing, 7*(12), 40-55.

Keskin, N., Noyan, T., & Kunter, B. (2009). Resveratrol ile üzümden gelen sağlık. *Turkiye Klinikleri J Med Sci, 29*(5), 1273-1279.

Khanam, U. K. S., Oba, S., Yanase, E., & Murakami, Y. (2012). Phenolic acids, flavonoids and total antioxidant capacity of selected leafy vegetables. *Journal of Functional foods, 4*(4), 979-987.

Kim, I. M. R., Kawamura, Y., & Lee, C. H. (2003). Isolation and identification of bitter peptides of tryptic hydrolysate of soybean 11S glycinin by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of food science, 68*(8), 2416-2422.

Kim, S. K., Ngo, D. H., & Vo, T. S. (2012). Marine fish-derived bioactive peptides as potential antihypertensive agents. *Advances in food nutrition research, 65,* 249-260.

Kim, S. K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional foods, 2*(1), 1-9.

Kitts, D. D., & Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design, 9*(16), 1309-1323.

Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of functional foods, 1*(2), 177-187.

Korkmaz, K. (2018). *Ticari enzimler kullanılarak farklı balık Türü atıklarından hidrolizat üretimi ve Kalitesinin belirlenmesi.* (Doktora Tezi). Ordu Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.

Krejci, O., Mokrejs, P., & Sukop, S. (2011). *Preparation and characterization of keratin hydrolysates.* Paper presented at the Mathematical Methods and Techniques in Engineering and Environmentyal Science: Proceedings of the 13th WSEAS International Conference on Mathematical and Computational Methods in Science and Engineering, 308-311.

Kumagai, H. (2010). Wheat proteins and peptides. *Bioactive proteins peptides as functional foods nutraceuticals, 29,* 289.

Kumar, N. S., Nazeer, R., & Jaiganesh, R. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (Magalaspis cordyla) and croaker (Otolithes ruber). *Amino acids, 42*(5), 1641-1649.

Kunicki, E., Grabowska, A., Sękara, A., & Wojciechowska, R. (2010). The effect of cultivar type, time of cultivation, and biostimulant treatment on the yield of spinach (Spinacia oleracea L.). *Folia Horticulturae, 22*(2), 9-13.

Kunst, T., & Whitaker, J. (2003). Protein modification to optimize functionality protein hydrolysates. *In Handbook of Food Enzymology,* 236-251.

Kurbanoglu, E. B., Atici, O., & Algur, O. F. (2004). Effect of Ram Horn Hydrolyzate on the Growth of Bean (Phaseolus vulgariscv. Aziziye-94). *Biological Agriculture & Horticulture, 22*(2), 121-131.

Lachhab, N., Sanzani, S. M., Adrian, M., Chiltz, A., Balacey, S., Boselli, M., Poinssot, B. (2014). Soybean and casein hydrolysates induce grapevine immune responses and resistance against Plasmopara viticola. *Frontiers in plant science, 5*, 716.

Lafarga, T., Álvarez, C., & Hayes, M. (2017). Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. *Journal of Food Biochemistry, 41*(6), e12418.

Lafarga, T., & Hayes, M. (2017). Effect of pre-treatment on the generation of dipeptidyl peptidase-IV- and prolyl endopeptidase-inhibitory hydrolysates from bovine lung. *Irish Journal of Agricultural and Food Research, 56*(1), 12-24. doi:10.1515/ijafr-2017-0002

Landi, S., Hausman, J. F., Guerriero, G., & Esposito, S. (2017). Poaceae vs. abiotic stress: focus on drought and salt stress, recent insights and perspectives. *Frontiers in plant science, 8*, 1214.

Lassoued, I., Mora, L., Barkia, A., Aristoy, M. C., Nasri, M., & Toldrá, F. (2015). Bioactive peptides identified in thornback ray skin's gelatin hydrolysates by proteases from Bacillus subtilis and Bacillus amyloliquefaciens. *Journal of Proteomics, 128*, 8-17.

Lee, J. K., Jeon, J. K., & Byun, H. G. (2011). Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate. *Food Chemistry, 125*(2), 495-499.

Léonil, J. (2014). Milk bioactive peptides: their interest for cardiovascular diseases and metabolic syndrome prevention. *Medecine Des Maladies Metaboliques*, 8, 495-499.

Li, G. H., Qu, M. R., Wan, J. Z., & You, J. M. (2007). Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 16*(1), 275-280.

Li, Y., & Yu, J. (2015). Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides. *Journal of medicinal food, 18*(2), 147-156.

Lisiecka, J., Knaflewski, M., Spizewski, T., Fraszczak, B., Kaluzewicz, A., & Krzesinski, W. (2011). The effect of animal protein hydrolysate on quantity and quality of strawberry daughter plants cv.'Elsanta'. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 10*, 31-40.

Liu, X. Q., & Lee, K. S. (2012). Effect of mixed amino acids on crop growth. *Agricultural Science, 1*.

Liu, X., Song, C., Chen, R., Jiang, X., Jin, Y., & Zou, H. (2010). Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in peptides mixture of hydrolyzed red

deer plasma with proteomic approach. *Chinese Journal of Chemistry, 28*(9), 1665-1672.

Liu, X. Q., Ko, K. Y., Kim, S. H., & Lee, K. S. (2007). Effect of amino acid fertilization on nitrate assimilation of leafy radish and soil chemical properties in high nitrate soil. *Communications in soil science plant analysis, 39*(1-2), 269-281.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry, 193*, 265-275.

Lucini, L., Rouphael, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., & Colla, G. (2015). The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. *Scientia Horticulturae,* 182, 124-133.

Lynch, S. A., Álvarez, C., O'Neill, E. E., Keenan, D. F., & Mullen, A. M. (2018). Optimization of protein recovery from bovine lung by pH shift process using response surface methodology. *Journal of the Science of Food Agriculture,* 98(5), 1951-1960.

Maini, P. (2006). The experience of the first biostimulant, based on amino acids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results. *Fertilitas Agrorum, 1*(1), 29-43.

Majumder, K., Chakrabarti, S., Morton, J. S., Panahi, S., Kaufman, S., Davidge, S. T., & Wu, J. (2015). Egg-derived ACE-inhibitory peptides IQW and LKP reduce blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional foods, 13,* 50-60.

Matsumiya, Y., & Kubo, M. (2011). Soybean peptide: novel plant growth promoting peptide from soybean. *Soybean Nutrition*, 215-230.

Mazorra-Manzano, M., Ramírez-Suarez, J., & Yada, R. (2018). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical reviews in food science nutrition, 58*(13), 2147-2163.

Mazorra-Manzano, M. A., Ramirez-Suarez, J. C., & Yada, R. Y. (2018). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr, 58*(13), 2147-2163.

Meisel, H., & Bockelmann, W. (1999). Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antonie Van Leeuwenhoek, 76*(1), 207-215.

Menard, R., Khouri, H. E., Plouffe, C., Dupras, R., Ripoll, D., Vernet, T., Storer, A. C. J. B. (1990). A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain. *29*(28), 6706-6713.

Miller, A. J., Fan, X., Shen, Q., & Smith, S. J. (2008). Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of experimental botany, 59*(1), 111-119.

Minitab.(2021a) 20 Aralık 2021 tarihinde https://support.minitab.com/en-us/minitab/19/help-and-how-to/statistical-modeling/doe/how-to/response-surface/analyze-response-surface-design/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/analysis-of-variance-table/ adresinden erişildi.

Minitab.(2021b). 20 Aralık 2021 tarihinde https://support.minitab.com/en-us/minitab/19/help-and-how-to/statistical-modeling/anova/supporting-topics/basics/what-is-anova/. adresinden erişildi.

Minitab. (2022a). 15 Şubat 2022 tarihinde .https://support.minitab.com/en-us/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/regression/supporting-topics/regression-models/what-is-model-order/. adresinden erişildi.

Minitab. (2022b). 15 Şubat 2022 tarihinde https://support.minitab.com/en-us/minitab/19/help-and-how-to/statistical-modeling/anova/how-to/fit-general-linear-model/interpret-the-results/all-statistics-and-graphs/model-summary-table/ adresinden erişildi.

Minkiewicz, P., Dziuba, J., & Michalska, J. (2011). Bovine meat proteins as potential precursors of biologically active peptides-a computational study based on the BIOPEP database. *Food Science Technology Internationa, 17*(1), 39-45.

Moe, L. A. (2013). Amino acids in the rhizosphere: from plants to microbes. *American journal of botany, 100*(9), 1692-1705.

Mohammad, M., Shibli, R., Ajlouni, M., & Nimri, L. (1998). Tomato root and shoot responses to salt stress under different levels of phosphorus nutrition. *Journal of plant nutrition, 21*(8), 1667-1680.

Morales-Payan, J. P., & Stall, W. M. (2003). *Papaya (Carica papaya) response to foliar treatments with organic complexes of peptides and amino acids.* Paper presented at the Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 116, 30-32.

Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European journal of nutrition, 47*(4), 171-182.

Mustaţea, G., Ungureanu, E. L., & Iorga, E. J. I. (2019). Protein acidic hydrolysis for amino acids analysis in food-progress over time: a short review. *Ile, 1*, 131-132.

Myers, R. H. (1991). Response surface methodology in quality improvement. *Communications in Statistics-Theory Methods, 20*(2), 457-476.

Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., & Muscolo, A. (2009). Biological activities of humic substances. *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems, 2*(1), 305-339.

Ngo, D.-H., Qian, Z.-J., Ryu, B., Park, J. W., & Kim, S.-K. (2010). In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (Oreochromis niloticus) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Functional foods, 2*(2), 107-117.

Noman, A., Xu, Y., AL-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H., & Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (Acipenser sinensis) by using papain enzyme. *Process Biochemistry, 67*, 19-28.

Nustorova, M., Braikova, D., Gousterova, A., Vasileva Tonkova, E., & Nedkov, P. (2005). Chemical, microbiological and plant analysis of soil fertilized with alkaline hydrolysate of sheep's wool waste. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22*(4), 383-390.

O'Sullivan, S. M., Lafarga, T., Hayes, M., & O'Brien, N. M. (2017). Bioactivity of bovine lung hydrolysates prepared using papain, pepsin, and Alcalase. *Journal of Food Biochemistry, 41*(6).

Oosterveer, P. (2008). Governing global fish provisioning: ownership and management of marine resources. *Ocean Coastal Management*, 51(12), 797-805.

Oude Griep, L. M., Verschuren, W. M., Kromhout, D., Ocké, M. C., & Geleijnse, J. M. (2011). Colors of fruit and vegetables and 10-year incidence of stroke. *Stroke, 42*(11), 3190-3195.

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., & Shabanpour, B. (2012). Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food Bioprocess Technology, 5*(2), 460-465.

Özden, E. (2020). *Elektrostatik toz boya proses parametrelerinin deney tasarımı yöntemleri ile optimizasyonu ve endüstriyel uygulaması.*(Yüksek Lisans Tezi), Balıkesir Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.

Özdestan, Ö., & Ali, Ü. (2010). Gıdalarda nitrat ve nitrit. *Akademik Gıda, 8*(6), 35-43.

Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology environmental safety, 60*(3), 324-349.

Parrado, J., Escudero Gilete, M. L., Friaza, V., García Martínez, A., González Miret, M. L., Bautista, J. D., & Heredia, F. J. (2007). Enzymatic vegetable extract with bio-active components: Influence of fertiliser on the colour and anthocyanins of red grapes. *Journal of the Science of Food Agriculture, 87*(12), 2310-2318.

Pasupuleti, V. K., & Braun, S. (2008). State of the art manufacturing of protein hydrolysates. *Protein hydrolysates in biotechnology*, 11-32.

Pasupuleti, V. K., Holmes, C., & Demain, A. L. (2008). Applications of protein hydrolysates in biotechnology. *Protein hydrolysates in biotechnology*, 1-9.

Perveen, S., Shahbaz, M., & Ashraf, M. (2011). Modulation in activities of antioxidant enzymes in salt stressed and non-stressed wheat (Triticum aestivum L.) plants raised from seed treated with triacontanol. *Pak. J. Bot*, *43*(5), 2463-2468.

Pimenta, A. M., & De Lima, M. E. (2005). Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, *11*(11), 670-676.

Piot, J., Guillochon, D., & Thomas, D. (1986). Preparation of decolorized peptides from slaughter-house blood. *MIRCEN journal of applied microbiology biotechnology*, *2*(3), 359-364.

Planques, B., Colla, G., Svecová, E., Cardarelli, M., Rouphael, Y., Reynaud, H., & Canaguier, R. (2012). *Effectiveness of a plant-derived protein hydrolysate to improve crop performances under different growing conditions.* Paper presented at the I World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1009, 175-179.

Prados, I. M., Marina, M. L., & García, M. C. (2018). Isolation and identification by high resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry of novel peptides with multifunctional lipid-lowering capacity. *Food Research International*, *111*, 77-86.

Pritchard, S. R., Phillips, M., & Kailasapathy, K. (2010). Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food research international*, *43*(5), 1545-1548.

Przybylski, R., Firdaous, L., Châtaigné, G., Dhulster, P., & Nedjar, N. (2016). Production of an antimicrobial peptide derived from slaughterhouse by-product and its potential application on meat as preservative. *Food Chemistry*, *211*, 306-313.

Qurartieri, M., Lucchi, A., & Cavani, L. (2002). Effects of the rate of protein hydrolysis and spray concentration on growth of potted kiwifruit (Actinidia deliciosa) plants. *Acta horticulturae*, 594,341-347.

Rahmstorf, S., & Coumou, D. (2011). Increase of extreme events in a warming world. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(44), 17905-17909.

Reddy, M., & Iyengar, E. (1999). Crop responses to salt stress: Seawater application and prospects. *Handbook of Plant Crop Stress. Marcel Dekker In. New York*, 1041-1068.

Ren, Y., Wan, D.-G., Lu, X.-m., Chen, L., Zhang, T.-e., & Guo, J. L. (2011). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor peptides derived from porcine hemoglobin. *Scientific research essays, 6*(30), 6262-6269.

Rentsch, D., Schmidt, S., & Tegeder, M. (2007). Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS letters, 581*(12), 2281-2289.

Rouphael, Y., Cardarelli, M., Bassal, A., Leonardi, C., Giuffrida, F., & Colla, G. (2012). Vegetable quality as affected by genetic, agronomic and environmental factors. *J. Food Agric. Environ, 10*, 680-688.

Rouphael, Y., Schwarz, D., Krumbein, A., & Colla, G. (2010). Impact of grafting on product quality of fruit vegetables. *Scientia Horticulturae, 127*(2), 172-179.

Ruiz, J. M., Castilla, N., & Romero, L. (2000). Nitrogen metabolism in pepper plants applied with different bioregulators. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48(7), 2925-2929.

Russ, W., & Meyer-Pittroff, R. (2004). Utilizing waste products from the food production and processing industries. *Critical reviews in food science and nutrition, 44*(1), 57-62.

Ryan, C. A., Pearce, G., Scheer, J., & Moura, D. S. (2002). Polypeptide hormones. *The Plant Cell, 14*(suppl_1), S251-S264.

Sánchez, A., Vázquez, A., & Safety. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality, 1*(1), 29-46.

Sathivel, S., Bechtel, P., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K., & Prinyawiwatkul, W. (2003). Biochemical and functional properties of herring (Clupea harengus) byproduct hydrolysates. *Journal of food Science, 68*(7), 2196-2200.

Savaşkan, M. (2003). *Deney Tasarımı Yöntemlerinin Karşılaştırmalı Kullanımı İle İnce Sert Seramik Kaplı Matkap Uçlarının Performans Değerlendirmesi Ve Optimizasyonu.* Fen Bilimleri Enstitüsü,

Schiavon, M., Ertani, A., & Nardi, S. (2008). Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in Zea mays L. *Journal of agricultural food chemistry, 56*(24), 11800-11808.

Selamassakul, O., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., & Ratanakhanokchai, K. (2016). A novel multi-biofunctional protein from brown rice hydrolysed by endo/endo-exoproteases. *Food function, 7*(6), 2635-2644.

Semen, Z., & Altıntaş, A. (2015). Sütte biyoaktif peptitler ve biyolojik önemi. *Türk Veteriner Hekimleri Birliği Dergisi*, 3,3-4.

Shahidi, F., Han, X.-Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (Mallotus villosus). *Food Chemistry, 53*(3), 285-293.

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC international, 91*(4), 914-931.

Sharma, S., Singh, R., & Rana, S. (2011). Bioactive peptides: a review. *Int J Bioautomation, 15*(4), 223-250.

Shetty, K., & McCue, P. (2003). Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: integration of systems biology and biotechnological approaches. *Food Biotechnology, 17*(2), 67-97.

Singh, B. P., Vij, S., & Hati, S. (2014). Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. *Peptides, 54*, 171-179.

Slavin, J. L., & Lloyd, B. (2012). Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in nutrition, 3*(4), 506-516.

Soldal, T., & Nissen, P. (1978). Multiphasic uptake of amino acids by barley roots. *Physiologia Plantarum, 43*(3), 181-188.

Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of sardinella (Sardinella aurita) by-product hydrolysates. *Food technology Biotechnology, 45*(2), 187-194.

Stiegler, J. C., Richardson, M. D., Karcher, D. E., Roberts, T. L., & Norman, R. J. (2013). Foliar absorption of various inorganic and organic nitrogen sources by creeping bentgrass. *Crop Science, 53*(3), 1148-1152.

Su, X., Dong, C., Zhang, J., Su, L., Wang, X., Cui, H., & Chen, Z. (2014). Combination therapy of anti-cancer bioactive peptide with Cisplatin decreases chemotherapy dosing and toxicity to improve the quality of life in xenograft nude mice bearing human gastric cancer. *Cell bioscience, 4*(1), 1-13.

Suhag, M. (2016). Potential of biofertilizers to replace chemical fertilizers. *Int. Adv. Res. J. Sci. Eng. Technol, 3*(5), 163-167.

Suman, G., Nupur, M., Anuradha, S., & Pradeep, B. (2015). Single cell protein production: a review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 4*(9), 251-262.

Taskin, M., Unver, Y., Firat, A., Ortucu, S., & Yildiz, M. (2016). Sheep wool protein hydrolysate: a new peptone source for microorganisms. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 91*(6), 1675-1680.

Tegeder, M. (2012). Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Current opinion in plant biology*, 15(3), 315-321.

Tiring, G., Satar, S., & Özkaya, O. (2020). Sekonder Metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 35*(1), 203-215.

Tosun, N., Satman, İ., & Erkoç, Y. (2011). Türkiye diyabet önleme ve kontrol programı eylem planı (2011-2014). *Ankara: Anıl Matbaası*, 1-30.

Trevisan, S., Manoli, A., & Quaggiotti, S. (2019). A novel biostimulant, belonging to protein hydrolysates, mitigates abiotic stress effects on maize seedlings grown in hydroponics. *Agronomy, 9*(1), 28.

Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Adrian, M. (2014). Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in plant science, 5*, 592.

Tuteja, N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in enzymology, 428*, 419-438.

Uhlig, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications*. Canada: John Wiley & Sons.

Umemiya, Y., & Furuya, S. (2001). The influence of chemical. Forms on foliar-applied nitrogen absorption for peach trees. *In International Symposium on Foliar Nutrition of Perennial Fruit Plants*, 594, 97-103.

Ünal, M. Ü., Şener, A., & Cemek, K. (2018). Biyoaktif Peptitlerin Sağlık Üzerine Etkileri. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi, 43*(6), 930-942.

Vallejo-Cordoba, B., & Gonzalez-Cordova. (2005). Bioactive peptides derived from milk proteins. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion, 55*(2), 111-117.

Vasconcelos, A. C. F. d., Zhang, X., Ervin, E. H., & Kiehl, J. d. C. (2009). Enzymatic antioxidant responses to biostimulants in maize and soybean subjected to drought. *Scientia Agricola, 66*, 395-402.

Veselá, M., & Friedrich, J. (2009). Amino acid and soluble protein cocktail from waste keratin hydrolysed by a fungal keratinase of Paecilomyces marquandii. *Biotechnology and Bioprocess Engineering, 14*(1), 84-90.

Vining, G. (1999). *Statistical process monitoring and optimization*.Boca Rotan: CRC Press.

Vuchkov, I. N., & Boyadjieva, N. (2001). *Quality improvement with design of experiments: A response surface approach* (7. Baskı). Netherlands: Springer Science & Business Media.

Walther, B., & Sieber, R. (2011). Bioactive proteins and peptides in foods. *International Journal for Vitamin Nutrition Research, 81*(2), 181.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., & Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in plant science, 9*(5), 244-252.

Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal, 4*(3), 162-176.

Warman, P. R., & Havard, K. (1998). Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown potatoes and sweet corn. *Agriculture, ecosystems environment, 68*(3), 207-216.

Watson, R., & Fowden, L. (1975). The uptake of phenylalanine and tyrosine by seedling root tips. *Phytochemistry, 14*(5-6), 1181-1186.

Wei, J. T., & Chiang, B. H. (2009). Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. *Journal of the Science of Food Agriculture, 89*(3), 372-378.

Wismer-Pedersen, J. (1988). Use of haemoglobin in foods a review. *Meat Science, 24*(1), 31-45.

Wisuthiphaet, N., Klinchan, S., & Kongruang, S. (2016). Fish Protein Hydrolysate Production by Acid and Enzymatic Hydrolysis. *King Mongkut's University of Technology North Bangkok International Journal of Applied Science and Technology*, *9*(4).

Wisuthiphaet, N., Kongruang, S., & Chamcheun, C. (2015). Production of Fish Protein Hydrolysates by Acid and Enzymatic Hydrolysis. *Journal of Medical and Bioengineering, 4*(6), 466-470.

Wu, G. (2013). *Amino acids: biochemistry and nutrition.* Boca Rotan: CRC Press.

Xu, L., & Geelen, D. (2018). Developing biostimulants from agro-food and industrial by-products. *Frontiers in plant science, 9,* 1567.

Yin, H., Pu, J., Wan, Y., Xiang, B., Bechtel, P. J., & Sathivel, S. (2010). Rheological and functional properties of catfish skin protein hydrolysates. *Journal of food Science, 75*(1), 11-17.

You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., & Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates. *Innovative food science emerging technologies, 10*(2), 235-240.

Yüksel, H. (2004). Kardiyovasküler Hastalıkların Tedavisinde Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri. *Türk Kardiyoloji Derneği Arşivi, 32*(3), 188-196.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı	: Mehmet AKINCI
Uyruğu	: TC

Eğitim Durumu

2004-2007	: Çelebi Mehmet Lisesi-Bursa
2008-2021	: Afyon Kocatepe Üniversitesi / Biyoloji Bölümü (Bölüm Birinciliği) (Lisans)
2017-2017	: Tuzla Piyade Okulu Asteğmen Eğitim Diploması
2017-2019	: Anadolu Üniversitesi /Tarım Bölümü (Önlisans)
2018-	: İstanbul Üniversitesi/İşletme (Lisans)

İş Deneyimler

2009-2009	: Bursa İl Halk Sağlığı Laboratuar Stajı (Su ve Gıda Bakteriyolojisi)
2013-2014	: Trakya Universitesi Tip Fakultesi Merkezi Laboratuarı Biyokimya bölümü
2014-2017	: Cankar Solucan Gübresi Fabrikası (Müdür)
2018-	: Orgatek Organik Gübre San ve Tic. A.Ş (Kurucu-Yönetici)

Belgeler

2011	: Diksiyon ve Güzel Konuşma (Afyonkarahisar)
2012	: Üstün Onur Belgesi (Afyon Kocatepe Üniversitesi-Afyonkarahisar)
2013	: Deney Hayvanları Sertifikası (Edirne)
2014	: Hücre Kültürü ve PCR (Bursa)

2016	: İlk Yardım Sertifikası
2016	: İş Sağlığı ve Güvenliği Uzmanlığı (Bursa)
2018	: Arıcılık (Amasya)
Askerlik	
2017	: Tuzla Piyade Okulu Asteğmen Okulu
2017	: 5. Ana Jet Üs Komutanlığı Destek Grup Komutanlığı Hizmet Bölüğü/ Takım Komutanı (Rütbe: Asteğmen)
2018	: 5. Ana Jet Üs Komutanlığı Destek Grup Komutanlığı Hizmet Bölüğü/ Bölük Komutanı Vekili (Rütbe: Teğmen)
Bilgisayar Programları	: Word, Excel, Powerpoint, Outlook, Adobe Photoshop cs6, Google Sketchup, Minitab, CropWat, AquaCrop
Yayınlar	:Özgün, G. S., Özgün, E., Eskiocak, S., Gökmen, S. S., Süt, N., & Akıncı, M. (2016). Diyabetik Sıçanlarda Taurinin Paraoksonaz, Arilesteraz ve Laktonaz Aktivitelerine Etkileri. *Türk Klinik Biyokimya Derg,* 14(3), 157-165.